

Neuropathies Périphériques Génétiques et Surdité : Etude des Relations Génétiques et Mécanistiques

Justine Lerat

▶ **To cite this version:**

Justine Lerat. Neuropathies Périphériques Génétiques et Surdité : Etude des Relations Génétiques et Mécanistiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2018. Français. NNT : 2018LIMO0055 . tel-03060393

HAL Id: tel-03060393
https://theses.hal.science/tel-03060393

Submitted on 14 Dec 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

Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

EA6309 Maintenance Myélinique et Neuropathies Périphériques

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Neurosciences

Présentée et soutenue par
Justine LERAT

Le 13 décembre 2018

Neuropathies Périphériques Génétiques et Surdité : Etude des Relations Génétiques et Mécanistiques

Thèse dirigée par le Pr Franck STURTZ et le Dr Anne-Sophie LIA

JURY :

Président du jury
Mme le Pr Karine AUBRY, PU-PH, ORL, CHU de Limoges

Rapporteurs
Mme le Pr Françoise DENOYELLE, PU-PH, ORL Pédiatrique, Necker AP-HP
M le Pr Cyril GOIZET, PU-PH, Génétique Médicale, INSERM U1211, CHU de Bordeaux

Examinateurs
Mme le Dr Sandrine MARLIN, PH, Génétique Médicale, INSERM UMR_S1163, Necker AP-HP

Droits d’auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : *http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/*



« Dans la vie rien n’est à craindre,

Tout est à comprendre. »

Marie Curie

A Madame le Professeur Françoise DENOYELLE,

Vous nous faites un grand honneur en ayant accepté d'être rapporteur de ce travail.

Nous vous remercions de nous avoir accueillis dans votre service lors d'un semestre inter-chu, puis lors du Master 2.

Nous vous remercions d'avoir bénéficié de votre savoir, auquel nous devons notre choix de la spécialité ORL pédiatrique.

Veuillez trouver dans ce travail l'expression de notre reconnaissance et de notre plus grand respect.

A Monsieur le Professeur Cyril GOIZET,

Vous nous faites un grand honneur en ayant accepté d'être rapporteur de ce travail.

Votre expertise dans le domaine des neuropathies périphériques est un modèle.

Votre disponibilité et votre aide à chaque sollicitation ont sûes être appréciées.

Soyez assuré de notre plus grande reconnaissance.

A Madame le Docteur Sandrine MARLIN,

Nous vous remercions de nous avoir accueillis au cours du Master 2 et de nous avoir transmis votre curiosité pour les surdités génétiques.

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail, en qualité de maître dans ce domaine. Pour cela, nous vous en remercions et espérons que ce travail sera à la hauteur de votre confiance.

Veuillez trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Anne-Sophie LIA,

Merci de nous avoir accueillis dans votre équipe et d'avoir eu la curiosité d'explorer le domaine des surdités génétiques au cours de ces trois années.

Votre rigueur scientifique sera pour nous toujours un exemple.

Pour cela et pour vos qualités humaines, nous vous remercions et espérons rester dignes de la confiance que vous nous avez accordée.

A Monsieur le Professeur Franck STURTZ,

Merci de nous avoir accueillis dans votre équipe et d'avoir élargi ses perspectives avec les surdités génétiques.

Votre écoute, votre patience et votre rigueur scientifique nous ont aidées au cours de ces trois années.

Soyez assuré de notre profonde gratitude.

A Madame le Professeur Karine AUBRY,

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail de recherche.

Nous vous remercions de nous avoir permis de développer l'orl pédiatrique en parallèle et espérons rester dignes de la confiance que vous nous avez accordée.

A l'équipe EA6309, pour son accueil, son soutien et son aide dans l'élaboration du projet.

A l'équipe du Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire du CHU de Limoges, pour son aide précieuse à la réalisation des séquençages.

A Paco DEROUAULT, pour sa disponibilité, sa patience et son savoir-faire à traiter les données bio-informatiques.

A Madame le Docteur Corinne MAGDELAINE, pour son aide, sa disponibilité et sa grande expérience en génétique moléculaire des neuropathies périphériques et aussi de la surdité génétique.

A Madame le Docteur Laurence RICHARD, pour son soutien, son expertise et son aide dans la réalisation de l'étude immunohistochimique.

A Madame le Docteur Anne-Françoise ROUX, pour avoir accepté de collaborer avec nous pour le séquençage NGS des surdités génétiques.

A Monsieur le Professeur Laurent MAGY, pour son enthousiasme et sa relecture avisée de la partie neurologique.

A Madame le Docteur Karima GHORAB, pour sa collaboration clinique dans la prise en charge de ces patients.

A Léa DARNAULT et Ariane LUNATI, pour leur aide dans la mise au point et la réalisation de certains séquençages.

A ma famille.

A mes amis.

Table des matières

Liste des abréviations 10
Table des Figures 11
Table des Tableaux 12

I. INTRODUCTION 13
I.1 Neuropathies Périphériques **16**
I.1.1 Rappel sur le système nerveux périphérique 16
I.1.2 Les neuropathies périphériques (NP) 17
I.1.3 Phénotype 19
I.1.3.1 Clinique 19
I.1.3.2 Electromyogramme 19
I.1.3.3 La biopsie nerveuse 20
I.1.4 Classifications 22
I.1.4.1 Formes motrices et sensitives 27
I.1.4.1.1 CMT1 ou CMTde 27
I.1.4.1.2 CMT2 ou CMTax 27
I.1.4.2 Formes motrices ou sensitives 27
I.1.4.2.1 HMN ou dHMN 27
I.1.4.2.2 HSN 27
I.1.4.3 Autres Neuropathies périphériques 28
I.1.4.3.1 HNPP 28
I.1.4.3.2 Autres NP 28
I.1.5 Génotype 28
I.1.5.1 *PMP22* 29
I.1.5.2 *MPZ* 30
I.1.5.3 *SH3TC2* 30
I.1.5.4 *MFN2* 30
I.1.5.5 *LMNA* 31
I.1.5.6 *GJB1* 31

I.2 Surdités **32**
I.2.1 Description de l'appareil auditif 32
I.2.1.1 Vue générale de l'appareil auditif 32
I.2.1.2 Zoom sur l'oreille interne 34
I.2.2 Physiologie de l'audition 38
I.2.3 Les différents types de surdité 40
I.2.3.1 Surdité de transmission 40
I.2.3.2 Surdité de perception 41
I.2.3.3 Surdité mixte 42
I.2.4 Les neuropathies auditives 42
I.2.5 Les surdités génétiques 43
I.2.5.1 Les surdités non syndromiques 44
I.2.5.1.1 *GJB2 et GJB6* 44
I.2.5.1.2 *COCH* 45
I.2.5.1.3 *PRPS1* 45
I.2.5.2 Les surdités syndromiques 46
I.2.5.2.1 *SOX10* 46
I.2.5.2.2 *SLC26A4* 47
I.2.5.3 Gènes des neuropathies auditives 47
I.2.5.3.1 *OTOF* 47
I.2.5.3.2 *DIAPH3* 48

I.3 Neuropathies périphériques génétiques et surdité **49**
I.4 Objectifs **54**

II. MATERIELS ET METHODES **56**
II.1 Matériels **57**

II.2 Next Generation Sequencing (NGS) **58**
II.2.1 Principes du NGS 58
II.2.2 Réalisation du NGS 58
II.2.3 Choix du NGS pour notre étude 60
II.2.4 Contraintes du NGS 61
II.2.5 Protocole de séquençage d'exomes **63**

II.3 Protocole de l'étude immunohistochimique **64**
II.3.1 Matériels 64
II.3.2 Méthodes 65

II.4 Protocole de l'étude protéique *in silico* **68**

III. RESULTATS **69**
III.1 Analyse moléculaire d'une cohorte française de patients présentant une neuropathie périphérique et une surdité **70**
Article: Inherited Peripheral Neuropathies and Deafness: Molecular diagnosis by NGS of a French cohort 73
III. 2 *ABHD12* **93**
Article: A complex homozygous mutation in *ABHD12* responsible for PHARC syndrome discovered with NGS and review of the literature 95
III. 3 *SH3TC2* **103**
Article: Four new pathogenic variants identified in the *SH3TC2* gene responsible for Charcot-Marie-Tooth disease associated with deafness and/or scoliosis 106
III.4 *PRPS1* **112**
Article: A novel pathogenic variant in *PRPS1*responsible for CMTX5 discovered with NGS in the French population 114
III.5 *NEFL* **126**
Article: A novel pathogenic variant in *NEFL* responsible for deafness associated with peripheral neuropathy discovered with NGS and review of the literature 128
III.6 *MPZ* **140**
Article: Peripheral neuropathy associated with deafness sur to two novel variants in *MPZ* in a French cohort 143

III.7 Etude d'EXOMES **155**
III.7.1 Cas index 156
III.7.2 Résultats 157
III.7.3 Conclusion 158

III.8 Etude de nerfs cochléaires murins et humains par immunohistochimie **159**
III.8.1 Introduction 160
III.8.2 Objectifs 160
III.8.3 Résultats 160
III.8.3.1 Chez le rat WT 160
III.8.3.2 Chez le rat CMT 161
III.8.3.3 Chez l'humain 162
II.8.4 Conclusion - Discussion 162

III.9 Recherche de réseaux protéiques via une approche *in silico* **164**

III.9.1 Résultats 165
III.9.1.1 Interactions directes....165
III.9.1.2 Interactions indirectes....166
III.9.1.3 Absence d'interaction....170
II.9.2 Conclusion....170

IV. DISCUSSION....171

IV.1 La génétique des patients NP + Surdité....**173**
IV.1.1 La surdité est-elle sous-diagnostiquée chez les patients NP ? Ou les patients NP sont-ils moins atteints de surdité ?....173
IV.1.2 Les gènes décrits « NP et surdité » le sont-ils vraiment ?....174
IV.1.3 VUS : comment aller plus loin ?....177

IV.2 Clinique des surdités et neuropathies....**178**
IV.2.1 Degré de la surdité....178
IV.2.2 Délai d'apparition de la surdité....178
IV.2.3 Quelle est la cause des troubles de l'équilibre des patients NP + Surdité ?....178
IV.2.4 Place de l'implant cochléaire chez les patients sourds et atteints de NP....179

IV.3 Mécanismes d'apparition des surdités chez les patients atteints de neuropathies....**180**
IV.3.1 S'agit-il de neuropathie auditive uniquement ?....180
IV.3.2 La surdité pourrait-elle être également endochléaire ?....181
IV.3.3 Où sont exprimés les 36 gènes NP+Surdité ?....182
IV.3.4 Les 36 gènes interagissent-ils entre eux ?....184
IV.3.5 Existe-t-il des gènes modificateurs ?....185

IV.4 Apport des modèles animaux et/ou cellulaire pour aller plus loin....**186**
IV.4.1 Les rats CMT1A du laboratoire sont-ils sourds ?....186
IV.4.2 Les autres modèles animaux....186
IV.4.3 Modèles cellulaires....187

IV.5 Thérapie....**187**

V. CONCLUSION....189

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES....191

VII. ANNEXES....205

Liste des abréviations

***NP** : Neuropathies Périphériques héréditaires*
***CMT** : Charcot-Marie-Tooth*
***SNC** : Système Nerveux Central*
***SNP** : Système Nerveux Périphérique*
***HSN** : Hereditary Sensory Neuropathy*
***HMN** : Hereditary Motor Neuropathy*
***HMSN** : Hereditary Motor and Sensory Neuropathy*
***EMG** : ElectroMyoGramme*
***VCN** : Vitesse de Conduction Nerveuse*
***HNPP** : Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsy*
***HSAN** : Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathies*
***PHARC** : Polyneuropathy, Hearing loss, Ataxia, Retinis, Cataract*
***BIAP** : Bureau International d'AudioPhonologie*
***OEA** : OtoEmissions Acoustiques*
***PEA** : Potentiels Evoqués Auditifs*
***ADN** : Acide DésoxyriboNucléique*
***NGS** : Next Generation Sequencing*
***SNV :** Single Nucleotide Variant*
***Indel** : Insertion Deletion*
***CNV** : Copy Number Variation*
***WES** : Whole Exome Sequencing*
***WGS** : Whole Genome Sequencing*
***MLPA** : Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*
***WT** : Wild Type*
***Ac** : Anticorps*
***EDTA** : EthyleneDiamineTetraacetic Acid*
***PBS** : Phosphate-Buffered Saline*

Tables des Figures

Figure 1 : Systèmes nerveux Central et Périphérique
Figure 2 : Représentation de la cellule de Schwann et de la gaine de myéline, d'après McGraw Hill
Figure 3 : Représentation des différentes neuropathies héréditaires ; Schéma issu de Mathis et al, 2015
Figure 4 : Caractéristiques électromyographiques de lésions axonales (CMT2) et de lésions démyélinisantes (CMT1) d'après le Dr Cassereau, CHU Angers
Figure 5 : Aspect en bulbe d'oignon avec compaction anormale de la gaine de myéline en faveur de CMT1B. Coupe histologique issue de la collection du Pr JM Vallat, CHU de Limoges, avec l'aide de Laurence Richard
Figure 6 : Mitochondries d'un nerf normal à gauche ; à droite : les mitochondries en cas de mutation MFN2 sont agrégées, arrondies et ont perdu des crêtes. Coupe histologique issue de la collection du Pr JM Vallat, CHU de Limoges, avec l'aide de Laurence Richard
Figure 7 : Première classification de CMT
Figure 8 : Anatomie et Physiologie du système auditif, d'après Collège Français d'ORL
Figure 9 : Organisation des cellules ciliées : A) et B) en microscopie électronique cellules ciliées internes de rat; C) sommet de cellule ciliée interne ; D) zone de contact entre cellules ciliées ; E) coupes horizontale de cellules ciliées montrant les filaments latéraux ; F) et G) rangée de cellules ciliées. D'après Hackney et al, 2013
Figure 10 : Le nerf cochléaire dans l'angle ponto-cérébelleux de la fosse crânienne postérieure, d'après Outrequin et Boutillier (représenté en jaune)
Figure 11 : Les fibres nerveuses cochléaires, d'après le Collège Français d'ORL
Figure 12 : Innervation de l'oreille interne, d'après Krieg
Figure 13 : Schéma de l'innervation horizontale de l'organe de Corti. En vert, les neurones afférents, en bleu, les neurones efférents médians, et en rouge, les neurones efférents latéraux. (GS : ganglion spiral ; FIGS : faisceau intraganglionnaire spiral ; CCE : cellules ciliées externes ; CCI : cellules ciliées internes). D'après EMC
Figure 14 : Différents types de surdité en audiométrie tonale, d'après le Collège français d'ORL
Figure 15 : Anatomie et audiogramme correspondant à une surdité de transmission
Figure 16 : Anatomie et audiogramme correspondant à une surdité de perception
Figure 17 : Audiogramme correspondant à une surdité mixte
Figure 18 : Synaptopathie auditive génétique d'après Moser, Predoehl, Starr, 2013
Figure 19 : Encerclés en rouge, les gènes d'intérêt pour NP et surdité parmi les 36 gènes de NP et surdité et leur répartition parmi les différentes formes de NP ; Schéma issu de The Lancet
Figure 20 : Localisation des protéines impliquées dans NP et surdité au niveau de la cellule de Schwann et de l'axone et du corps cellulaire. Schéma issu de Rossor et al, 2013
Figure 21 : Principes du NGS avec Ion torrent
Figure 22 : a) Séquenceur Proton (Life Tech) ; b) Séquenceur Miniseq (Illumina) ; c)Séquenceur NextSeq (Illumina)
Figure 23 : Représentation de la couverture en fonction de la profondeur de lecture pour le séquençage des exomes, sur la base des trios.
Figure 24 : Etude immunohistologique de nerf sciatique et nerf cochléaire de rats WT et CMTpmp22/+ pour les protéines pmp22, mpz, nefl et trpv4 (au Microscope grossissement x10 pour Figures I à L, x20 pour Figures A à D et M à P, x40 pour Figures E à H)
Figure 25 : Réseau protéique de PMP22 confronté à l'ensemble des 126 gènes NP. Nous notons ici un lien direct entre PMP22 et MPZ
Figure 26 : Réseau protéique de PMP22 avec les autres protéines de surdité
Figure 27 : Interactions de PRPS1 avec les protéines du groupe NP+Surdité
Figure 28 : Interactions de PRPS1 avec les protéines du groupe Surdité
Figure 29 : Interactions de PRPS1 avec les protéines du groupe NP
Figure 30 : Interaction de TRPV4 avec les protéines de NP
Figure 31 : Interaction de TRPV4 avec les protéines de Surdité
Figure 32 : Absence d'interaction de SH3TC2 avec les différentes protéines de NP et de Surdité par l'analyse des hubs moléculaires

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Nouvelle Classification des NP proposée par Mathis et al, 2015

Tableau 2 : Degrés de surdité selon le BIAP

Tableau 3 : Liste des 36 gènes impliqués dans NP et surdité. Le type de neuropathie est précisé pour chaque gène. (D : Dominant ; R : Récessif ; XL : lié à l'X)

I. INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les neuropathies périphériques héréditaires (NP) sont caractérisées par des phénotypes très divers et une hétérogénéité génétique importante. La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) (MIM 118300) est l'une de ces neuropathies. Elle représente la majeure partie des neuropathies périphériques sensitivo-motrices associées à une aréflexie ostéotendineuse, sans trouble métabolique associée. Il s'agit d'un groupe très hétérogène, tant du point de vue de la clinique que de la biologie moléculaire. La duplication de *PMP22* fut la première variation pathogène identifiée (Timmerman *et al*, 1992), et à ce jour plus de 90 gènes sont impliqués.

D'autres symptômes peuvent être associés, telle que la surdité. A l'heure actuelle, aucune estimation précise de la surdité n'existe dans cette population. La surdité a ainsi été décrite chez 5% des patients suivis pour CMT (Gillepsie *et al*, 2013).

En 2018, plus de 100 gènes sont identifiés comme responsables de surdités isolées et il existe plus de 700 syndromes associés à la surdité. Les trois quarts des surdités prélinguales sont d'origine génétique. Par ailleurs, les surdités génétiques sont dans la grande majorité des cas des maladies monogéniques.

La pathogénicité de la surdité des patients CMT est incertaine, et l'hypothèse d'un dysfonctionnement rétrocochléaire reste le plus souvent évoqué (Anzalone *et al*, 2018). Cependant, des atteintes endocochléaires ont également été évoquées (Butinar *et al*, 2008).

L'objectif de ce travail de thèse était de mieux comprendre la physiopathologie de la surdité chez les patients atteints de neuropathies périphériques. Pour cela plusieurs approches complémentaires ont été mises en œuvre : 1) Approche clinique et génétique moléculaire sur une cohorte française de patients atteints à la fois de neuropathie périphérique et de surdité, 2) Approche biochimique sur des prélèvements de nerfs cochléaires murins et humains, 3) Approche bio-

informatique afin d'identifier des réseaux de protéines impliquées dans l'apparition de surdité liée à une neuropathie périphérique.

I.1 Neuropathies périphériques

I.1.1 Rappel sur le système nerveux périphérique

Le système nerveux est constitué du système nerveux central (**SNC**) et du système nerveux périphérique (**SNP**). Le système nerveux périphérique se développe en dehors de l'encéphale et de la moelle épinière. Les nerfs crâniens font également partie du SNP, à l'exception du nerf optique. Il existe des nerfs **sensitifs** et des nerfs **moteurs**, responsables respectivement des voies **afférentes** (sensitives) et **efférentes** (motrices). Le SNP comprend le **système nerveux somatique** et le système nerveux **autonome**.

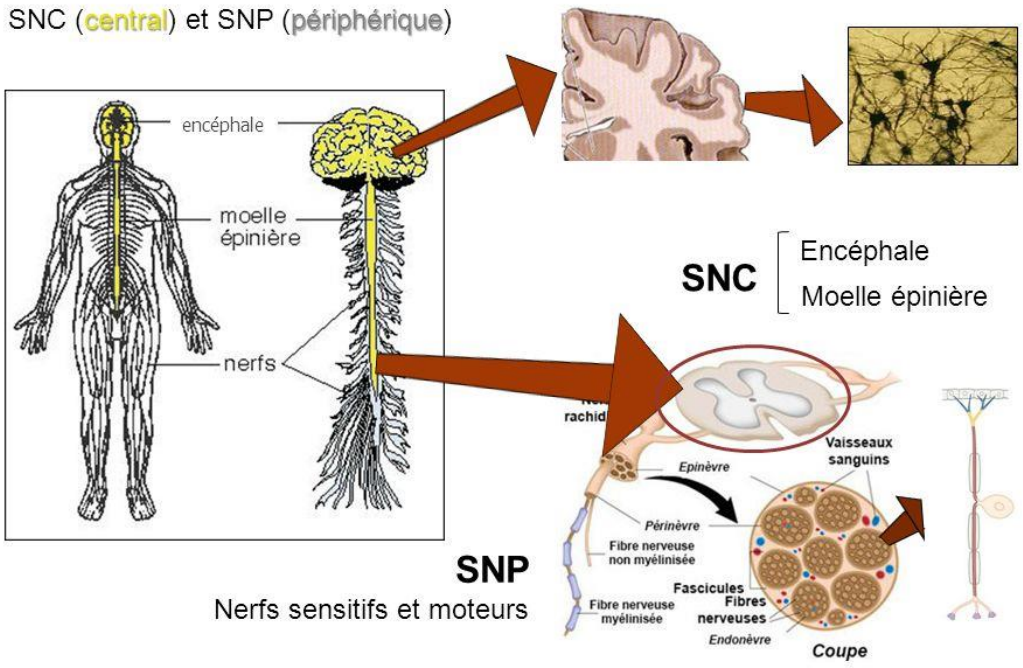


Figure 1 : Systèmes nerveux Central et Périphérique

Le SNP est caractérisé par les **cellules de Schwann** qui myélinisent en grande partie les axones périphériques, qui sont des prolongements uniques, fins, homogènes, relativement linéaires et pouvant s'arboriser par la suite au niveau des synapses. Le nerf désigne un regroupement d'axones distincts. Ces axones sont issus de neurones dont les corps cellulaires sont le plus souvent regroupés en ganglion.

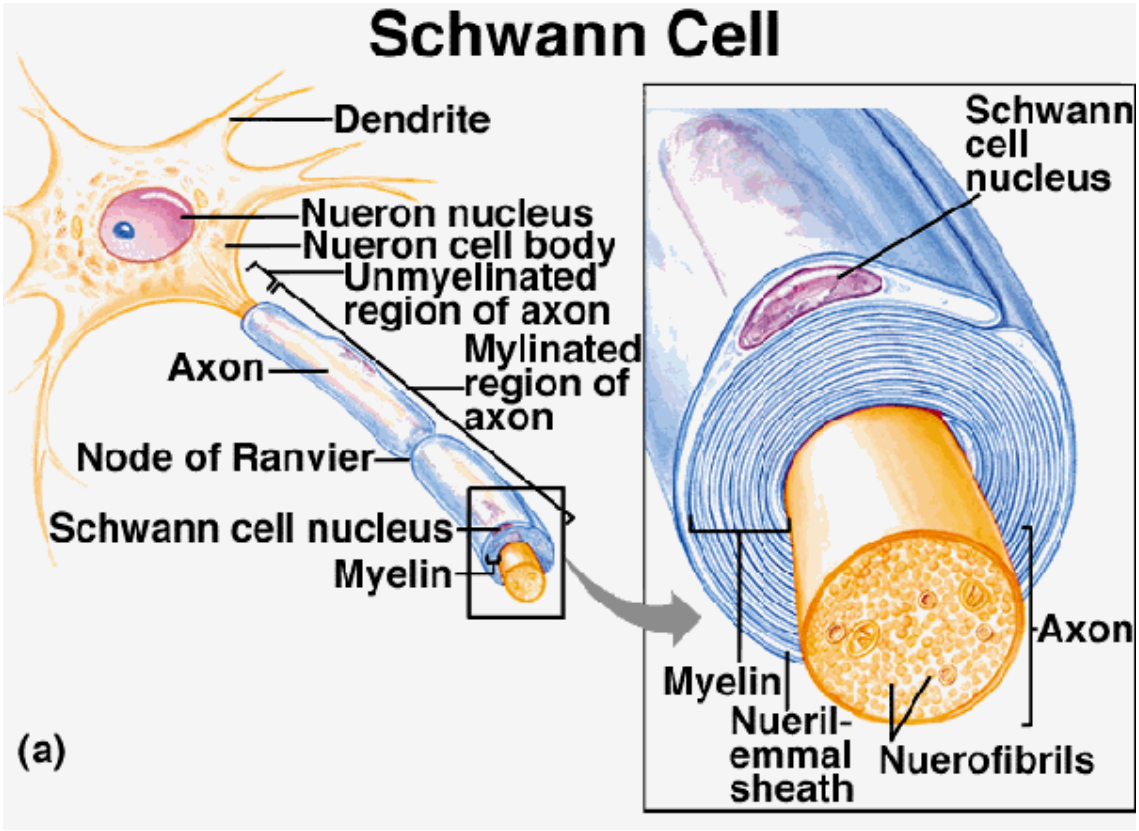


Figure 2 : Représentation de la cellule de Schwann et de la gaine de myéline, d'après McGraw Hill

I.1.2 Les neuropathies périphériques (NP)

Les neuropathies périphériques correspondent à l'atteinte des neurones moteurs, et/ou sensitifs des nerfs périphériques, des racines, des plexus, des troncs nerveux périphériques jusqu'à leurs ramifications terminales intramusculaires, et parfois du système nerveux autonome.

On distingue classiquement les neuropathies **héréditaires** et les neuropathies acquises dont les mécanismes et causes sont extrêmement variés.

Il existe de nombreuses neuropathies héréditaires différentes *(cf Figure 1)* : certaines sont sensitives pures (**HSN** : Hereditary Sensory Neuropathy), d'autres motrices pures (**HMN :** Hereditary Motor Neuropathy), d'autres sensitivo-motrices (**CMT** : Charcot-Marie-Tooth ou **HMSN** : Hereditary Motor and Sensory Neuropathy), et d'autres syndromiques.

L'électromyogramme (EMG) et plus rarement la biopsie nerveuse sont des aides précieuses au diagnostic.

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) (MIM 118300) est l'une de ces neuropathies. Elle représente la majeure partie des neuropathies périphériques sensitivo-motrices associées à une aréflexie ostéotendineuse, sans trouble métabolique associée. On distingue les atteintes démyélinisantes, axonales et mixtes, cette distinction étant principalement basée sur la vitesse de conduction motrice du nerf médian à l'avant-bras.

CMT est un groupe hétérogène de neuropathies héréditaires, allant des formes sévères à début précoce, telles que les neuropathies héréditaires congénitales, le syndrome de Dejerine-Sottas, aux formes plus modérées débutant à l'âge adulte.

CMT est la forme la plus fréquente de désordres neuromusculaires avec une prévalence de 1/1214 dans la population générale (Mathis *et al*, 2015).

Le mode de transmission peut être autosomique dominant, autosomique récessif ou lié à l'X.

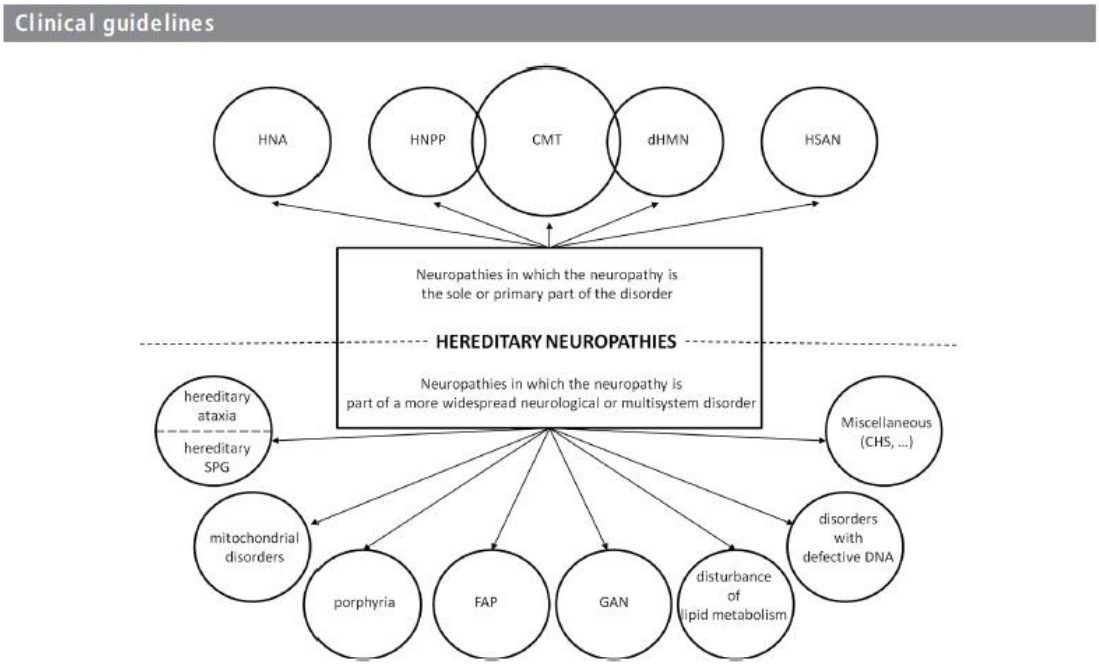


Figure 1 Schematic representation of the main causes of hereditary neuropathies. CHS, Chediak–Higashi syndrome; CMT, Charcot–Marie–Toot diseases; dHMN, distal hereditary motor neuropathy; FAP, familial amyloid neuropathy; GAN, giant axonal neuropathy; HNA, hereditary neuralgic amyotrophy; HNPP, hereditary neuropathy with liability to pressure palsies; HSAN, hereditary sensory and autonomic neuropathies; SPG, spastic paraplegia.

Figure 3 : Représentation des différentes neuropathies héréditaires ; Schéma issu de Mathis et al, 2015

I.1.3 Phénotype

I.1.3.1 Clinique

L'examen clinique du patient est la première étape essentielle au diagnostic de la maladie. Pour les CMT par exemple, la neuropathie est sensitivo-motrice associant un déficit moteur avec des amyotrophies, des troubles sensitifs, une abolition des réflexes ostéo-tendineux, des pieds creux ou plats, avec une évolution chronique et progressive.

D'autres signes peuvent être présents telle que une scoliose, un syndrome pyramidal, une ataxie cérébelleuse, une hyperélasticité cutanée, une glomérulosclérose ou une atteinte des nerfs crâniens (atrophie optique, ophtalmoplégie, paralysie laryngée, surdité…). Ces symptômes sont liés à des gènes spécifiques. La recherche de ces signes cliniques associés est nécessaire pour orienter les études moléculaires et le diagnostic génétique.

Une grande variabilité interindividuelle ou intrafamiliale est observée.

I.1.3.2 Electromyogramme **EMG**

L'électromyogramme (EMG) doit être réalisé de manière systématique et complète. Il peut être répété et complété par l'étude des potentiels évoqués.

Il permet de confirmer l'atteinte tronculaire et précise le type lésionnel.

Il existe cependant des limites, telles que la présence d'un ou plusieurs troncs nerveux non stimulables avec impossibilité de préciser le type lésionnel, peu d'anomalies en cas d'atteinte isolée des petites fibres, en cas de lésions de type axonal sévères et anciennes. Il est alors difficile de préciser si la pathologie initiale était démyélinisante.

L'étude de la conduction nerveuse motrice met en évidence par exemple, des vitesses basses ou normales, un ralentissement homogène, des nerfs difficilement excitables, et l'absence de bloc ou de dispersion en général.

L'EMG, en se basant sur la vitesse de conduction motrice du nerf médian, permet de déterminer les CMT démyélinisants avec une Vitesse de Conduction Nerveuse,

VCN ≤ 30m/s, les CMT axonaux avec VCN > 40m/s, ou CMT intermédiaires avec 30 < VCN < 40m/s. La limite de 38m/s est la référence.

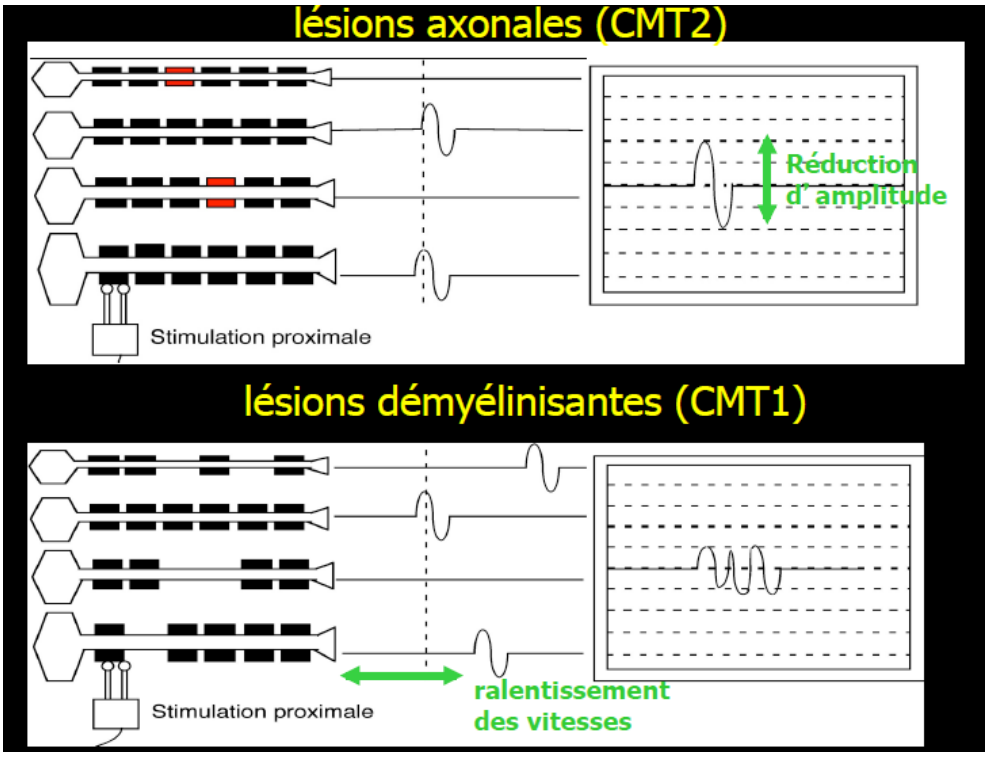


Figure 4: Caractéristiques électromyographiques de lésions axonales (CMT2) et de lésions démyélinisantes (CMT1) d'après le Dr Cassereau, CHU Angers

I.1.3.3 La biopsie nerveuse

La biopsie nerveuse est le plus souvent réalisée au niveau d'un nerf sensitif, tel que le nerf saphène externe, sur 3 à 5cm. Le geste est réalisé sous anesthésie locale à la Xylocaine.

La biopsie nerveuse peut fournir des renseignements très précieux pour caractériser l'atteinte du patient. De très nombreux profils différents ont été observés. Voici, ci-dessous, l'exemple de deux images de microscopies électroniques caractéristiques de différents patients CMT : 1) chez un grand nombre de patients, de nombreuses lésions larges en bulbes d'oignons, non-inflammatoires et éparses sont présentes *(Figure 5)* (elles s'avèreront plus tard caractéristiques de la duplication d'un gène important dans cette maladie : *PMP22 (voir paragraphe 1.1.5.1)* ; 2) certains patients présentent plutôt des mitochondries anormales avec une morphologie sphérique au lieu de tubulaire (*Figure 6*). Un

pliage anormal de la structure de myéline est observé chez d'autres patients (Oka *et al*, 2016), ou bien des lésions en bulbes d'oignons avec une compaction anormale de la gaine de myéline.

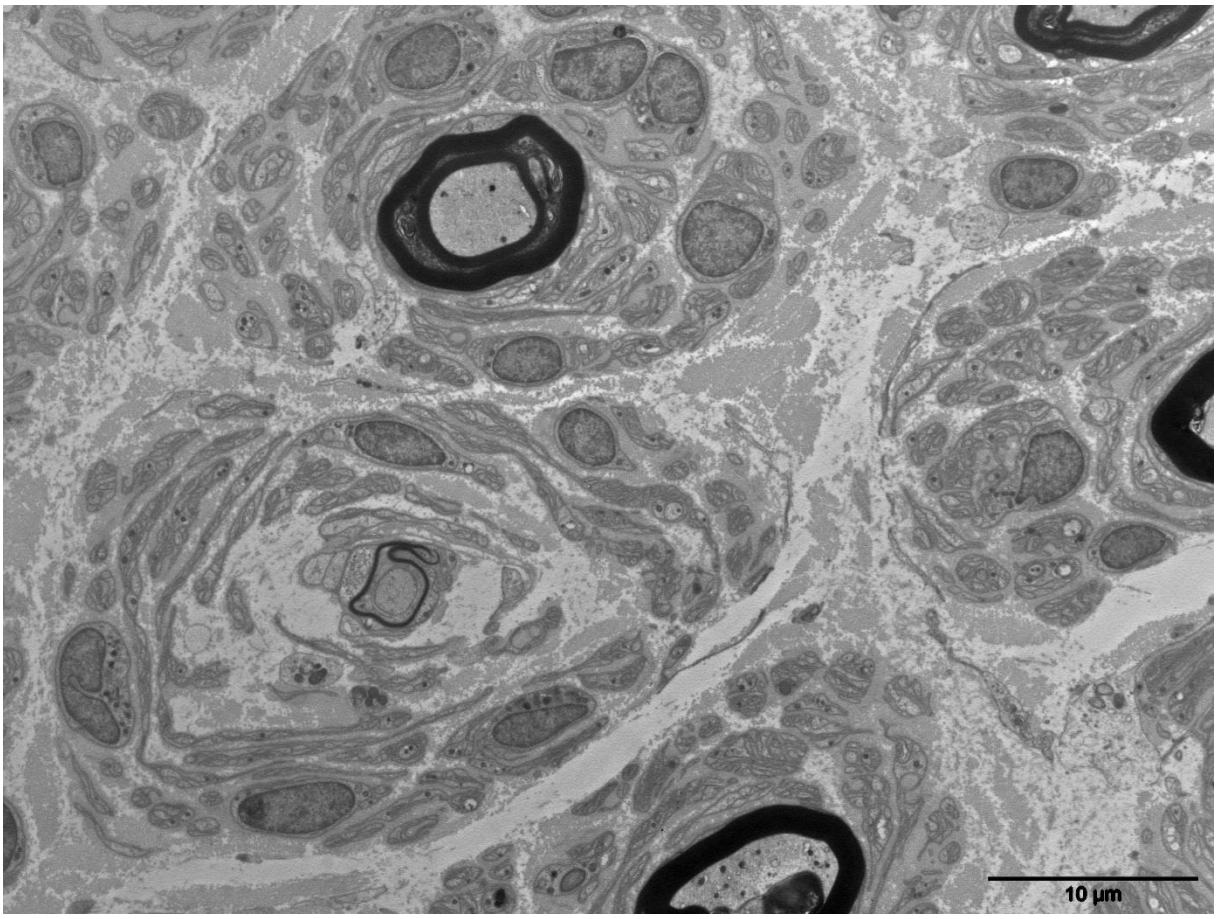


Figure 5 : Aspect en bulbes d'oignon avec compaction anormale de la gaine de myéline en faveur de CMT1B. Coupe histologique issue de la collection du Pr JM Vallat, CHU de Limoges, avec l'aide de Laurence Richard

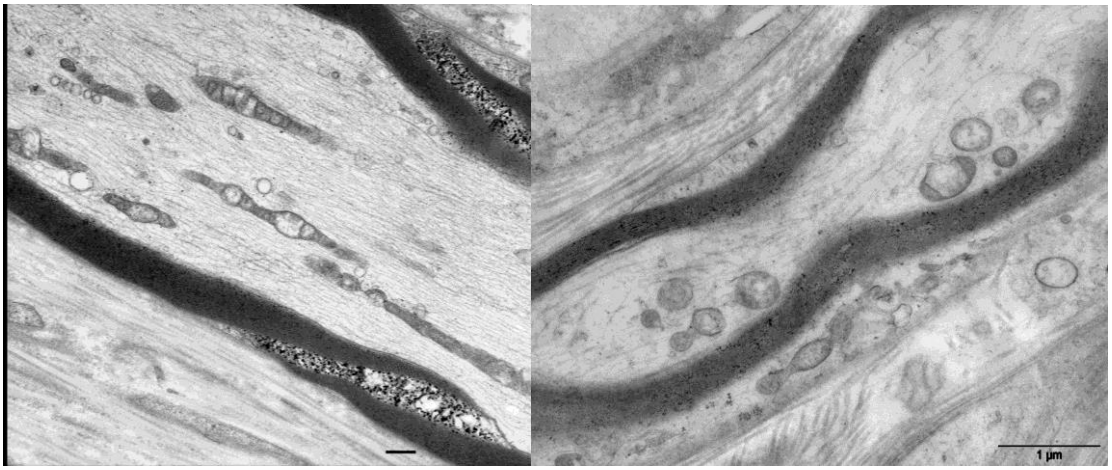


Figure 6 : Mitochondries d'un nerf normal à gauche. A droite : les mitochondries en cas de mutation MFN2 sont agrégées, arrondies et ont perdu des crêtes. Coupe histologique issue de la collection du Pr JM Vallat, CHU de Limoges, avec l'aide du Dr Laurence Richard

I.1.4 Classifications

Plusieurs classifications ont été élaborées au cours des années, s'appuyant sur le phénotype du patient dans un premier temps, puis sur l'électrophysiologie, puis actuellement également sur la génétique.

Les premières observations cliniques des patients CMT en 1886 de Jean-Martin Charcot, Pierre Marie (Revue médicale (Paris) 1886;6:97–138) et Howard Tooth ("The peroneal type of progressive muscular atrophy", thèse de docteur en médecine, London, 1886) décrivaient une atrophie musculaire péronière lentement progressive, sans atteinte des membres supérieurs pendant de nombreuses années.

Jules Dejerine et Jules Sottas ont décrit en 1893 une neuropathie sensitivo-motrice débutant dans l'enfance, connue sous le nom de syndrome de Dejerine-Sottas. Gustave Roussy et Gabriel Levy ont décrit une forme de HMSN avec tremblement et ataxie, appelée syndrome Roussy-Levy, en 1926. En 1968, Peter Dyck et Edward Lambert ont proposé l'utilisation des vitesses de conductions nerveuses motrices sur le nerf médian (VCNM) afin de classifier ces différentes neuropathies.

Ainsi ont été différenciées les formes CMT1 (démyélinisante) ayant des VCM < 40m/s et CMT2 (axonale) avec des VCM ≥ 40m/s.

Ce n'est qu'en 1992 que le premier gène impliqué dans CMT a été découvert par l'équipe de V. Timmerman (Timmerman *et al*, 1992). Il s'agissait du gène *PMP22*, et c'est une duplication de ce gène qui expliquait les formes démyélinisantes de nombreux patients. La maladie provoquée par cette duplication a alors été nommée CMT1A.

Depuis cette date, plus de 90 gènes responsables de CMT ont été découverts. Si bien que nous sommes arrivés au CMT2Z avec le gène *MORC2*, responsable d'une forme axonale dominante CMT (Sevilla *et al*, 2016). (*cf Figure 7)*

Devant la découverte croissante de nouveaux gènes impliqués dans CMT et NP, une nouvelle classification plus simple, basée sur le mode de transmission, la

forme démyélinisante, axonale ou intermédiaire et le gène impliqué, a été proposée par Mathis *et al* (Mathis *et al*, 2015). Cette classification a été approuvée par un groupe d'experts internationaux (Magy *et al*, 2018) *(cf Tableau 1).* Ainsi, le CMT1A peut être nommé AD-CMTde-*PMP22*dup et, CMT2Z peut être appelé AD-CMTax-*MORC2*.



Figure 7 : Première classification de CMT

	Proposed denomination	Gene	Chromosome	MIM	Present denomination
CMTde					
AD-CMTde	AD-CMTde-PMP22dup	PMP22 (duplication)	17p12	118220	CMT1A
	AD-CMTde-PMP22	PMP22	17p12	118300	CMT1E
	AD-CMTde-MPZ	MPZ/P0	1q23.3	118200	CMT1B
	AD-CMTde-LITAF	LITAF/SIMPLE	16p13.13	601098	CMT1C
	AD-CMTde-EGR2	EGR2/KROX20	10q21.3	607678	CMT1D
	AD-CMTde-NEFL	NEFL	8p21.2	607734	CMT1F
	AD-CMTde-FBLN5	FBLN5	14q32.12	–	–
	AD-CMTde-GJB3	GJB3/Connexin 31	1p34.3	–	–
	AD-CMTde-ARHGEF10	ARHGEF10	8p23.3	608236	SNCV/CMT1
AR-CMTde	AR-CMTde-GDAP1	GDAP1	8q21.11	214400	CMT4A
	AR-CMTde-MTMR2	MTMR2	11q21	601382	CMT4B1
	AR-CMTde-SBF1	SBF1/MTMR5	22q13.33	615284	CMT4B3
	AR-CMTde-SBF2	SBF2/MTMR13	11p15.4	604563	CMT4B2
	AR-CMTde-SH3TC2	SH3TC2/KIAA1985	5q32	601591	CMT4C
	AR-CMTde-NDRG1	NDRG1	8q24.22	601455	CMT4D
	AR-CMTde-EGR2	EGR2/KROX20	10q21.3	605253	CMT4E
	AR-CMTde-PRX	PRX	19q13.2	614895	CMT4F
	AR-CMTde-HK1	HK1	10q22.1	605285	CMT4G
	AR-CMTde-FGD4	FGD4	12p11.21	609311	CMT4H
	AR-CMTde-FIG4	FIG4/KIAA0274/SAC3	6q21	609390	CMT4J
	AR-CMTde-CTDP1	CTDP1	18q23	604168	CCFDN
	AR-CMTde-SURF1	SURF1	9q34.2	–	–
CMTax					
AD-CMTax	AD-CMTax-MFN2	MFN2	1p36.22	609260	CMT2A2
	AD-CMTax-RAB7	RAB7	3q21.3	605588	CMT2B
	AD-CMTax-TRPV4	TRPV4	12q24.11	606071	CMT2C
	AD-CMTax-GARS	GARS	7p14.3	601472	CMT2D
	AD-CMTax-AARS	AARS	16q22.1	613287	CMT2N
	AD-CMTax-MARS	MARS	12q13.3	616280	CMT2U
	AD-CMTax-HARS	HARS	5q31.3	–	–
	AD-CMTax-NEFL	NEFL	8p21.2	607684	CMT2E
	AD-CMTax-HSPB1	HSPB1/HSP27	7q11.23	606595	CMT2F
	AD-CMTax-HSPB8	HSPB8/HSP22	12q24.23	608673	CMT2L
	AD-CMTax-GDAP1	GDAP1	8q21.11	607831	CMT2K
	AD-CMTax-MPZ	MPZ/P0	1q23.3	607677/607736	CMT2I/CMT2J
	AD-CMTax-DNM2	DNM2	19p13.2	606482	CMT2M
	AD-CMTax-DYNC1H1	DYNC1H1	14q32.31	60012	CMT2O
	AD-CMTax-LRSAM1	LRSAM1	9q33.3	614436	CMT2P
	AD-CMTax-DHTKD1	DHTKD1	10p14	615025	CMT2Q
	AD-CMTax-TRIM2	TRIM2	4q31.3	615490	CMT2R
	AD-CMTax-VCP	VCP	9p13.3	–	–
	AD-CMTax-TFG	TFG	3q12.2	604484	HMSNP
	AD-CMTax-KIF5A	KIF5A	12q13.3	604187	SPG10
	AD-CMTax-mtATP6	mtATP6	–	–	–
	AD-CMTax-Unknown	Unknown	12q12q13.2	608591	CMT2G
AR-CMTax	AR-CMTax-LMNA	LMNA	1q22	605588	CMT2B1
	AR-CMTax-MED25	MED25	19q13.33	605589	CMT2B2
	AR-CMTax-GDAP1	GDAP1	8q21.11	607731	CMT2H
	AR-CMTax-IGHMBP2	IGHMBP2	11q13.3	616155	CMT2S
	AR-CMTax-C12ORF65	C12ORF65	12q24.31	615035	SPG55
	AR-CMTax-HSJ1	HSJ1	2q35	604139	CMT2T
CMTin					
AD-CMTin	AD-CMTin-DNM2	DNM2	19p13.2	606482	CMTDIB
	AD-CMTin-YARS	YARS	1p35.1	608323	CMTDIC
	AD-CMTin-MPZ	MPZ/P0	1q23.3	607791	CMTDID
	AD-CMTin-INF2	INF2	14q32.33	614455	CMTDIE
	AD-CMTin-GNB4	GNB4	3q26.33	615195	CMTDIF
	AD-CMTin-NEFL	NEFL	8p21.2	–	–
	AD-CMTin-Unknown	Unknown	10q24.1–q25.1	606483	CMTDIA
AR-CMTin	AR-CMTin-GDAP1	GDAP1	8q21.11	608340	CMTRIA
	AR-CMTin-KARS	KARS	16q23.1	613641	CMTRIB
	AR-CMTin-PLEKHG5	PLEKHG5	1p36.31	615376	CMTRIC
	AR-CMTin-COX6A1	COX6A1	12q24	616039	CMTRID

XL-CMT	XL-CMTin-GJB1	GJB1/Connexin 32	Xq13.1	302800	CMTX1
	XL-CMTde-GJB1	GJB1/Connexin 32	Xq13.1	302800	CMTX1
	XL-CMTax-GJB1	GJB1/Connexin 32	Xq13.1	302800	CMTX1
	XL-CMT-AIFM1	AIFM1	Xq26.1	310490	CMTX4
	XL-CMT-PRPS1	PRPS1	Xq22.3	311070	CMTX5
	XL-CMT-PDK3	PDK3	Xp22.1	300905	CMTX6
	XL-CMT-Unknown	Unknown	Xp22.2	302801	CMTX2

Tableau 1 : Nouvelle Classification des NP proposée par Mathis et al, 2015

I.1.4.1 Formes motrices et sensitives

I.1.4.1.1 CMT1 ou CMTde

C'est la forme la plus fréquente de CMT, représentant 2/3 des cas. Il s'agit d'une forme démyélinisante. Les formes autosomiques dominantes sont plus fréquentes. CMT1A (MIM118220) ou AD-CMTde-*PMP22*dup, lié à la duplication de *PMP22* et plus précisément à la région 17p11.2, explique 60% des cas de CMT1. La pathologie débute dans l'adolescence.

I.1.4.1.2 CMT2 ou CMTax

Il s'agit de forme axonale, représentant 1/3 des cas. La transmission est le plus souvent autosomique dominant. Les variabilités dans l'âge de survenue et la sévérité sont plus importantes. CMT2A ou AD-CMTax-*MFN2* est la forme la plus fréquente.

I.1.4.2 Formes motrices ou sensitives

I.1.4.2.1 HMN ou dHMN

Distal Hereditary Motor Neuropathies (dHMN) sont des formes purement motrices, considérées comme des dégénérations longueur-dépendantes des motoneurones spinaux. Aucun signe sensitif n'est observé et les potentiels sensitifs sont normaux sur l'EMG.

Le mode de transmission peut être autosomique dominant, autosomique récessif ou lié à l'X.

Un exemple de HMN est dHMNVIIa ou AD-dHMN-*SLC5A7*, caractérisé par un début à la vingtaine, avec fonte musculaire progressive distale et faiblesse des membres supérieurs et inférieurs avec difficulté à la marche et à la poignée. L'atrophie musculaire est particulièrement marquée aux mains et aux membres inférieurs. La paralysie des cordes vocales est également possible (Barwick *et al*, 2012).

I.1.4.2.2 HSN

Il s'agit de formes purement sensitives, génétiquement et cliniquement hétérogènes. Un exemple, HSN1 ou AD-dHSN-*SPTLC1* est une neuropathie

affectant les pieds et membres inférieurs. Des paresthésies, diminution ou exacerbation de la douleur nociceptive sont possibles (Hicks *et al*, 1922).

I.1.4.3 Autres Neuropathies périphériques

I.1.4.3.1 HNPP

Hereditary Neuropathy with liability to pressure palsy (HNPP) (MIM162500) est une pathologie autosomique dominante caractérisée par une mononeuropathie récidivante généralement déclenchée par des activités physiques mineures.

Cette pathologie est due à une délétion hétérozygote chromosomique 17p11.2, dont le gène *PMP22*. C'est la variation en miroir de CMT1A ou AD-CMTde-Dup*PMP22*, correspondant à une duplication de cette même zone.

A l'examen histologique, les tomaculas ou gonflement des gaines de myéline, sont caractéristiques.

I.1.4.3.2 Autres NP

Les formes sensitives avec atteinte du système autonome ou Hereditary sensory and autonomic neuropathies (HSAN) sont un groupe hétérogène de NP avec des formes purement sensitives, ou avec une atteinte motrice variable, associées à quelques troubles dysautonomiques, voire des neuropathies avec une atteinte purement du système autonome.

Les formes syndromiques existent également, comme le syndrome PHARC (Polyneuropathy, Hearing loss, Ataxia, Retinis, Cataract) (MIM612674) qui associe neuropathie périphérique, surdité, ataxie, rétinite pigmentaire et cataracte.

I.1.5 Génotype

Plusieurs centaines de gènes ont été identifiés pour être responsables de NP héréditaires, dont près de 90 gènes de CMT.

Les gènes les plus fréquemment impliqués dans le CMT sont la duplication *PMP22* pour CMT1A ou AD-CMTde-*PMP22*dup (15% des patients CMT), *GJB1* pour CMTX1 ou XL-CMTin-*GJB1*, *MPZ* pour CMT1B ou AD-CMTde-*MPZ*,

MFN2 pour CMT2A ou AD-CMTax-*MFN2*. Murphy *et al* décrivent quatre gènes liés au diagnostic moléculaire de CMT, impliqués dans 90% des cas: *PMP22*, *GJB1*, *MPZ* et *MFN2 (*Murphy *et al*, 2012). Fridman *et al* ont quant à eux, mis en évidence que les types de CMT les plus fréquents sont CMT1A (55%), CMT1X (15.2%), HNPP (9.1%), CMT1B (8.5%) et CMT2A (4%), impliquant les mêmes gènes que ceux détectés par Murphy (Fridman *et al*, 2015).

De manière générale, environ 30% des patients CMT1 n'ont pas de diagnostic moléculaire, contre 65.6% pour les patients CMT2 (Fridman *et al*, 2015).

Nous allons décrire ci-dessous des exemples de gènes des différentes formes de CMT.

I.1.5.1 PMP22

La duplication d'une région de 1.5-Mb en position 17p12-p11 qui contient le gène *PMP22* explique 60% des cas de CMT1 (van Paassen *et al*, 2014). Le mode de transmission est autosomique dominant.

PMP22 code une protéine de 22kD qui constitue 2 à 5% de la myéline du système nerveux périphérique. Elle est produite par les cellules de Schwann et est exprimée dans la portion compacte de l'essentiel des fibres myélinisées compactées du SNP (Snipes *et al*, 1992). Un rôle au cours de la croissance cellulaire et de la différenciation a été mis en évidence (Snipes *et al*, 1992).

Des variants ponctuels du gène *PMP22* ont également été identifiés dès 1992 et provoquent un CMT1A, confirmant son implication dans la pathologie (Valentijn *et al*, 1992).

Alors que la duplication de la région de 1.5 Mb contenant *PMP22* est caractéristique de **CMT1A** (MIM118220), la délétion de cette région conduit à HNPP.

I.1.5.2 MPZ

MPZ, sur le chromosome 1, est lié à **CMT1B** (MIM118200) ou AD-CMTde-*MPZ*. Le premier variant pathogène a été identifié en 1993 par Hayasaka (Hayasaka *et al*, 1993). Il s'agit de la deuxième cause la plus fréquente de CMTde. La transmission est autosomique dominante, mais quelques cas de transmission autosomique récessive sont rapportés (Warner *et al*, 1996).

MPZ Myelin Protein Zero est le principal composant de la myéline périphérique, à savoir plus de 50% des protéines de la gaine.

Le gène contient 6 exons. A ce jour, 198 variants sont rapportés, dont 89 pathogènes (ClinVar).

I.1.5.3 SH3TC2

SH3TC2 code une protéine exprimée dans les cellules de Schwann des nerfs périphériques, et localisée dans la membrane plasmique et le compartiment de recyclage d'endocytose périnucléaire, suggérant un possible rôle dans la myélination et/ou dans les interactions dans les régions axogliales (Arnaud *et al*, 2009).

Des variants pathogènes de *SH3TC2* ont été identifiées dès 2003, pour être responsables de **CMT4C** (MIM601596) ou AR-CMTde-*SH3TC2* (Senderek *et al*, 2003). Cette atteinte est fréquemment associée à une scoliose et une surdité. Des variants pathogène de ce gène sont plus fréquents chez les tziganes espagnols (Gooding *et al*, 2005). La transmission est autosomique récessive.

A ce jour, 611variants sont rapportés, dont 53 pathogènes (ClinVar).

I.1.5.4 MFN2

MFN2 est responsable de 10 à 30% des cas de **CMTax,** à savoir CMT2A2A (MIM609260), CMT2A2B (MIM617087) ou AD-CMTax-MFN2.

MFN2 code la Mitofusin 2, impliquée dans la fusion cellulaire des mitochondries, et contribue à l'équilibre entre fusion et fission qui détermine la morphologie mitochondriale (Santel *et al,* 2001).

Des variants pathogènes du gène *MFN2* ont été rapportés dès 2004 par Züchner (Züchner *et al,* 2004). La transmission est autosomique dominante.

A ce jour, 328 variants sont rapportés, dont 63 pathogènes (ClinVar).

I.1.5.5 LMNA

Le gène *LMNA* code les lamines A et C, filaments intermédiaires et protéines structurelles de la lamina nucléaire, réseau protéique sous-jacent à la membrane nucléaire interne. Cela permet de déterminer la forme et la taille nucléaire.

Des variants pathogènes du gène *LMNA* ont été rapportés dès 2002 par De Sandre-Giovannoli (De Sandre-Giovannoli *et al,* 2002) pour entraîner CMT2B1 ou AR-CMTax-LMNA. La transmission est autosomique récessive.

A ce jour, 779 variants sont rapportés, dont 192 pathogènes (ClinVar).

I.1.5.6 GJB1

GJB1 code la connexine 32, qui est une gap-junction protéine. Les variants pathogènes entrainent un CMT lié à l'X, CMTX1 ou XL-CMTin-*GJB1*. L'atteinte neurologique peut être démyélinisante ou axonale.

La première description date de 1994 (Ionasescu *et al,* 1994).

A ce jour, 271 variants sont rapportés, dont 180 pathogènes (ClinVar).

I.2 La Surdité

Près de 10% de la population française souffrent de surdité de degré variable (données INSERM). Elle varie en fonction de l'âge, de 1/1000 chez l'enfant de moins de trois ans, à près de 65% après 65 ans.

La surdité est une diminution de l'acuité auditive. On distingue les surdités congénitales, des surdités environnementales (suite à une infection virale par exemple ou suite à une trop forte exposition au bruit). Il est difficile d'évaluer la proportion de surdités génétiques ; nous pouvons uniquement dire que cette proportion varie selon l'âge et qu'elle est présente dans moins de 10% de la population générale.

I.2.1. Description de l'appareil auditif

I.2.1.1 Vue générale de l'appareil auditif

L'appareil auditif est constitué de l'oreille externe, l'oreille moyenne, l'oreille interne et le nerf auditif ou VIIIème paire crânienne (*cf Figure 8*). Les ondes sonores sont captées par le pavillon de l'oreille externe. Elles sont ensuite amplifiées et transmises à l'oreille moyenne par le conduit auditif externe. Ce mouvement du son fait vibrer le tympan. Ces vibrations sont transmises aux osselets (marteau, enclume, étrier) situés dans l'oreille moyenne. L'étrier vient ensuite comprimer le liquide de l'oreille interne. La cochlée est l'organe principal de la perception auditive. Elle renferme environ 20 000 cellules ciliées qui détectent les vibrations du liquide et génèrent l'influx nerveux qui est acheminé vers le cerveau par le nerf auditif *(cf Figure 9).*

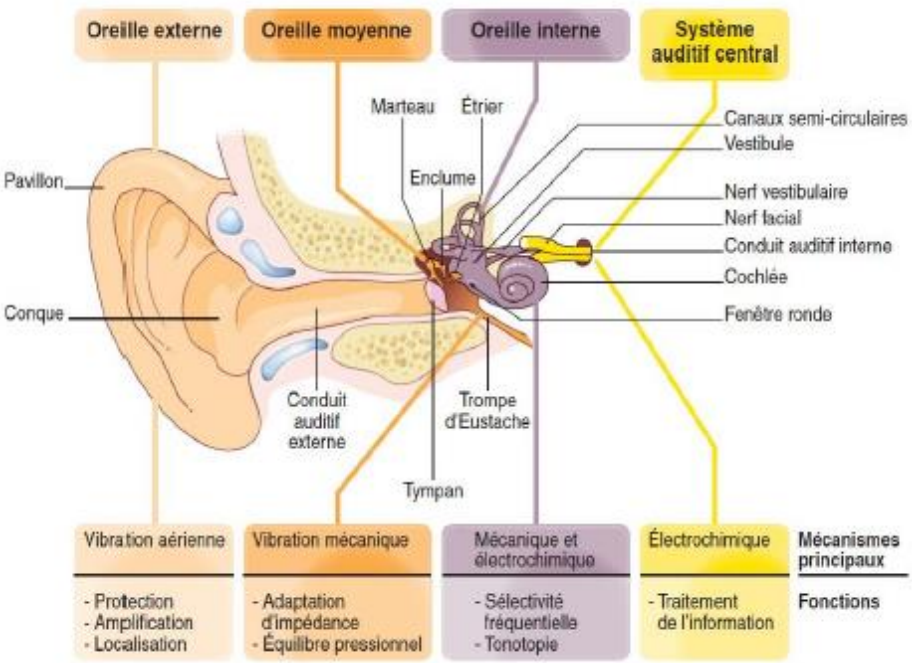


Figure 8: Anatomie et Physiologie du système auditif, d'après Collège Français d'ORL

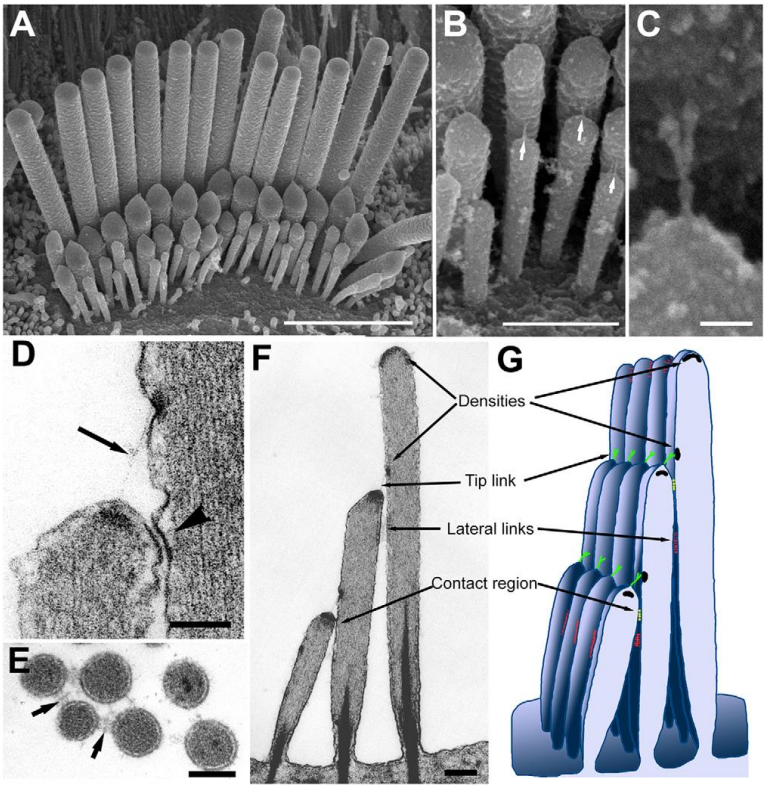


Figure 9: Organisation des cellules ciliées : A) et B) en microscopie électronique cellules ciliées internes de rat; C) sommet de cellule ciliée interne ; D) zone de contact entre cellules ciliées ; E) coupes horizontale de cellules ciliées montrant les filaments latéraux ; F) et G) rangée de cellules ciliées. D'après Hackney et al, 2013

I.2.1.2 Zoom sur l'oreille interne

Le nerf cochléaire fait partie avec les nerfs vestibulaires du nerf auditif ou VIIIème paire crânienne. Ce dernier s'étend de l'oreille interne au tronc cérébral. Il achemine vers les centres les potentiels d'action nés dans le labyrinthe, ou oreille interne. Il est constitué par les neurones des voies cochléaires et des voies vestibulaires. A ces protoneurones afférents sont adjointes des fibres efférentes.

Anatomie

Le nerf VIII mesure 24 mm de long, et se dirige presque transversalement de la fossette latérale du bulbe au conduit auditif interne (*Il est représenté en jaune sur la Figure 10*).

Près du tronc cérébral, les fibres vestibulaires sont postéro-supérieures aux fibres cochléaires, alors qu'elles deviennent postéro-inférieures près du rocher. Les fibres cochléaires et vestibulaires, fusionnées dès l'origine apparente, ne se séparent qu'au fond du conduit auditif interne.

Le nerf auditif traverse l'espace ponto-cérébelleux pour gagner le conduit auditif interne accompagné du VII et du VII *bis* au-dessus, et de l'artère auditive interne.

Le VIII possède une gaine piale propre et un manchon arachnoïdien partagé avec le VII et le VII bis, et élargi en citerne ponto-cérébelleuse.

Le VIII gagne ensuite le conduit auditif interne qui met en communication le labyrinthe avec la fosse cérébrale postérieure, comprenant le paquet acoustico-facial et l'artère auditive interne. Ses parois sont tapissées de dure-mère.

Le VIII se divise alors en nerf cochléaire et nerfs vestibulaires supérieur et inférieur.

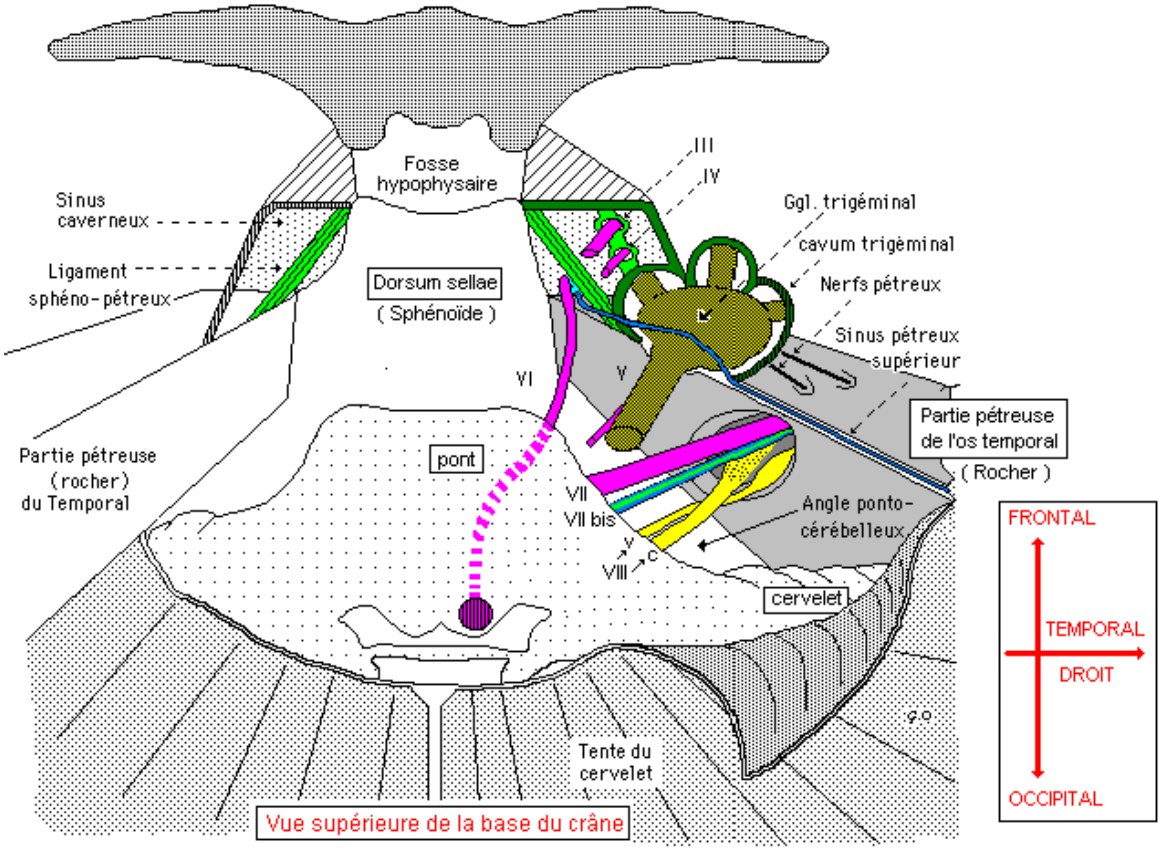


Figure 10: Le nerf cochléaire dans l'angle ponto-cérébelleux de la fosse crânienne postérieure, d'après Outrequin et Boutillier (représenté en jaune)

Le nerf cochléaire se développe au-dessous du nerf vestibulaire et du nerf facial. Il se dirige vers la partie antéro-inférieure du fond du conduit auditif interne, où peuvent se développer les schwannomes de l'acoustique. Il pénètre dans le modiulus, cône osseux de la cochlée ou labyrinthe osseux antérieur. Son enroulement comporte un peu plus de deux tours et demi de spires.

La portion cochléaire du nerf auditif est constituée essentiellement par les axones des protoneurones ou neurones périphériques auditifs. La racine cochléaire du nerf VIII est formée de 30 à 35 000 neurones, à 95% de motoneurones. Les corps cellulaires de ces cellules bipolaires sont situés dans le canal spiral de Rosenthal et forment le ganglion de Corti. Leurs dendrites entrent en rapport avec plusieurs cellules ciliées internes, et leur axone se dirige vers le noyau cochléaire ventral situé dans le tronc cérébral.

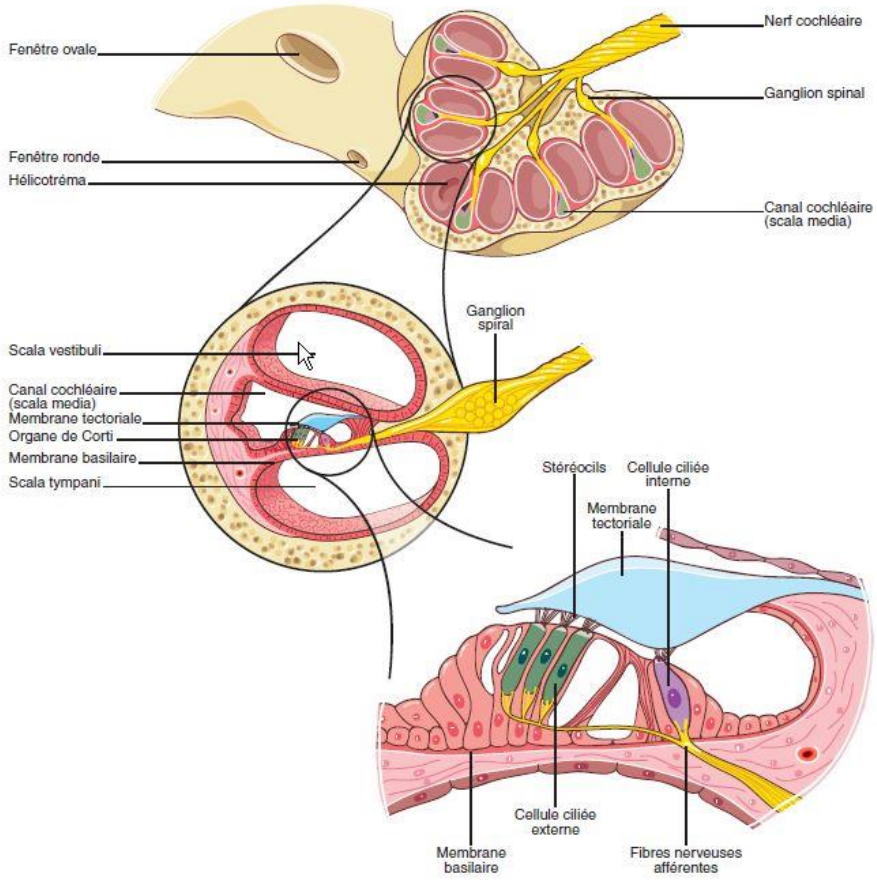


Figure 11: Les fibres nerveuses cochléaires, d'après le Collège Français d'ORL

A ces voies afférentes sont adjointes des fibres efférentes, en provenance du complexe olivaire et de la substance réticulée.

Comme toutes les voies sensorielles et sensitives centrales, mises à part les voies olfactives, les voies cochléaires comportent au moins deux neurones centraux avec un relais thalamique. Les voies sensorielles assurent la transmission des messages depuis les noyaux cochléaires jusqu'au cortex. Il existe un segment ponto-thalamique et un segment thalamo-cortical. L'aire corticale auditive est située dans la première circonvolution temporale, sous la scissure de Sylvius et correspond aux aires 41 et 42 de Brodmann. Les voies cochléaires reflexes comprennent trois voies : la voie d'accommodation auditive qui participe au réflexe stapédien, la voie cochléo-réticulée et les voies réflexes mésencéphaliques.

Les neurones du ganglion spiral sont formés à 95% de neurones de type I myélinisés jusqu'à l'entrée de l'organe de Corti et se lient à une cellule ciliée interne (ratio de 10/1). Les neurones de type II, plus petits et non myélinisés, se dirigent vers la base de la cochlée pour se lier à une dizaine de cellules ciliées externes (ratio 1/10).

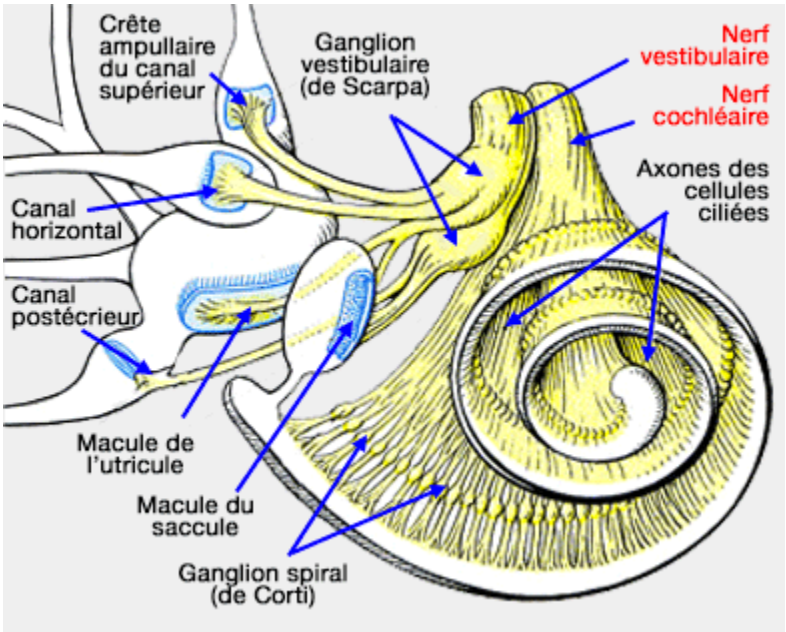


Figure 12: Innervation de l'oreille interne, d'après Krieg

Embryologie

L'oreille interne dérive d'un épaississement de l'ectoderme de surface, la placode otique. Celle-ci se forme de part et d'autre des rhombomères 5 et 6 à la fin de la troisième - début de la quatrième semaine du développement chez l'homme. Elle subit des mouvements d'invagination qui permettent son individualisation par rapport à l'ectoderme de surface. Ces phénomènes génèrent la vésicule otique, primordium de l'oreille interne, qui se met en place à la fin du premier mois de développement. La vésicule otique est régionalisée très précocement selon les axes antéropostérieur, ventrodorsal et médiolatéral. Les neurones des ganglions cochléaire et vestibulaire proviennent de l'épithélium de l'otocyste (*J.-M. Thomassin, P. Barry. Anatomie et physiologie de l'oreille externe. EMC - Oto-rhino-laryngologie 2016;11(2):1-13 [Article 20-010-A-10).*

I.2.2 Physiologie de l'audition

L'organe de Corti comprend les cellules sensorielles et des cellules de soutien. Les cellules sensorielles sont :

- Les cellules ciliées internes, piriformes, en une seule rangée (environ 3500 chez l'homme) le long des deux tours et demie de spire
- Les cellules ciliées externes, rectangulaires, en trois rangées

Chaque cellule ciliée supporte à son extrémité apicale une centaine de stéréocils rangés en taille décroissante de l'extérieur vers l'intérieur. La membrana tectoria couvre les stéréocils situés à l'apex des cellules ciliées, et joue un rôle mécanique important. Le pôle basal des cellules ciliées est le siège de contacts synaptiques avec les fibres de la racine du nerf cochléaire. Les cellules ciliées internes font synapse avec les neurones primaires de la voie auditive qui vont se terminer dans les noyaux cochléaires. Cette innervation est dite afférente. Les cellules ciliées externes font synapse essentiellement avec les neurones issus de la voie efférente cochléaire. Les cellules ciliées internes sont des cellules transductrices : elles traduisent l'information sonore, une variation de pression, en une variation de potentiel intracellulaire qui permettra la libération de neurotransmetteur, tel que le glutamate, à la base de la cellule. Cette libération permet la création d'un potentiel d'action dans les fibres afférentes de la racine cochléaire du nerf VIII. Les cellules ciliées externes sont telles de véritables cellules musculaires capables de moduler la tension entre la lame basilaire et la membrana tectoria *(N. Saroul, F. Giraudet, L. Gilain, T. Mom, P. Avan. Physiologie cochléaire : bases anatomiques, cellulaires et électrophysiologiques. EMC - Oto-rhino-laryngologie 2015;10(4):1-21 [Article 20-020-A-10*).

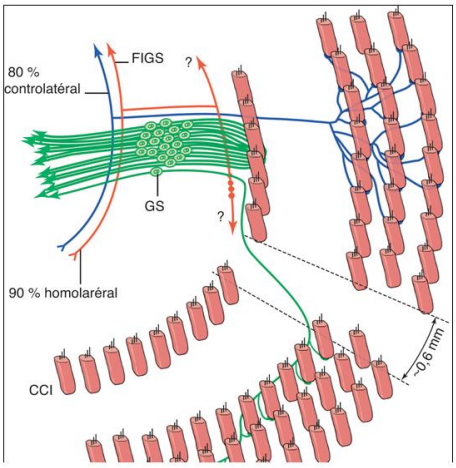


Figure 13 : Schéma de l'innervation horizontale de l'organe de Corti. En vert, les neurones afférents, en bleu, les neurones efférents médians, et en rouge, les neurones efférents latéraux. (GS : ganglion spiral ; FIGS : faisceau intraganglionnaire spiral ; CCE : cellules ciliées externes ; CCI : cellules ciliées internes). D'après EMC

Le degré de surdité est évalué en fonction des critères BIAP (Bureau International d'AudioPhonologie (*cf Tableau 2)*. Une perte totale moyenne est calculée à partir de la perte en dB aux fréquences 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz et 4000 Hz.

SURDITE	DEGRE
Audition normale	< 20 dB
Déficience auditive légère	De 21 à 40 dB
Déficience auditive moyenne	
Premier degré	De 41 à 55 dB
Deuxième degré	De 56 à 70 dB
Déficience auditive sévère	
Premier degré	De 71 à 80 dB
Deuxième degré	De 81 à 90 dB
Déficience auditive Profonde	
Premier degré	De 91 à 100 dB
Deuxième degré	De 101 à 110 dB
Troisième degré	De 111 à 119 dB
Cophose	≥ 120 dB

Tableau 2: Degrés de surdité selon le BIAP

I.2.3 Les différents types de surdité

La grande majorité des surdités est liée à un problème au niveau de l'oreille externe, moyenne et/ou interne et vont se traduire par trois types de surdité :

- Surdité de Transmission
- Surdité de Perception
- Surdité Mixte

Ces mesures de la capacité d'audition sont réalisées grâce à un audiogramme tonal, basé sur la conduction aérienne et la conduction osseuse (*cf Figure 14)*

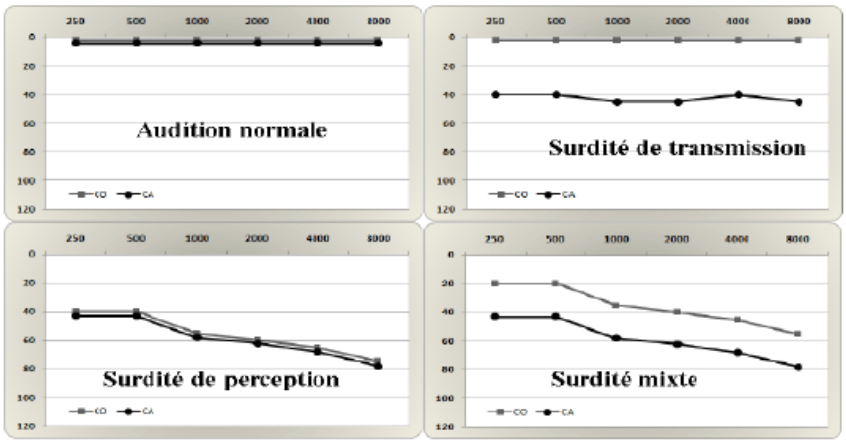


Figure 14: Différents types de surdité en audiométrie tonale, d'après le Collège français d'ORL

On distingue également les surdités stables des surdités progressives.

I.2.3.1 Surdité de transmission

Les surdités de transmission sont liées à une atteinte de l'oreille externe ou à une atteinte de l'oreille moyenne. Le tympan ou le méat auditif externe peuvent être anormaux comme dans les cas des otites chroniques, ou en cas d'exostose ou corps étranger du méat externe. Le tympan peut également être normal dans le cas, par exemple d'otospongiose ou d'ankylose ossiculaire.

La perte auditive est de légère à moyenne.

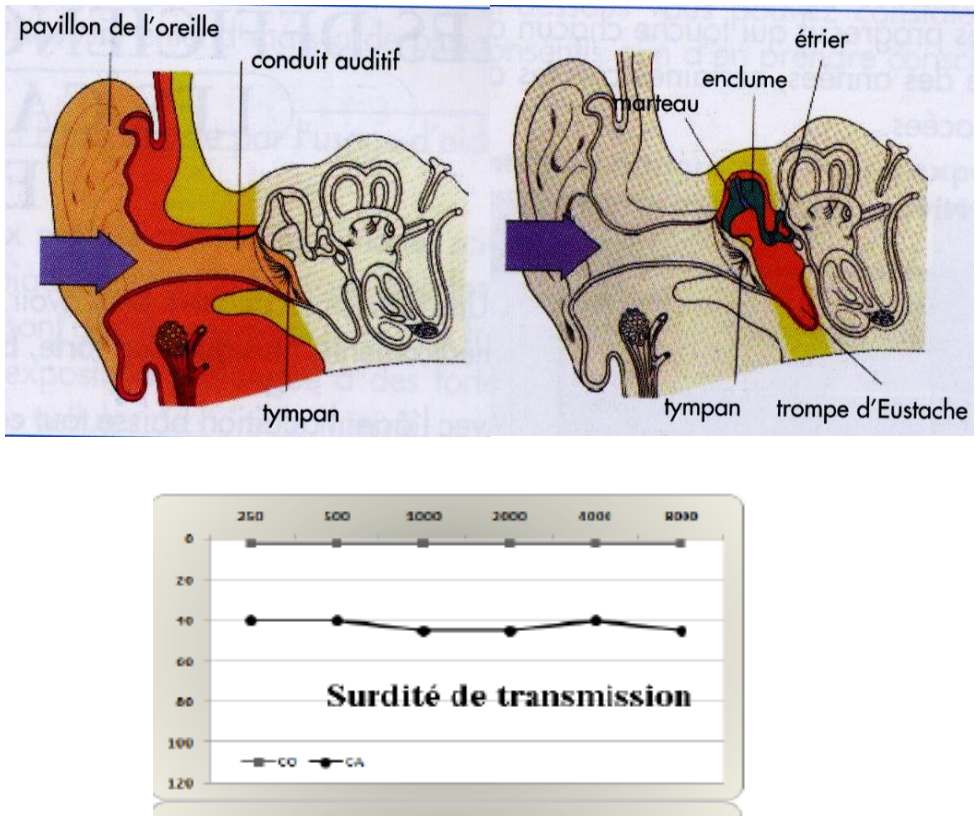


Figure 15: Anatomie et audiogramme correspondant à une surdité de transmission

I.2.3.2 Surdité de perception

Les surdités de perception ou neurosensorielles sont dues au dysfonctionnement de l'oreille interne et traduisent généralement des lésions des cellules ciliées (endocochléaire) ou du nerf auditif (rétrocochléaire).

La perte auditive varie de légère à profonde.

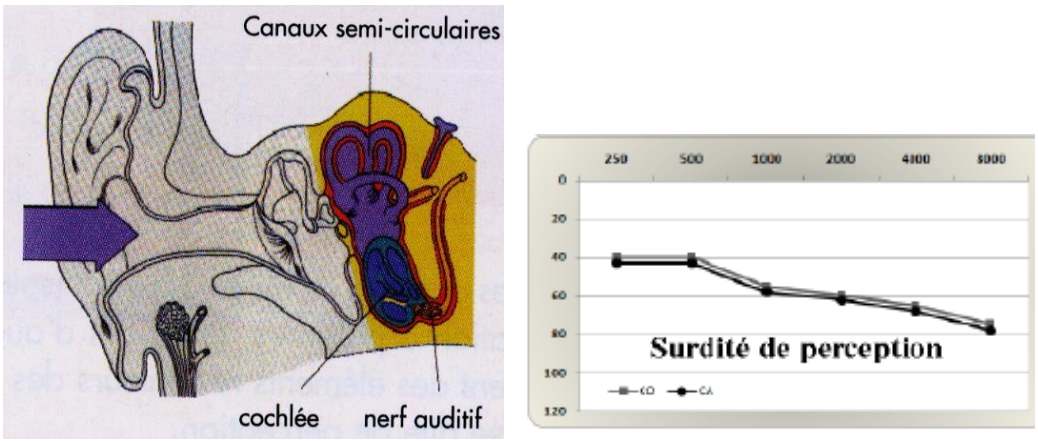


Figure 16: Anatomie et audiogramme correspondant à une surdité de perception

I.2.3.3 Surdité mixte

La surdité mixte relève de problèmes de transmission et de perception, ce qui signifie que l'oreille externe ou moyenne et l'oreille interne sont endommagées. La gravité de ce type de perte auditive peut s'étendre de la perte auditive légère à la perte auditive profonde.

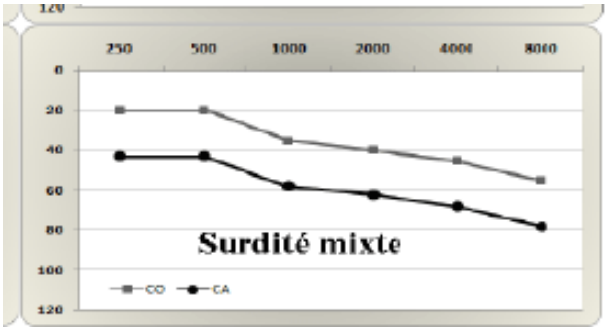


Figure 17: Audiogramme correspondant à une surdité mixte

I.2.4 Les neuropathies auditives

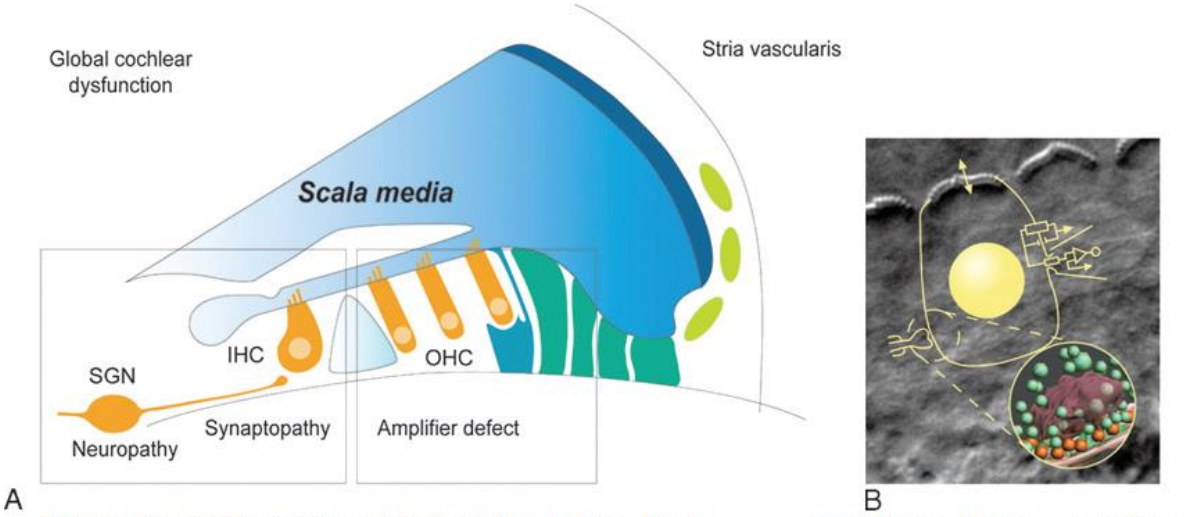
Le diagnostic de désordre du spectre auditif évoquant une neuropathie auditive est posé devant la présence d'une fonction de sélectivité cochléaire normale attestée par la présence d'OtoEmissions Acoustiques (OEA) et/ou d'un potentiel microphonique et d'une altération des Potentiels Evoqués Auditifs (PEA). Les réflexes stapédiens sont absents. Comme cela a été rapportée par Starr *et al* en 1996, les enfants ou de jeunes adultes se plaignant d'une mauvaise intelligibilité, notamment dans le bruit avec une grande discordance entre leurs seuils auditifs en audiométrie tonale liminaire et leur performance vocale, sont évocateurs de neuropathie auditive (Starr *et al*, 1996). Une fatigabilité auditive est également présente. Il existe une désynchronisation des fibres auditives.

L'étiologie chez l'enfant et l'adulte est dominée par les atteintes neurologiques dégénératives, telles que la maladie de Charcot-Marie-Tooth, la sclérose en plaque, la maladie de Friedreich ou le syndrome de Morh-Trajenberg. Les surdités des nouveaux-nés hospitalisés en réanimation (jusqu'à 25%), les aplasies ou dysplasies du nerf cochléaire, l'association aux accès fébriles ou bien l'atteinte présynaptique en cas d'anomalie de l'otoferline ont été rapportés. Les

neuropathies auditives représenteraient approximativement 10 % des surdités congénitales et une part encore inconnue des surdités de l'adulte.

L'IRM cérébrale et des angles pontocérébelleux est indispensable.

A ce jour, la physiopathologie est peu connue. Les synaptopathies sont une nouvelle voie de recherche à présent, puisque le déficit peut être localisé soit à la jonction cellule ciliée-synapse, soit au niveau du nerf auditif. L'implant cochléaire est en général efficace mais les résultats moindres par rapport aux surdités endocochléaires (*T. Mom, Y. Pavier, M. Puechmaille, N. Saroul, L. Gilain, P. Avan. Neuropathies auditives. EMC - Oto-rhino-laryngologie 2015;10(3):1-8 [Article 20-183-D-10).*



Physiology-based classification of sensorineural hearing loss. Defects or loss of outer hair cells (OHC) disrupt cochlear amplification, defects or loss of inner hair cells (IHC) or their synapses disrupt synaptic encoding of sound, defects or loss of spiral ganglion neurons (SGN) disrupt encoding and/or conduction of auditory information. Defects of cochlear electrolyte homeostasis or mechanoelectrical transduction cause global dysfunction.

Normaski image of the mouse organ of Corti with hair bundles of IHCs and schematic representation of a patch-clamped IHC and one of its ribbon synapses. Inset: model of a normal mouse IHC ribbon synapse obtained from electron tomography.

Figure 18: Synaptopathie auditive génétique d'après Moser, Predoehl, Starr, 2013

I.2.5 Les surdités génétiques

En 2018, plus de 100 gènes sont identifiés comme responsables de surdités isolées et plus de 150 de surdités syndromiques. Le trois quarts des surdités prélinguales sont d'origine génétique.

Les surdités génétiques sont dans la grande majorité des cas des maladies monogéniques. Cependant, un même gène peut être responsable d'une surdité

autosomique récessive et/ou autosomique dominante et/ou d'une surdité syndromique.

Les surdités syndromiques représentent 10 à 15% des surdités de l'enfant. En raison du très grand nombre de syndromes rares avec surdité, toute pathologie malformative chez l'enfant doit faire pratiquer un bilan auditif systématique.

Les surdités non syndromiques sont autosomiques récessives dans 90% des cas. Les formes dominantes (8 %) sont caractérisées par une surdité le plus souvent progressive ou d'apparition retardée, au cours de l'enfance ou à l'âge adulte (*S. Marlin, F. Denoyelle. Surdités génétiques. EMC - Oto-rhino-laryngologie 2016;11(3):1-9 [Article 20-191-A-10).*

Nous allons présenter quelques exemples de gènes responsables de surdité non syndromique avec différentes formes de transmission.

I.2.5.1 Les surdités non syndromiques

I.2.5.1.1 *GJB2 et GJB6*

La connexine 26 est exprimée dans de nombreuses jonctions communicantes à l'intérieur de l'organe de Corti et de la paroi latérale de la scala media. La connexine 26 est codée par le gène *GJB2* qui se situe sur le locus DFNB1. 30 à 40% des surdités profondes génétiques autosomiques récessives non syndromiques s et 30 % des cas sporadiques congénitaux de surdité profonde ont causées par des variants pathogènes de *GJB2* en France. Dans cette forme de surdité, la déficience auditive est congénitale, progressive dans 20 % des cas, de tous degrés de sévérité, mais dans deux tiers des cas sévère ou profonde, avec des courbes audiométriques plates ou descendantes. L'imagerie des rochers et les épreuves vestibulaires caloriques sont normales.

Le variant pathogène 35 delG correspond à plus de 70 % de tous les varaints pathogènes de *GJB2*. Les porteurs hétérozygotes sont très fréquents dans la population française, entre 2,5 et 4%.

Certains patients sourds hétérozygotes pour un variant intragénique de *GJB2* portent également une délétion sur l'autre allèle emportant un élément régulateur de *GJB2* et une partie du premier exon du gène *GJB6* localisé de façon adjacente sur le chromosome 13.

La connexine 30 est exprimée de manière abondante dans le cerveau et la cochlée (Lautermann *et al*, 1998). La délétion rapportée de 342kb est présente avec une fréquence plus importante en France, Espagne et Israël (del Castillo *et al*, 2003). Le pourcentage d'hétérozygotes *GJB2* non résolus chute de 16 à 20.9% après recherche de la délétion de *GJB2*. Un digénisme est donc évoqué.

I.2.5.1.2 *COCH*

Un exemple de gène lié à une surdité de transmission autosomique dominante est *COCH,* responsable de DFNA9. Le phénotype est caractérisé par une surdité débutant à l'âge adulte et progressive, associée à une atteinte vestibulaire variable. Le diagnostic différentiel peut être la maladie de Ménière. La transmission est autosomique dominante et la pénétrance variable.

Manolis *et al* ont décrit des dépôts mucopolysaccharides dans les canaux cochléaires et les nerfs vestibulaires, entrainant la dégénérescence des fibres dendritiques (Manolis *et al,* 1996).

La cochline constitue 70% de toutes les protéines de l'oreille interne (Ikezono *et al*, 2001).

I.2.5.1.3 *PRPS1*

Le gène *PRPS1*, localisé sur le chromosome X, code la phosphoribosylpyrophosphate synthetase qui catalyse la phosphoribosylation du ribose 5-phosphate en 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate, nécessaire aux voies de synthèse de la purine et de la pyrimidine.

La surdité isolée liée à X liée à *PRPS1* ou DFNX1, entraine une surdité le plus souvent post-linguale, progressive, sévère à profonde chez les hommes (Tyson *et*

al, 1996 ; Liu *et al*, 2010). Les femmes peuvent également développer une surdité légère à moyenne, de survenue plus tardive.

De façon étonnante, ce gène, selon le variant qui le touche, peut conduire à des surdités non syndromiques, mais également à des surdités syndromiques :

- Maladie de Charcot-Marie-Tooth liée à X type 5 (CMTX5), avec neuropathie périphérique, surdité neurosensorielle et atteinte ophtalmologique
- Syndrome Arts, avec retard mental, hypotonie précoce, ataxie, retard de development moteur, surdité et atrophie optique
- PRPS1 superactivité, avec hyperuricémie, anomalies neurodéveloppementales, et surdité neurosensorielle

Nous allons à présent décrire brièvement quelques exemples de surdités syndromiques.

I.2.5.2 Les surdités syndromiques

I.2.5.2.1 *SOX10*

Le gène *SOX10* est impliqué dans le syndrome de Waardenburgh type 2E (hypogonadisme hypogonadotropique avec anosmie et surdité, +/- hypopigmentation) (Bondurand *et al*, 2007 ; Pingault *et al*, 2013) et 4C (surdité, anomalie pigmentaire, maladie de Hirschsprung) (Pingault *et al*, 1998), et aussi le syndrome PCWH (*Peripheral Demyelinating Neuropathy, Central Dysmyelination, Waardenburg Syndrome, and Hirschsprung Disease pouvant être associé à un retard de croissance, hypotonie néonatale et arthrogrypose)* (Touraine *et al*, 2000). La surdité est très variable tant au niveau des degrés, que de la symétrie, tout comme la pénétrance intrafamiliale. Le mode de transmission est autosomique dominant.

SOX10 est un facteur de transcription jouant un rôle dans le développement de la crête neurale et des oligodendrocytes (Pusch *et al*, 1998).

Des variants pathogènes de *SOX10* et *EGR2* empêchent l'activation du promoteur de *GJB1*, impliqué dans CMTX1, et participent ainsi au phénotype de NP (Bondurand *et al*, 2001).

I.2.5.2.2 *SLC26A4*

Le gène *SLC26A4* ou *PDS* code la pendrine, un transporteur d'anions, et est responsable en cas de variant pathogène du syndrome de Pendred. La transmission est autosomique récessive. Le phénotype est caractérisé par une surdité avec anomalie de l'oreille interne, telle que dilatation de l'aqueduc du vestibule, et goître thyroïdien (Everett *et al*, 1997).

Une perte de fonction est la cause directe de la pathologie thyroïdienne, d'autant plus que le gène *SLC26A4* est exprimé de manière importante dans la thyroïde (Everett *et al*, 1997).

I.2.5.3 Gènes des neuropathies auditives

A l'heure actuelle, peu de gènes de neuropathies auditives ou de synaptopathies sont connues, à savoir *OTOF*, *DIAPH3*, *PJVK* et *OPA1*. Nous allons ici présenter deux exemples.

I.2.5.3.1 *OTOF*

L'otoferline serait impliquée dans le trafic vésiculaire présynaptique des cellules ciliées internes. Elle interagit avec les protéines SNARE et SNAP25. Les variations pathogènes de ce gène sont responsables d'une surdité de perception d'emblée profonde, prélinguale avec des otoémissions acoustiques éventuellement conservées pendant les premiers mois de vie : DFNB9 (Chaib *et al*, 1996). Chez d'autres patients la surdité est dépendante de fièvre, avec apparition d'une surdité profonde lors des épisodes fébriles (Marlin *et al*, 2010). La transmission est autosomique récessive.

Un variant pathogène de ce gène, Q829X, est récurrente et fréquente en Espagne (Migliosi *et al*, 2002). En France, 3 % des surdités profondes isolées congénitales sont dues à ce même variant homozygote (Jonard *et al*, 2011).

I.2.5.3.2 *DIAPH3*

DIAPH3 appartient à la famille des formines. Ces protéines remodèlent le cytosquelette en favorisant la nucléation et l'élongation des filaments d'actine. Elles peuvent aussi se lier aux microtubules et les stabiliser.

L'atteinte du gène *DIAPH3* entraine une neuropathie auditive autosomique dominante de type 1, AUNA1. La transmission est autosomique dominante.

Sur le modèle murin, il a été mis en évidence un gonflement du pôle apical des cellules ciliées internes, pouvant être à l'origine d'une perte de méchanotransduction et ainsi de la neuropathie auditive (Schoen *et al*, 2013).

I.3 Neuropathies périphériques génétiques et surdité

La surdité a été décrite chez 5% des patients suivis pour CMT (Gillepsie *et al*, 2013), alors qu'elle est de 10% dans la population française (toutes causes confondues). Or, cette fréquence augmente avec l'âge, puisqu'elle est de 1/1000 chez le jeune enfant, 1/500 en fin d'adolescence, 1/5 à partir de 50 ans, et supérieure à 50% après 65 ans.

Elle peut être endocochléaire et/ou rétrocochléaire avec des neuropathies auditives décrites (Butinar *et al*, 2008).

La pathogénicité de la surdité des patients CMT est incertaine, et l'hypothèse d'un dysfonctionnement rétrocochléaire reste le plus souvent évoqué (Anzalone *et al*, 2018).

Il est supposé que la surdité profonde résulte d'une désynchronisation du nerf cochléaire.

La surdité de perception peut être concomitante, précéder ou suivre la neuropathie périphérique. Elle peut être progressive. Les degrés de surdité varie de légère à profonde.

Les acouphènes sont rarement décrits.

Les syndromes vestibulaires sont également très peu rapportés (Butinar *et al*, 2008).

Peu d'études rapportent la prise en charge de ces surdités, qui est souvent tardive. L'implantation cochléaire a été fructueuse dans trois cas : chez un patient CMT sans information sur la NP ou la surdité (Anzalone *et al*, 2018) ; chez un patient avec CMT et neuropathie auditive (Goswamy *et al*, 2012) ; chez un patient avec atteinte endo et rétrocochléaire et présentant un variant pathogène ponctuel de *PMP22*, c.193G>T, p.(Val65Phe) (Postelmans *et al*, 2006). L'implant cochléaire peut permettre la reconstitution d'une activité neuronale synchrone par le biais de l'électrostimulation, et ainsi améliorer les scores de discrimination vocale. Cependant, comme dans le cas des neuropathies auditives, la progression des

résultats audiométriques de compréhension et d'intelligibilité est plus lente que chez d'autres patients implantés ayant une anomalie intracochléaire. Les patients décrivent au final un bénéfice significatif.

En reprenant les données de la littérature, nous retrouvons **36** gènes de NP impliqués dans la surdité. Ils sont tous présents sur le panel NGS CMT que nous avons utilisé (*cf Paragraphe II.2 de la thèse*). Il s'agit de 14 gènes de CMT, 4 gènes de HMN, 2 gènes de HSN et 14 autres gènes de neuropathies périphériques autres, le plus souvent syndromiques (*Figure 19 et Tableau 3*).

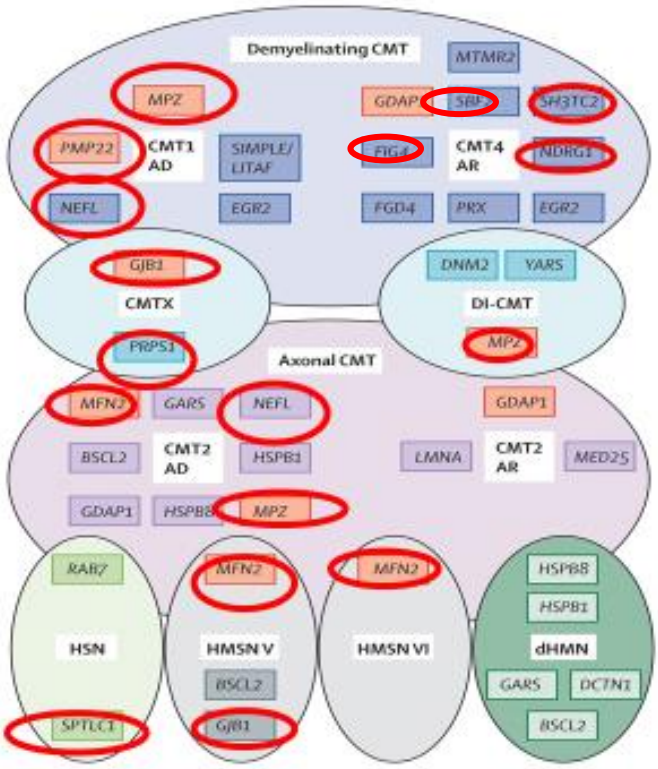


Figure 19: Encerclés en rouge, les gènes d'intérêt pour NP et surdité parmi les 36 gènes de NP et surdité et leur répartition parmi les différentes formes de NP ; Schéma issu de The Lancet

Page suivante :
Tableau 3 : Liste des 36 gènes impliqués dans NP et surdité. Le type de neuropathie est précisé pour chaque gène. (D : Dominant ; R : Récessif ; XL : lié à l'X

GENE	CMT1 D	CMT2D	CMT1 R	CMT2 R	HMN D	HMN R	HSN D	HSN R	DIVERS
AARS		X							
ABHD12									R
AIFM1				X					
DNMT1							X		
FIG4			X		X				
GBE1									R
GJB1	X	X							
GJB3									D/R
GLA									XL
DNAJB2				X					
INF2	X	X							
KIF5A									D
MFN2		X							
MPZ	X	X	X						
MYH14									D
NDRG1			X						
NEFL	X	X							
PDK3		X							
PEX12									R
PEX7									R
PHYH									R
PMP22	X								
POLG									D/R
PRPS1				X					
SBF2			X						
SCN9A								X	
SETX					X				
SH3TC2			X						
SLC5A7					X				
SLC25A46									R
SOX10									D
SPTCL1							X		
SURF1			X						
TRPV4		X			X				
TTR									D
TYMP									R

Une surdité n'est pas systématiquement associée avec ces gènes de NP. Les rares informations retrouvées dans la littérature, ne concernent que quelques gènes. Ainsi, la surdité est rapportée dans de rares cas de variants pathogènes *PMP22,* que ce soit des duplications, délétions ou variants ponctuels, alors que *PMP22* explique 60% des cas de CMTde (Anzalone *et al,* 2018). Pour *MPZ,* la surdité est rapportée dans 22% des cas (Sanmaneechai *et al,* 2015). Sur 242 variants rapportés de *MPZ,* seuls 18 sont associés à la surdité (De Jonghe *et al*, 1999; Misu *et al*, 2000; Starr *et al,* 2003; Kilfoyle *et al*, 2006; Kabzi´nska *et al*, 2007, Duan *et al*, 2016; Sanmaneechai *et al,* 2015). Dans le cas de *SH3TC2*, la surdité est plus fréquente et présente dans près de la moitié des cas (Yger *et al,* 2012). Pour *NEFL,* gène responsable de 1% des cas de CMT, 35 variants sont décrits à l'heure actuelle parmi 173 patients CMT. Seuls six variants parmi 17 patients ont été décrits associés à la surdité, soit une incidence de 9.82%.

La surdité rapportée chez les patients NP est très probablement sous-estimée, comparée aux 10% de surdités toutes confondues dans la population française. La différence de prévalence de la surdité entre notre population étudiée de NP et celle de la population générale est donc surprenante. On pourrait s'attendre à une fréquence au moins proche. Cela peut être lié à une non-évaluation de l'audition des patients NP. Il faut aussi prendre en compte l'âge de ces patients.

Ces protéines connues des CMT et NP sont localisées le long de la gaine de myéline, le long de l'axone, dans la mitochondrie, dans l'enveloppe nucléaire…(OMIM).

Peu d'informations sur la localisation de ces protéines au niveau cochléaire ont été rapportées. MPZ a été détectée dans l'organe de Corti, dans le ganglion spiral, et une partie du nerf auditif au niveau du modiolus (Cao *et al,* 1995). PMP22 est également exprimée dans la cochlée (Robertson *et al,* 1994). Or, il a été établi des interactions entre PMP22 et MPZ dans la formation et le maintien de la gaine de myéline (D'Urso *et al,* 1999). Cependant, il n'existe pas d'information sur

l'expression protéique des autres gènes au niveau cochléaire, ou bien sur d'éventuelles interactions protéiques.

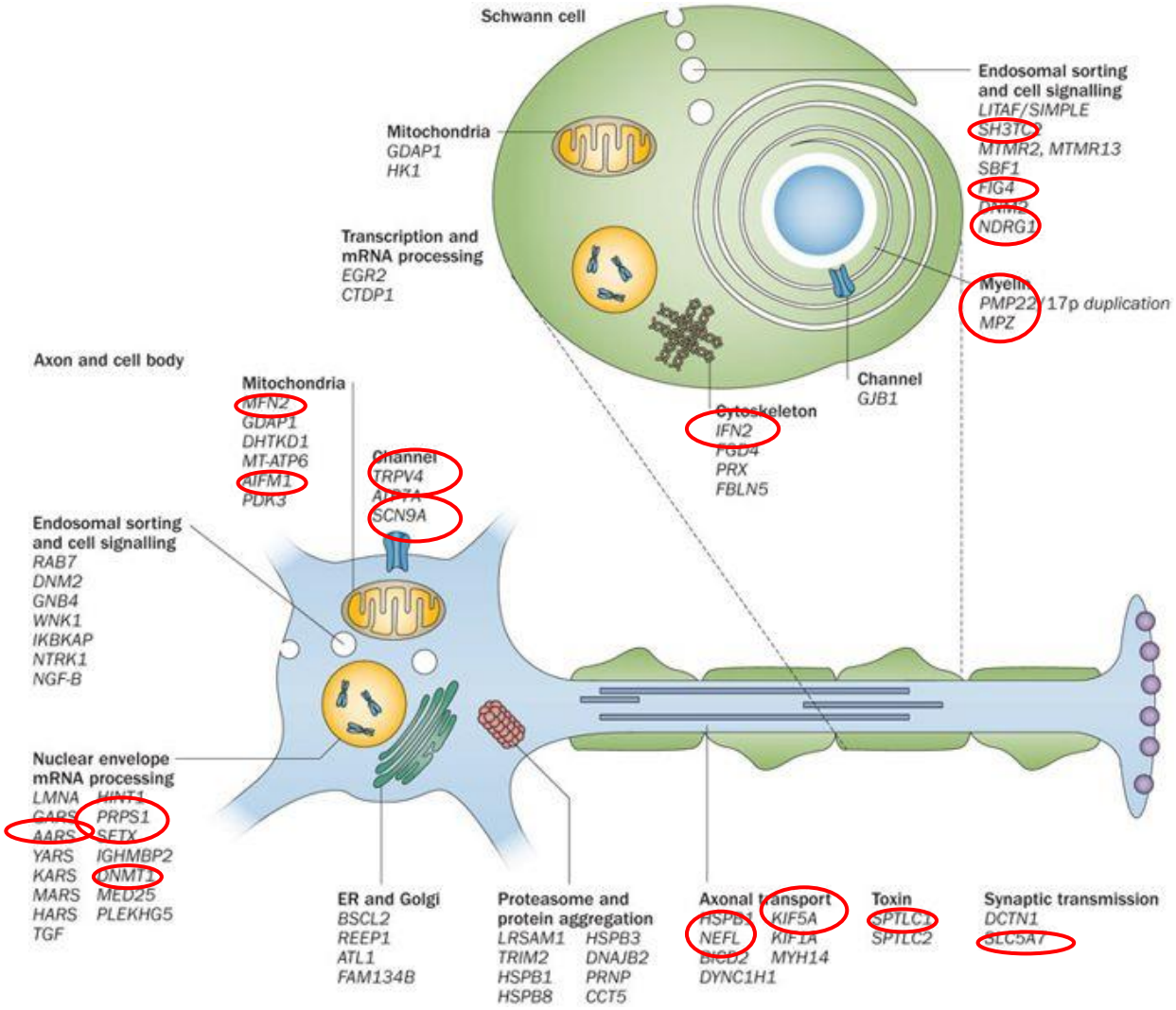


Figure 20: Localisation des protéines impliquées dans NP et surdité au niveau de la cellule de Schwann et de l'axone et du corps cellulaire. Schéma issu de Rossor et al, 2013

I.4 Objectifs

Mon objectif principal était d'étudier les neuropathies périphériques associées à des surdités, afin de mieux comprendre leurs causes et leurs mécanismes physiopathologiques.

J'ai pu travailler sur une cohorte française de 3412 patients NP, dont l'ADN était disponible au CHU de Limoges. Moins de 2% d'entre eux avaient une surdité de perception rapportée. J'ai concentré mon étude sur ce groupe de patients NP+surdité.

Plusieurs questions se posaient :

- Pourquoi certains patients avec NP sont atteints de surdité et pas d'autres?
- Quels sont les types et les degrés de surdité chez ces patients?
- Quels gènes sont responsables de la NP ? Sont-ils également responsables de la surdité ?
- Ces deux pathologies sont-elles liées ou intercurrentes ? En effet le nerf cochléaire est un nerf composé à 95% de fibres de type I myélinisées. Les deux pathologies évoluent-elles de manière concomitante ou bien indépendamment l'une de l'autre ?
- Existe-t-il des atteintes vestibulaires, pouvant entrer dans le cadre d'une atteinte du nerf cochléo-vestibulaire dans sa globalité ?

Nous nous sommes donc attachés, à partir de cette cohorte française de 3412 patients suivis pour NP génétique, à :

1) Déterminer le phénotype des patients atteints à la fois de NP et Surdité
2) Déterminer le génotype de ces patients à l'aide d'un séquençage NGS ciblé afin de déterminer les gènes impliqués et leur prévalence. Par séquençage d'exomes, de nouveaux gènes impliqués dans ce phénotype ont été recherchés (pour une famille). La question d'un génotypage exhaustif s'est également posée.

3) Etablir des corrélations phénotype-génotype dans cette population afin d'apporter une aide au diagnostic et à la prise en charge clinique, voire thérapeutique.
4) Réaliser une étude protéique (virtuelle et réelle):
    a. Quels sont les liens entre les différentes protéines impliquées à la fois dans NP et Surdité ?
    b. L'atteinte auditive chez les patients NP, est-elle rétro et/ou endocochléaire ?

Les résultats obtenus sont présentés sous formes d'articles. Un article a été publié dans *Journal of the Peripheral Nervous System*, les autres sont en cours de soumission. Une communication affichée a été réalisée à ESHG (European Society of Human Genetics) à Copenhague, Danemark en 2017. Des communications orales ont été faites à IFOS (International Federation of Otorhinolaryngology Societies) 2017 à Paris, à la SFORL (Société Française d'ORL) 2018 à Paris, et à la Journée Nationale des Surdités Génétiques 2018 à Paris (Filière SENSGENE).

II. MATERIELS ET METHODES

II.1 Matériels

Nous sommes partis de la base de données du Centre de Référence Maladies Rares, Neuropathies Périphériques Rares, au CHU de Limoges. Ce CRMR dirigé par les Professeurs Magy et Vallat, travaille en étroite collaboration avec la Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire du CHU de Limoges et également l'équipe EA6309, Maintenance Myélinique et Neuropathies Périphérqiues de l'Université de Limoges.

Ainsi, une base de données de 3412 patients atteints de NP d'origine génétique a été exploitée. J'ai recherché parmi ces phénotypes, la présence de surdité, et ai effectué l'analyse de tous les dossiers cliniques qui en découlait. Les médecins référents ont été contactés au niveau national, afin de colliger le maximum d'informations cliniques et paracliniques.

L'atteinte neurologique était évaluée à partir des données cliniques des dossiers médicaux et des résultats des EMG.

La surdité était également évaluée à partir des données cliniques des dossiers médicaux, des audiogrammes tonaux et vocaux existants, voire des PEA. Avec l'aide des médecins référents répartis sur le territoire français, quelques audiogrammes réalisés au cours de ces trois dernières années ont pû être analysés. Tous les patients suivis au CHU de Limoges ont été contactés par téléphone et courrier. Lorsque les patients étaient enclins à une consultation ORL, je les ai examinés et nous avons réalisé une audiométrie tonale et vocale, une impédancemétrie, des OEA et PEA.

II.2 Next Generation Sequencing (NGS)

II.2.1 Principes du NGS

Le Next Generation Sequencing (NGS) est un ensemble de méthodes apparues à partir de 2005, produisant des millions de séquences (jusqu'à 10^{12} nucléotides séquencés) en une seule expérience ou « run » et à faible coût. La durée des expériences est moindre en comparaison au séquençage Sanger puisque le NGS permet d'amplifier spécifiquement un fragment d'ADN isolé, de manière parallèle, car des millions de réactions ont lieu en même temps, avec des fragments séquencés courts, de 100 à 450 pb par les séquenceurs NGS de première génération.

L'analyse bioinformatique qui en résulte est considérable, du fait du nombre très important de données obtenues.

II.2.2 Réalisation du NGS

Les principales étapes de la réalisation du séquençage Haut-Débit sont :

- La réalisation de la librairie ou « enrichissement »
- Le séquençage
- L'analyse des données brutes

L'intérêt de l'enrichissement ciblé est de séquencer des régions d'intérêt, de diminuer le coût, et d'avoir une analyse simplifiée.

Deux stratégies de fabrication de la **librairie** existent :

- La Capture consiste en l'hybridation de l'ADN à des sondes couvrant la région cible et le lavage de l'ADN non hybridé, avec par exemple :
    - Préparation de la librairie de l'ADN génomique (fragmentation, ligation d'adaptateur avec barcodes, qui sont des petites séquences de 6 ou 8 bases permettant de multiplexer plusieurs échantillons lors du séquençage)
    - Hybridation des librairies avec les sondes ARN complémentaires biotinylées

    - Récupération des hybrides avec les billes magnétiques ou streptavidine
    - Lavage et dégradation des sondes ARN
- L'Amplicon consiste en l'amplification des régions d'intérêt par PCR
    - Préparation d'un ou plusieurs pools d'amorces et amplifications PCR ciblées
    - Ligation des adaptateurs et barcodes
    - Amplification finale

Via ces deux approches, les ADN ciblés ont été récupérés et il reste à les séquencer. Plusieurs séquenceurs existent actuellement sur le marché. Au CBRS de Limoges, c'est le séquenceur « Proton » qui était présent lors de ma thèse. Le détail de la stratégie de séquençage utilisé est présenté *Figure 21* et dans le paragraphe II.2.3.

Le **séquençage** est alors basé sur la détection des protons lors de l'élongation des brins à séquencer.

Nous avons également eu accès à deux séquenceurs d'Illumina, un NextSeq sur la faculté des Sciences de Limoges et un miniseq en collaboration avec l'équipe du laboratoire de Génétique Moléculaire (UM EA 7402) de IURC de Montpellier.

L'**analyse bio-informatique** permet à partir des données brutes puis filtration et retrait des données de mauvaise qualité, d'aligner les séquences sur le génome de référence et ainsi détecter les variants. Les variants pathogènes et les polymorphismes sont alors analysés. La profondeur de lecture, c'est-à-dire le nombre de lecture de chaque base exprimée en X, et la couverture, c'est-à-dire la zone couverte par au moins une lecture et exprimée en %, permettent d'évaluer la qualité du séquençage. Les trous ou « gaps », parties du génome non séquencées, peuvent donc être identifiés.

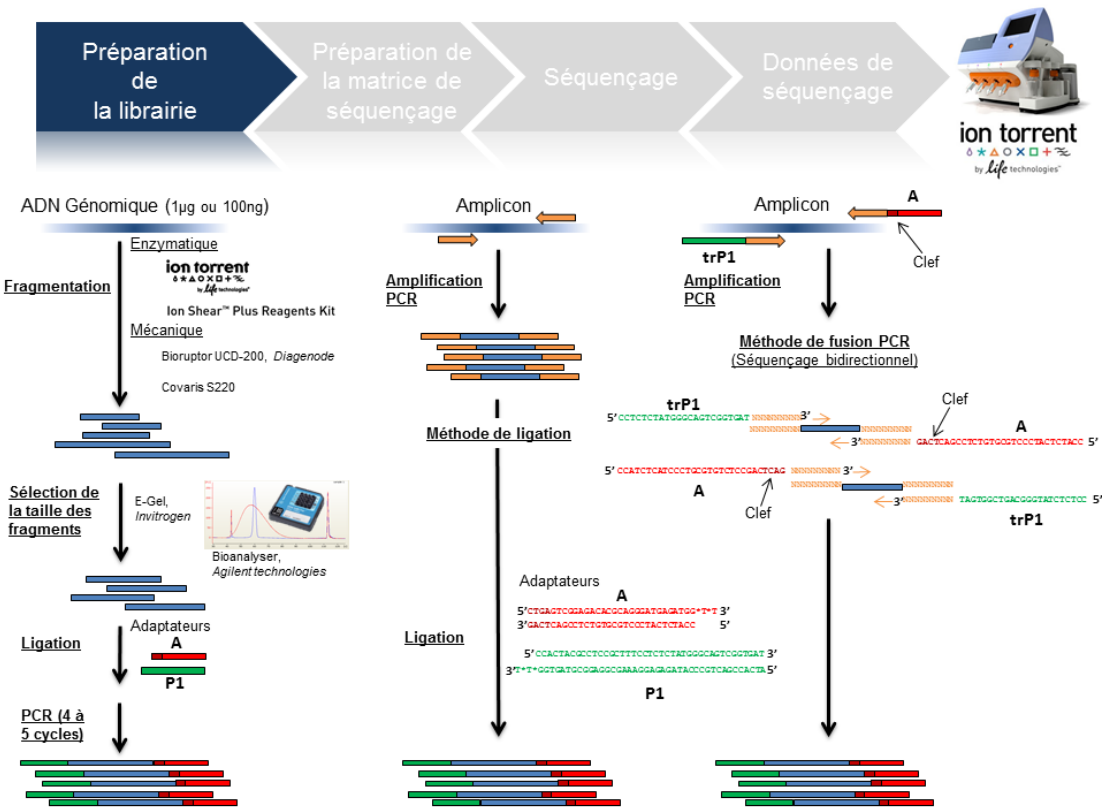


Figure 21: Principes du NGS avec Ion torrent

II.2.3 Choix du NGS pour notre étude

Pour notre étude, nous avons utilisé la technologie Ampliseq (Life Tech) et le séquenceur « Proton » pour la majorité de notre étude, mais également la technologie Roche 454, de la société "*454 Life Sciences*" (Connecticut - USA) et les séquenceurs NextSeq et Miniseq (Illumina).



Figure 22 : a) Séquenceur Proton (Life Tech) ; b) Séquenceur Miniseq (Illumina) ; c)Séquenceur NextSeq (Illumina)

Le Proton séquence en routine des librairies préparées à l'aide d'un panel ampliseq de 126 gènes de NP dont 92 gènes CMT, ce qui correspond à 3491 couples d'amorces nécessaires pour une couverture de 736 515 pb (736,5kb), soit environ 98% des 126 gènes couverts, et une profondeur moyenne de lecture de 1400 reads par amplicons.

Le Miniseq utilisé à Montpellier a permis de séquencer des librairies préparées via la technique de capture avec un panel de 63 gènes de surdité.

Pour l'analyse d'exomes, nous avons utilisé un NextSeq d'Illumina et la stratégie de capture d'exomes de la société Roche. 223775 sondes ont ciblé 25586 gènes au total.

II.2.4 Contraintes du NGS

Les contraintes sont tout d'abord techniques :

Le Proton pose le problème des homopolymères, notamment en cas de répétition de cinq ou plus bases (Ari *et al*, 2016), et ainsi des erreurs de séquençage peuvent apparaître. Aucune solution n'existe actuellement pour pallier ce problème avec ce séquenceur.

Avec les séquenceurs Illumina, ce problème ne semble pas ou peu exister. Pour ces 2 grands types de séquenceurs, les grands remaniements sont difficiles à attraper. Les séquenceurs de 3^{e} génération, séquençant de très longs fragments d'ADN permettront de résoudre ce problème.

Les autres contraintes sont informatiques :

La charge de travail bio-informatique est considérable, compte tenu du nombre de variants mis en évidence pour un patient (exemple environ 600 sur le panel CMT). Les expériences mettent en effet moins de temps que des milliers de

séquençage Sanger, mais la quantité de variants obtenus et les difficultés d'interprétation doivent être prises en compte. Ainsi, les nombreux SNP (Single Nucleotide Variant) ou CNV (Copy Number Variant) doivent également être analysés. Les bases de données et les logiciels, tels que Alamut Mutation Interpretation Software (Interactive Biosoftware, Rouen, France), Polyphen-2, SIFT, UMD-Predictor (umd-predictor.eu/), ExAC Genome browser (http://exac.broadinstitute.org), gnomAD browser (gnomad.broadinstitute.org/), dbSNP135 (National Center for Biotechnology Information [NCBI], Bethesda, Maryland, USA, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/), ClinVar (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar), HGMD professional (www.hgmd.cf.ac.uk), MutationTaster (www.mutationtaster.org), ou LOVD (http//databases.lovd.nl/), sont donc primordiaux à l'interprétation et l'enrichissement de ces dernières.

Le NGS permet également l'étude du transcriptome avec identification des sites de transcription et d'épissage (non utilisée lors de cette étude).

Les séquenceurs NGS de dernière génération (PacBio) permettent dorénavant le séquençage et la cartographie des génomes, ce qui permettra de détecter des variations introniques, intergéniques ou les remaniements complexes potentiellement responsables de maladies héréditaires.

Au cours de cette étape de l'étude, j'ai effectué l'analyse bio-informatique des données du NGS-NP. Une relecture par deux experts a été effectuée ensuite pour confirmer les données.

Pour les vérifications Sanger, j'ai participé à la mise au point du séquençage des gènes *GJB2* et *GJB6* au CHU de Limoges.

II.2.5 Protocole de séquençage d'exomes

Le protocole Whole Exome Solution de la société Sophia Genetics a été utilisé pour la préparation des librairies d'exomes de trois individus, puis les séquences ont été réalisées sur un séquenceur NextSeq (Illumina).

Il s'agit d'une stratégie de capture associée à une analyse SOPHiA AI et la plateforme SOPHiA DDM pour la visualisation et l'interprétation. Cette technique permet une couverture intéressante des SNVs, Indels et CNVs. Ainsi, les CNVs peuvent être détectés dans 98.1% des cas.

Les séquences réalisées ont ensuite été comparées au génome de référence hg19.

Tous les variants ont été analysés, puis filtrés en fonction i) de la profondeur de séquençage (minimum 20x), ii) de la fréquence dans la population générale selon ExAC (<3%pour les transmissions récessives, <1% pour les transmissions dominantes ou les mutations *de novo*) et iii) de mots clés (interrogation de la base de données OMIM) qui permettraient de pister un gène particulier. Enfin, les variants hétérozygotes dont la proportion entre l'allèle sauvage et l'allèle muté n'était pas comprise entre 30 et 70% ont été écartés de l'analyse.

Les variants des trois exomes ont été comparés entre eux de deux façons différentes (transmission récessive ou mutation *de novo*), afin de détecter des variants potentiellement pathogènes.

Les variants d'intérêt ont ensuite été évalués en termes de pathogénicité via le logiciel Alamut Mutation Interpretation Software (Interactive Biosoftware, Rouen, France).

Seuls les variants exoniques non synonymes ou en bordure intron-exon ont été analysés, dans cette première étude.

Au cours de cette étape, j'ai participé à l'analyse des données bio-informatiques, avec deux autres experts du domaine.

II.3 Protocoles de l'étude immunohistochimique

II.3.1 Matériels

Prélèvements :

Nous avons réalisé une étude préliminaire en prélevant des cochlées et une partie du nerf auditif de rats wild-type, WT (n=9), de rats $CMT^{pmp22/+}$ (n=5), et de cadavres humains (n=3), issus du laboratoire d'anatomie et âgés de 6 mois.

Le nerf sciatique a été choisi comme témoin pour les prélèvements de rats, et le nerf facial pour les prélèvements humains.

Les rats CMT1A sont issus du modèle animal développé par Sereda *et al* (Sereda *et al,* 1996). Cette lignée transgénique surexprime la protéine PMP22, du fait de l'introduction de copies transgéniques du gène *PMP22* issues de souris. Nous avons utilisé des rats hétérozygotes, porteurs de trois copies supplémentaires de *PMP22*. Les animaux séjournaient dans des cages avec un enrichissement de l'environnement et maintenus sur des cycles de 12h jour/nuit, à une température environnante de 22°C, et avec un accès *ad libitum* à la nourriture et l'eau. Toutes les expérimentations animales ont été réalisées selon la directive européenne du 22 septembre 2010 (2010/63/EU) sur la protection des animaux utilisés à des buts scientifiques. Les protocoles expérimentaux ont été spécifiquement approuvés par le Comité Régional d'Ethique de l'Expérimentation Animale (CREEAL n°16-2013-16). Tous les efforts ont été apportés afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et pour assurer des conditions optimales de bien-être avant, pendant et après chaque expérience. Tous les rats étaient examinés quotidiennement. Les rats étaient pesés chaque semaine. Les rats n'étaient pas testés au niveau de l'audition. L'étude de sursaut acoustique aurait pu être utile pour évaluer l'audition des rats (Koch *et al*, 1997), tout comme l'étude des PEA, mais n'a pas pu être mis en place lors de cette étude.

La procédure chirurgicale comprenait une anesthésie induite par injection intrapéritonéale d'une solution contenant 100 mg/kg de Kétamine (Imalgene

1000, Merial, Lyon, France) et 4 mg/kg de xylazine (Rompun 2%, Bayer, Lyon, France).

Les rats étaient ensuite décapités, puis le prélèvement bilatéral de la cochlée et du paquet acoustico-facial était réalisé à la micro-fraise fissure sous contrôle microscopique.

Les prélèvements sur trois cadavres humains, étaient issus de dons de corps anonymes à la faculté de médecine de Limoges. Les prélèvements du bloc labyrinthe et du paquet acoustico-facial ont été réalisés sous microscope, à l'aide de moteur avec fraise et de ciseaux à frapper. Les corps sont conservés dans une solution de formol, préparée de la manière suivante : en deux temps avec 1L de formol ARTHYL et 500 mL de glycérine et 2.5 L d'eau puis 500 mL de formol ARTHYL et 200 mL de glycérine et 1.3 L d'eau.

Anticorps :

Après une recherche bibliographique et pharmaceutique des anticorps disponibles sur le marché, quatre anticorps primaires ont été choisis :

- PMP22 : SAB4502217-100UG (Sigma)
- MPZ : Don du Dr Archelos (Université de Graz – Autriche ; *JASN* 2005) (dilution 1 :100 dans 10% FCS/PBS)
- NEFL : Covance SMI31
- TRPV4 : Abcam ab 39260

II.3.2 Méthodes

Fixation et immunomarquage

Le protocole suivant a été utilisé :

- Les prélèvements sont fixés dans du formol, déshydratés et amenés et inclus dans la paraffine.
- Des coupes en paraffine de 5µm sont réalisées avec un microtome.

- Les coupes sont déparaffinées dans 2 bains de toluène de 15 minutes chacun. Puis déshydratation dans 2 bains d'Alcool Absolu pendant 10' chacun.
- Bain dans de l'eau pendant 5 minutes.
- Les peroxydases endogènes sont bloquées en incubant le tissu dans du peroxyde d'hydrogène (H2O2) 3% pendant 10 min. (Réf : S2023 Agilent)
- Rinçage à l'eau distillée.
- Le démasquage de l'antigène s'effectue en immergeant les lames dans un milieu de démasquage dilué au 1/10è dans l'eau distillée (Retrieval solution de chez Agilent Réf : S1699). Incubation à 95°C dans un bain-marie pendant 25 minutes.
- Les lames sont sorties à température ambiante pour refroidir.
- Rinçage à l'eau distillée.
- Lavage dans du tampon PBS (phosphate buffer salin Bio-Rad Réf 31098) pendant 5 minutes.
- Incubation 20 minutes dans un sérum normal de même espèce que l'anticorps primaire.
- Application sur le tissu l'anticorps primaire dilué dans sérum normal à 10% pendant une nuit en chambre humide à +4°C.
- Deux lavages pendant 5 minutes dans du PBS.
- Incubation des coupes 30 minutes avec l'anticorps secondaire biotynilé.
- Lavage avec PBS.
- Incubation 30 min avec VECTASTAIN ELITE ABC Reagent standard (Eurobio AbCys Réf : PK-6100).
- Deux lavages pendant 5 minutes dans du PBS.
- Ajout du chromogène (DAB Réf K3468 Agilent), laisser 10 minutes.
- Rinçage à l'eau.
- Coloration à l'hématoxyline pendant 5 minutes.
- Lavage à l'eau pendant 10 minutes.

- Déshydratation du tissu dans 2 bains d'Alcool Absolu pendant 5 minutes chacun.
- Puis dans 2 bains de toluène pendant 2 minutes chacun.
- Montage de la lame pour l'observation au microscope.

Références des anticorps secondaires et des sérums utilisés:

EUROBIO AbCys

➢ Pour un Ac anti-souris :

- Sérum de Cheval Réf S-2000
- Ac biotynilé anti-souris Réf : BA-2000

➢ Pour un Ac anti-lapin

- Sérum normal de chèvre Réf : S-1000
- Ac biotynilé anti-lapin Réf : BA-1000

Il est important de préciser pour l'humain, qu'il a été nécessaire de décalcifier la cochlée selon le protocole de Liu *et al*, avec 0.1M Na-EDTA dans PBS pH à 7.4, avec changement de milieu tous les jours jusqu'à décalcification, puis rinçage dans du PBS (Liu *et al*, 2009).

Le microscope utilisé est un Nikon et l'acquisition des images a été réalisée grâce au logiciel NIS BR3.0.

Dans cette étape, j'ai réalisé toutes les dissections des cochlées et nerfs auditifs murins et humains. J'ai également effectué la recherche bibliographique et pharmaceutique des anticorps connus et disponibles, et effectué les choix de ces derniers. Le marquage a été réalisé par le Dr Laurence Richard, spécialiste du domaine.

II.4 Protocoles de l'étude protéique *in silico*.

Nous nous sommes servis de la base de données StringDB (string-db.com), qui regroupe des données d'interactions protéiques provenant de plusieurs banques de données (Intact, Mint, Reactome etc.). Nous avons sélectionné uniquement les interactions protéiques qui ont été vérifiées manuellement et prouvées expérimentalement qu'elles soient publiées dans un article ou non. Le score minimum d'interaction a été fixé à 0.350 qui est un score peu limitatif afin d'obtenir assez de données. Nous avons ainsi recherché des interactions :

- Entre les 36 protéines impliquées dans CMT et surdité
- Entre les 36 protéines impliquées dans CMT et surdité et les 126 protéines de NP connues
- Entre les 36 protéines impliquées dans CMT et surdité et les 180 protéines surdité rapportées

Au cours de cette étape, j'ai réalisé l'analyse protéique *in silico.* Une relecture par deux à trois experts a été effectuée par la suite afin de confirmer les données.

III. RESULTATS

III.1 Analyse moléculaire d'une cohorte française de patients présentant une neuropathie périphérique et une surdité

Article N°1

(soumis à *Human Mutation*)

INHERITED PERIPHERAL NEUROPATHIES AND DEAFNESS:

MOLECULAR DIAGNOSIS BY NGS IN A FRENCH COHORT

Justine LERAT[1,2], Corinne MAGDELAINE[3], Anne-Françoise ROUX[4,5], Léa DARNAUD[3], Hélène DZUGAN[3], Laurence RICHARD[6], Philippe COURATIER[6,7], Karima GHORAB[6,7], Pascal CINTAS[8,9], Eric BIETH[10], Patrick CALVAS[10], Marie-Christine ARNE-BES[8], Cyril GOIZET[11], Caroline ESPIL[12], Hélène JOURNEL[13], Annick TOUTAIN[14], Jon ANDONI URTIZBERA[15], Odile BOESPFLUG-TANGUY[16], Fanny LAFFARGUE[17], Philippe CORCIA[18], Laurent PASQUIER[19], Sylva NAPURI[20], Hubert JOURNEL[21], Jonathan CIRON[22], Mélanie FRADIN[19], Jean-Marc BOULESTEIX[23], Laurent MAGY[6,7], Jean-Michel VALLAT[6,7], Paco DEROUAULT[1], Franck STURTZ[1,3], Anne-Sophie LIA[1,3]

III.1 Analyse moléculaire d'une cohorte française de patients présentant une neuropathie périphérique et une surdité

Les NP, comme CMT, sont caractérisées par des phénotypes très divers et une hétérogénéité génétique importante. La duplication de *PMP22* fut le premier variant identifié, et à ce jour plus de 90 gènes sont connus. D'autres symptômes peuvent être associés, comme la surdité. A l'heure actuelle, aucune estimation précise de la surdité n'existe dans cette population. La physiopathologie est par ailleurs mal connue.

L'objectif de l'étude était d'étudier une cohorte française de patients atteints à la fois de neuropathie périphérique et de surdité, afin d'établir des corrélations phénotypes-génotypes.

Pour cela, une stratégie de NGS-diagnostic, à l'aide d'un panel de 92 gènes de CMT et neuropathies associées a été utilisée. Une technique MLPA ainsi qu'un séquençage Sanger des gènes *GJB2* et *GJB6* ont été réalisés chez tous les patients sourds. Un séquençage NGS à l'aide d'un panel de 63 gènes de surdité a été effectué ensuite chez certains patients sélectionnés, au CHU de Montpellier.

Parmi 3412 patients français suivis pour NP, la surdité était décrite chez 44 patients (1.30%). Les données cliniques étaient exploitables chez 27 patients. Une neuropathie démyélinisante était présente dans 15 cas, et une forme axonale chez 12 patients. La surdité variait de légère à profonde, et pouvait être progressive. Cinq cas de neuropathie auditive étaient diagnostiqués.

L'analyse de la littérature a permis d'identifier 36 gènes décrits comme impliqués à la fois dans la NP et la surdité. Sept nouveaux variants pathogènes dans cinq gènes différents ont été identifiés dans *PRPS1, MPZ, SH3TC2, NEFL, ABHD12*. Pour deux patients avec des variants pathogènes de *PMP22*, un deuxième gène semble être impliqué avec des variants pathogènes pour *MYH14,* et *COCH*.

Aucun variant n'a été retrouvé dans *GJB2* et *GJB6* parmi les 27 patients.

A l'aide d'une stratégie de NGS, nous avons pu établir un diagnostic moléculaire dans près de 60% des cas présentant une NP héréditaire associée à une surdité.

Des corrélations génotypes-phénotypes ont pu être découvertes, notamment avec les gènes *SH3TC2*, *PRPS1*, *ABHD12*, *NEFL* et *TRPV4*. L'implication de *PMP22*, et dans une moindre mesure de *MPZ*, ne semble pas suffisante pour expliquer la surdité chez les patients avec NP. Cette hypothèse est étayée par l'implication de deux gènes indépendamment de *PMP22*.

La surdité peut être liée à une atteinte endocochléaire et/ou une dysfonction rétrocochléaire.

En conséquence, la surdité est très probablement sous-diagnostiquée, et devrait faire l'objet d'une évaluation chez tous les patients atteints de NP héréditaire.

HEARING LOSS IN INHERITED PERIPHERAL NEUROPATHIES:

MOLECULAR DIAGNOSIS BY NGS IN A FRENCH SERIES

Justine LERAT[1,2], Corinne MAGDELAINE[1,3], Anne-Françoise ROUX[4,5], Léa DARNAUD[3], Hélène DZUGAN[1,3], Steven NAUD[3], Laurence RICHARD[6], Paco DEROUAULT[3], Karima GHORAB[1,6], Laurent MAGY[1,6], Jean-Michel VALLAT[6] , Pascal CINTAS[7,8], Eric BIETH[9], Marie-Christine ARNE-BES[7], Cyril GOIZET[10], Caroline ESPIL[11], Hubert JOURNEL[12], Annick TOUTAIN[13], Jon ANDONI URTIZBEREA[14], Odile BOESPFLUG-TANGUY[15], Fanny LAFFARGUE[16], Philippe CORCIA[17], Laurent PASQUIER[18], Mélanie FRADIN[18], Sylva NAPURI[19], Jonathan CIRON[20], Jean-Marc BOULESTEIX[21], Franck STURTZ[1,3], Anne-Sophie LIA[1,3]

[1] Univ. Limoges, MMPN, EA 6309, F-87000 Limoges, France
[2] CHU Limoges, Service Oto-Rhino-Laryngologie et Chirurgie Cervico-Faciale, F-87000 Limoges, France
[3] CHU Limoges, Service Biochimie et Génétique Moléculaire, F-87000 Limoges, France
[4] CHU Montpellier, Laboratoire de Génétique Moléculaire, F-34000 Montpellier, France
[5] Univ. Montpellier, EA7402, F-34000 Montpellier, France
[6] CHU Limoges, CRMR Neuropathies Périphériques Rares, F-87000 Limoges, France
[7] CHU Toulouse, Service de Neurologie et d'explorations fonctionnelles, F-31059 Toulouse, France
[8] CHU Toulouse, Service de Neurologie, Centre de référence de pathologie neuromusculaire, F-31059 Toulouse, France
[9] CHU Toulouse, Service de Génétique Médicale, F-31059 Toulouse, France
[10] CHU Bordeaux, Service de Neurogénétique, F-33000 Bordeaux, France
[11] CHU Bordeaux, Service de Génétique médicale, F-33000 Bordeaux, France
[12] CH Bretagne Atlantique, Vannes, Service de Génétique Médicale, F-56000 Vannes, France
[13] CHU Tours, Service de Génétique, F-37000 Tours, France
[14] Centre de référence Neuromusculaire, Hôpital marin, Hendaye, France.
[15] Hôpital Robert-Debré AP-HP, Service de Neurogénétique, F-75019 Paris, France
[16] CHU Clermont-Ferrand, Service de Génétique médicale, F-63000 Clermont-Ferrand, France
[17] CHU Tours, Service de Neurologie, F-37000 Tours, France
[18] CHU Rennes, Service de Génétique médicale, F-35000 Rennes, France
[19] CHU Rennes, Service de Pédiatrie, F-35000 Rennes, France
[20] CHU Poitiers, Service de Neurologie, F-86000 Poitiers, France
[21] CHU Cahors, Service Neurologie, F-46000 Cahors, France

ABSTRACT

The aim of the study was to analyze among a French series of 3412 patients with inherited peripheral neuropathy (PN), the ones who also suffer from hearing loss, to establish phenotype-genotype correlations. An NGS strategy for PN and non syndromic hearing loss (NSHL) were performed.

Hearing loss (HL) was present in only 44 patients (1.30%). The clinical data of 27 patients were usable. Demyelinating neuropathy was diagnosed in 15 cases and axonal neuropathy in 12 cases. HL varied from mild to profound. Five cases of auditory neuropathy were noticed.

Diagnosis was made for 60% of these patients. Seven novel pathogenic variants were discovered in five different genes: *PRPS1; MPZ*; *SH3TC2*; *NEFL* and *ABHD12*. Two patients with *PMP22* variants, had also an additional variant in *COCH* and *MYH14* respectively. No pathogenic variant was found at the DFNB1 locus.

Genotype-phenotype correlations do exist, especially with *SH3TC2, PRPS1, ABHD12, NEFL a*nd *TRPV4.* Involvement of *PMP22,* and in a lesser proportion of *MPZ,* is not enough to explain hearing loss in patients suffering from hereditary PN. HL can be due to cochlear impairment and/or auditory nerve dysfunction. HL is certainly underdiagnosed, and should be evaluated in every patient suffering from inherited PN.

KEY WORDS: *Charcot-Marie-Tooth; Neuropathy; Hearing loss; NGS*

Introduction

The most common inherited peripheral neuropathy is Charcot-Marie-Tooth disease (CMT), with a prevalence of 1/2500. CMT has a wide range of phenotypes and is genetically heterogeneous. *PMP22* duplication was the first identified pathogenic variant in 1992, and accounts for 15% of CMT patients (Timmerman *et al*, 1992). More than 90 genes are involved in the different types, which can be demyelinating, axonal or intermediate with variable inheritance and expression. Other symptoms can be associated to the condition, such as, scoliosis or hearing loss. Currently, no global hearing impairment assessment has been determined, and the physiopathology is not well known. The hypothesis of retrocochlear dysfunction has been suggested (Anzalone *et al*, 2018). It is therefore supposed that profound hearing impairment could be the result of cochlear nerve desynchronisation, leading to auditory neuropathy.

Almost 10% of the French population suffers from hearing loss, which can be sensorineural, conductive or mixed. Sensorineural hearing loss can be due to a virus (e.g. CytoMegaloVirus), environment (e.g. noise exposure) or genetic factors. Congenital hearing loss represents more than 50% of sensorineural hearing loss. More than 100 genes have been identified to be responsible for NSHL, and more still for syndromic hearing loss. Congenital hearing loss is most of the time a monogenic disease.

The aim of the study was to analyze a French series of patients suffering from inherited peripheral neuropathy associated with hearing loss, in order to establish phenotype-genotype correlations.

Materials and Methods

Patients: A French series of 3412 patients suffering from inherited peripheral neuropathy (PN) has been analysed so as to identify patients presenting PN and hearing loss. The 3412 patients had been selected on clinical and inheritance criterion.

Phenotypes were screened on the basis of clinical data and electroneuromyograms (ENMG) for PN, and audiograms, OtoAcoustic Emissions (OAE) and Auditory Brainstem Responses (ABR) for hearing loss. Peripheral blood samples of the patients were collected on EDTA tubes after giving their informed consent. The protocol was in accordance with French ethical legislation and Helsinki declaration.

Pathogenic variant detection: Genomic DNA was extracted by standard methods (Illustra DNA Extraction kit BACC3, GEHC). For neuropathy screening, a Next Generation Sequencing (NGS) strategy was implemented using a 92-gene custom panel designed for CMT and associated neuropathies diagnosis (***Supplementary data 1***). It included the 44 known CMT genes, 27 genes involved in HSN (Hereditary Sensitive Neuropathy) and HMN (Hereditary Motor Neuropathy) and 21 other genes of interest involved in neuropathies of differential diagnosis. The amplified library was prepared with Ion P1 HiQ Template OT2 200 kit (Ampliseq Custom (Life technologies)), sequenced on Proton sequencer (Life technologies), and mapped to the human reference sequence GHCh37. Variants were assessed with Alamut Mutation Interpretation Software (Interactive Biosoftware, Rouen, France). Databases such as ExAC Genome browser (http://exac.broadinstitute.org), dbSPN135 (National Center for Biotechnology Information [NCBI], Bethesda, Maryland, USA, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SPN/), ClinVar (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar) and HGMD (www.hgmd.cf.ac.uk) were also screened. Pathogenic variants of interest were verified by Sanger sequencing using forward and reverse primer pairs. Data have been submitted into a freely accessible public database, namely LOVD at https://databases.lovd.nl/shared/genes/DMD.

For hearing loss screening, MLPA and Sanger sequencing for *GJB2* and *GJB6* were performed for all the deaf patients. A NGS strategy was performed on a 63-gene custom panel designed for hearing loss in 8 selected patients (Baux *et al*,

2017) (***Supplementary data 2***). Variants of interest were verified by Sanger sequencing using forward and reverse primer pairs.

Literature analysis has identified 36 genes described to be involved in both PN and hearing loss (***Table 1***). These 36 genes are all present in the 92-gene custom panel designed for CMT and PN.

Results

Clinical description:

Among the series of 3412 patients, we had the information of hearing loss associated with peripheral neuropathy in only 44 patients (1.30%). The clinical data of 27 patients, 15 women and 12 men, were usable for this study. The clinical description is presented in ***Table 1***. The mean age was 60.77 years (from 10 to 90).

Demyelinating neuropathy was diagnosed in 15 cases and axonal neuropathy in 12 cases. Age at onset varied from 2 to 73 years. In case of early onset, both demyelinating and axonal forms were observed (Patients I, IV, VIII, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXIII and XXVI).

Hearing loss varied from mild to profound, could be progressive, and five cases of auditory neuropathy (AN) were related (Patients II, XII, XIV, XVIII and XXVI). Endocochlear involvement was also present with absence of Otoacoustic Emissions as in case of patient XIV. Age at onset varied from 1 to 68. One patient has successfulcochlear implantation (Patient XIV) and one patient has recently been assessed for a cochlear implant (Patient XII). They both suffered from AN. In case of early onset (n= 8 cases), HL was severe to profound in four cases (Patients IV, XII, XIII and XXVI).

PN and HL can occur nearly simultaneously in some patients, as in the case with patients XIV or patient XIX, or closely as in patients IV, XI, XVIII, XXI or XXVI. In contrast, the two features occured with a delay of up to 40 years, in others as in

patients XXIV, and also patients XII, XVII and XX. Most of the time, hearing loss preceded PN by several decades.

The other major symptoms observed were linked to other cranial nerve disorder such as optic neuropathy (n=2), or bilateral laryngeal nerve paresis (n=1). Neurological features such as cerebellar ataxia (n= 3), proprioceptive balance disorders (n=4), urinary incontinence (n= 2) and pain (n= 2) were observed. Ophthalmological conditions like cataracts (n= 3) or retinal detachment (n= 1) were also present. Scoliosis was present in three cases. ***Table 2***

Genetic testing:

Eleven sporadic and 16 familial cases were noted. Inheritance mode was in favour of an autosomal dominant (AD) way in 14 cases, and an autosomal recessive (AR) one in 2 cases.

By screening the 36 genes known to be involved in both PN and HL, pathogenic variants were identified in 16 patients out of 27 (59.26%): *PMP22* (n=5), *SH3TC2* (n=4), *MPZ* (n=2), *NEFL* (n=2), *PRPS1* (n=1), *TRPV4* (n=1), *ABHD12* (n=1). ***Figure 1***

The already known variants were: *PMP22* duplication of 1.5Mb in three cases, *PMP22* deletion of 1.4Mb in one case, c.434delT, *PMP22* variant p.(Leu145Argfs*9), *SH3TC2* variants c.2642A>G, p.(Asn881Ser); c.2860C>T, p.(Arg954*); c.3325C>T, p.(Arg1109Ter); c.3596G>A, p.(Trp1199*), *NEFL* variant c.293A>C, p.(Asn98Ser) and *TRPV4* variant c.694C>T, p.(Arg232Cys).

As a consequence, seven novel variants, that could be classified as pathogenic or probably pathogenic, were discovered in five different genes *PRPS1, MPZ, SH3TC2, NEFL* and *ABHD12*. These variants were all absent from the different databases. ***Table 3***

- c.202A>T, p.(Met68Leu) in *PRPS1:* it was found in patient IV, who developed an X-linked and axonal form of neuropathy. Family segregation was in accordance with a carrier mother.

- c.437T>C, p.(Val146Ala) and c.418T>C, p.(Ser140Pro) in *MPZ* : these two variants were present in patients XI and XVI respectively. Autosomal dominant transmission was suspected in both cases. Family segregation was concordant in both cases for PN but we do not have all the information for hearing loss.

- c.3377T>C, p.(Leu1126Pro) and c.3617C>A, p.(Ala1206Asp) in *SH3TC2*: patient XVII developed an autosomal recessive form of demyelinating neuropathy and was associated with the known variant c.2860C>T, p.(Arg954*). Family segregation was concordant in a brother presenting both pathogenic variants associated with PN and hearing loss. Patient XX had an autosomal recessive form of demyelinating neuropathy associated with moderate hearing loss. Family segregation was concordant.

-c.269A>G, p.(Glu90Gly) in *NEFL:* patient XIX had an autosomal dominant form of axonal neuropathy. Family segregation was concordant in a son and a mother presenting both pathogenic variants associated with PN and hearing loss.

- c.379_385delAACTACTinsGATTCCTTATATACCATTGTAGTCTTA CTGCTTTTGGTGAACACA, p.(Asn127Aspfs*23) in *ABHD12*: patient XXVI presented that homozygous variant. Family segregation was concordant, each asymptomatic parent presenting the heterozygous pathogenic variant.

Another rare heterozygous variant in *MYH14*, c.1067C>T, p.(Thr356Met) was found in patient XII, already as being carrier of a 1.4Mb deletion of *PMP22*. *MYH14* was found once in ExAc. The patient had presented a tomacular neuropathy since the age of 20. Severe auditory neuropathy started at the age of 5. Although family segregation was not possible, this variant seems to be potentially pathogenic.

Two additional variants were classified as variants of unknown significance (VUS): patient I presented a novel variant in *SPTCL1*, c. -35delCCGCTTCCTTCCGGAAGGCGGGTCACAAG, located in the promotor

that could prevent *SPTLC1* expression. However, segregation analysis was not possible, and we cannot conclude for this patient. For patient VI, we found a variant of uncertain significance: c.1250C>T, p.(Ala417Val) in *DNMT1*. It was not present in ExAc. However, this variant involves a residue which is not well conserved among species, and seems to be likely benign.

Analysis at the DFNB1 locus did not reveal any pathogenic variant in the 27 patients.

In addition, NGS of the HL-gene panel was performed in 8 selected patients (Patients V, VII, X, XI, XII, XIV, XVI, XIX) carrying PN and rearrangements in genes frequently involved (*PMP22, MPZ* and *NEFL*). This revealed a known pathogenic variant in *COCH*, c.326T>C, p.(Ile109Thr) (Pauw *et al*, 2007; Bae *et al*, 2014) for patient XIV who had a point variant in *PMP22* (patient XIV with c.434delT, p.(Leu145fsArg*9). This female patient developed both demyelinating sensori-motor neuropathy and progressive severe to profound auditory neuropathy at 50. Balance disorders were also reported. Family segregation was concordant, as her sister presented the same phenotype and shared the same two variants.

Phenotype-Genotype correlations:

Hearing loss was mild or moderate in one case of *PMP22* duplication, in cases of variants in *SH3TC2* (n=2), *NEFL* (n=2), *MPZ* (n=1), *TRPV4* (n=1). By contrast, hearing impairment was profound to severe in one case of 1.4Mb deletion *PMP22*, in cases of variants in *PRPS1* and in *ABHD12*.

Hearing loss could develop simultaneously with neuropathy, in some patients with pathogenic variants in *PRPS1* (n=1), *NEFL* (n=2), *MPZ* (n=1), *TRPV4* (n=1); or at a distance in some cases of variants in *SH3TC2* (n=2) and *ABHD12* (n=1). Hearing loss occurrence varied widely with *PMP22*.

In our series, auditory neuropathy was found in five cases: three cases of *PMP22* (1.4Mb deletion, point pathogenic variant), one case due to *TRPV4* and one case

due to *ABHD12*. For patient II, no pathogenic variant was identified. Endocochlear hearing loss was observed in patients with variants in *PRPS1*, *MPZ*, *SH3TC2*, *NEFL* and *PMP22* (duplication).

In case of AR demyelinating PN, *SH3TC2* seems to be the most frequent cause (n=4). This corresponds to CMT4C or AR-CMTde-*SH3TC2 (*Mathis *et al, 2015)*. The frequent association with deafness and /or scoliosis in CMT4C may be a clue for the diagnosis.

Patients who develop polyneuropathy associated with sensorineural hearing loss and optic atrophy during childhood, with an X-linked inheritance, such as Patient IV, should be assessed for *PRPS1*. *PRPS1* pathogenic variants lead to CMTX5, a rare condition with only seven variants already reported. Our variant c.202A>T, p.(Met68Leu) is novel.

Pathogenic variants in *NEFL* responsible for CMT are rare and associated to various phenotypes. However, hearing loss is often linked to neuropathy, up to 64% of cases, especially with the pathogenic variants p.Glu90Lys and p.Asn98Ser (Likar *et al*, 2018), as it was the case in our p.Glu90Gly pathogenic variant. All these pathogenic variants are located in the head domain or in the two ends of the rod domain.

ABHD12 pathogenic variants lead to a rare phenotype named PHARC syndrome (MIM612674), which is a neurodegenerative disease including demyelinating Polyneuropathy, Hearing loss, cerebellar Ataxia, Retinis pigmentosa and early-onset Cataract (PHARC). Patient XVI presented demyelinating Polyneuropathy, Hearing loss with auditory neuropathy, Ataxia and Cataracts.

TRPV4 is responsible for CMT2C or AD-dHMN-*TRPV4*. The phenotype is characterized by association with vocal cord and/or diaphragm paresis, and hearing loss (Dyck *et al*, 1994; Landoure *et al*, 2012). Patient XVIII's phenotype corresponds to that clinical presentation.

MPZ variants causing axonal neuropathy are often associated with other features, such as hearing loss, or pupil abnormality. A characteristic audiogram of gentle slope curve towards the high frequencies is seen in patients suffering from CMT and sensorineural hearing loss. This was observed in patient XI.

Auditory neuropathy has been associated to *PMP22* variants. As observed in our study, hearing loss associated to neuropathy due to *PMP22* is very variable.

Discussion

Through the analysis of the literature, we identified 36 genes that have been described to be involved in both inherited PN and hearing loss. They were all present in the 92 genes custom panel designed for CMT and associated neuropathies diagnosis. They consist in 16 CMT genes, 4 HMN genes, 2 HSN genes, and 14 other PN genes, mostly syndromic forms. ***Table 1***

In our series of 27 patients suffering from both PN and hearing loss, a molecular diagnosis was made in 16 patients, thus in approximately 60%. Therefore, hearing impairment was observed in 1.30% of the French series of 3412 patients followed for PN, which suggests that it is probably underdiagnosed.

In our study, *SH3TC2* seems to be the most frequent gene involved in autosomal recessive demyelinating PN, CMT4C or AR-CMTde-*SH3TC2*, as among 350 patients tested with PN NGS, 13 had a pathogenic variants in this gene, and four patients were reported deaf. Hearing loss is the most frequent cranial nerve pathology (Azzedine *et al*, 2008; Yger *et al*, 2012; Piscosquito *et al*, 2016). Scoliosis is present in more than onethird of this population (Lori *et al*, 2007). Hearing loss frequency (in the patients from our series with variants in *SH3TC2)* is statistically different from that in the general population, showing that the pathogenic variant in *SH3TC2* is directly responsible for hearing loss. We report two novel variants, c.3377T>C, p.(Leu1126Pro) associated with the already known variant, c.2860C>T, p.(Arg954*); and c.3617C>A, p.(Ala1206Asp).

For *ABHD12*, hearing loss is almost constant and is the first clinical sign, starting in the late teens. It is progressive and varies from moderate to profound. PN is the most variable symptom.

PRPS1 is linked to three different phenotypes, always associated with hearing loss: CMTX5, DFNX1 and Arts syndrome. These three clinical presentations tend to overlap (Nishikura *et al*, 2018). In our series of 350 patients tested with NGS, only one patient was diagnosed with this gene, which is a novel hemizygous variant, c.202A>T, p.(Met68Leu). This variant is predicted as pathogenic.

For *NEFL*, hearing loss is associated with PN in case of the following variants: (p.Glu90Lys, p.Asn98Ser, p.Asn98Thr, p.Leu268Pro, p.Cys322_Asn326del, p.Glu396Lys) (Abe *et al*, 2009; Silvera *et al* , 2013; Fabrizi *et al*, 2006; Zuchner *et al*, 2004; Hortega *et al, 2017*) ; and also with our new pathogenic variant: c.269A>G, p.(Glu90Gly). The seven heterozygous variants, including ours, are located on « hot spots » of the protein and seem directly linked to the hearing loss observed in the patients.A tonal audiogram with a moderate slope on the high frequencies is characteristic of variants p.Asn98Ser and p.Glu90Gly (Likar *et al*, 2018). The same audiogram was also observed in patient XIX.

TRPV4 is responsible for CMT2C or AD-dHMN-*TRPV4*. The phenotype is characterized by vocal cord paresis and/or diaphragm paresis, and hearing loss (Dyck *et al*, 1994; Landoure *et al*, 2012). Patient XVIII's phenotype corresponds to this description. In our French series, five patients were detected with a variant in *TRPV4*, but only one of them was referred with diagnosed hearing loss.

Interestingly in our series of 3412 PN patients, 60 patients were mutated in *MPZ*. Nevertheless, only two patients were reported with hearing impairment (3.33%). Hearing loss frequency does not seem to be statistically different from that in the general population, suggesting that pathogenic variants in *MPZ* may not be the real cause of hearing loss in these patients who are susceptible to carry additional pathogenic variants in HL genes.

Hearing loss has also been described in association with duplication, deletion or point pathogenic variants of the *PMP22* gene (Luigeti *et al,* 2012). PMP22 is a major protein expressed in compact myelin of peripheral nerves as well as cranial nerves. Hearing loss in CMT patients is reported with point pathogenic variants or deletions in the transmembrane domain of PMP22, which is in close proximity to the extracellular component of this protein. It has been suggested that pathogenic variants at this site could cause defective interactions with other proteins in Schwann cells, which may result in hypo- or demyelination of the peripheral nerves, including the auditory nerve (Postelmans *et al,* 2006). Demyelination of the auditory nerve may also be a plausible mechanism to explain the retrocochlear involvement (Verhagen *et al,* 2005). In addition, endo and retrocochlear hearing loss has been observed in patient presenting the point variant c.193G>T, p.(Val65Phe) (Postelmans *et al,* 2006). However, while *PMP22* duplication is responsible for 60% of CMT1, the AD demyelinating type, only few patients in fact suffer from hearing loss. In our series of 3412 patients, 784 patients were mutated in *PMP22 (23%)* and we had information on associated hearing loss in only 5 of them (0.05%), presenting duplications (n=3), a large deletion (n=1) or 1 basepair deletion (n=1). This 0.05% proportion is statistically different from the rate in the general population, with 10% of hearing loss. Nevertheless, the PN and CMT populations are younger. It seems difficult to conclude that variations in *PMP22* could protect from hearing loss. We therefore think it is probably underdiagnosed. The rarity of severe hearing loss in families with *PMP22* pathogenic variants could rather suggest that most *PMP22* pathogenic variants have minimal or no effects on hearing loss occurence. As a consequence, hearing loss in that population could be due to other genes, as we started to point out for two of our patients, with a pathogenic variant in *COCH* and a suspected one in *MYH14.*

The *COCH* gene is responsible for DFNA9, which consists in post-lingual progressive hearing loss with vestibular dysfunction, such as Meniere-like

diseases (Manolis *et al*, 1996). The cochline protein is detected in spindle-shaped cells located along nerve fibers between the auditory ganglion and the sensory epithelium. Patient XIV presented with progressive severe to profound hearing loss, with desynchronised ABR and absent Acoustic Oto Emission. It is the first case to be reported with PN so far. She also suffered from balance disorders, which could be due to vestibular dysfunction, as the penetrance is very variable. Indeed, proprioceptive balance disorders or cerebellar ataxia could be misdiagnosed with vestibular dysfunction. Clinical examination is difficult in those patients suffering from PN. Therefore, vestibular investigations should be performed in PN patients suffering from balance disturbances.

MYH14 can lead to two different conditions: DFNA4 with progressive non syndromic hearing loss starting in the first or second decade of life and leading to severe to profound hearing loss in the fourth decade of life (firstly described by Mirghomizadeh *et al*, 2002); or to PN associated with myopathy, hoarseness, and hearing loss (Choi *et al*, 2011). This phenotype is only reported in one article. Patient XII had presented severe auditory neuropathy starting at the age of 5 and a tomacular neuropathy since the age of 20. No hoarseness or dysphony was reported. A rare heterozygous variant in *MYH14*, c.1067C>T, p.(Thr356Met), that could potentially explain hearing loss, was found in addition to the 1.4Mb deletion of *PMP22* that explains the *PN*. That is in accordance with our hypothesis that *PMP22* is not responsible for hearing loss. *MYH14 c*ould nevertheless be also responsible for PN. Actually, only one case has been reported with PN and hearing loss (Choi *et al*, 2011), and two articles have been published about hearing loss with the same pathogenic variants (Chen *et al*, 1995; Mirghomizadeh *et al*, 2002).We can wonder whether a founder effect exists, or if a pathogenic variant in a HL gene close to *MYH14* exists.

Hearing loss is reported regularly in patients suffering from PN. The pathogenesis of hearing loss in those patients is uncertain, even though the cranial nerves are part of the peripheral nervous system and wrapped by Schwann cells.

The hypothesis of retrocochlear dysfunction has been suggested and profound hearing loss is supposed to be due to desynchronization of the cochlear nerve (Anzalone *et al*, 2018). However, in our study we have shown that hearing impairment could be endocochlear, and not only due to AN, as it was the case for patients XIV. In our series, we noticed that both auditory nerve and cochlear dysfunction were present, as auditory neuropathy was found in five cases: two cases of *PMP22* (1.4Mb deletion, point pathogenic variant), one case due to *TRPV4* and one case due to *ABHD12* (molecular diagnosis was not made for the last one); and endocochlear hearing loss was observed in patients with variants in *PRPS1*, *MPZ*, *SH3TC2*, *NEFL* and *PMP22* (duplication). That was also demonstrated by Kovach *et al* (2002) in a patient presenting a pathogenic variant in *PMP22*. However in most studies, there is a lack of information concerning testing to clearly distinguish cochlear and neuronal components.

To our knowledge, only three patients suffering from PN and AN received a cochlear implant (absence of information about CMT type or hearing loss type by Anzalone *et al*, 2018; auditory neuropathy and absence of variant in *PMP22* or *GJB1* by Goswamy *et al*, 2012; cochlear and auditory nerve dysfunction with a point pathogenic variant in *PMP22*, c.193G>T, p.(Val65Phe) by Postelmans *et al*, 2006). Our patient XIV also benefited from this surgery. Cochlear implant can recreate synchronous neuronal activity through the electrostimulation, and thus improves speech understanding. However, progress is slower than in other patients with cochlear implant. Patients describe a final significant benefit.

Moreover, hearing loss can precede, occur at the same time or follow PN. It can be progressive, and the severity varies from mild to profound. We suggest that audiologic assessment should be made in all patients suffering from PN, and vice versa, patients suffering from hearing loss should be tested for neuropathic involvement, associated with NGS screening of a large panel including genes involved in syndromic pathologies. Indeed, the delay between the different symptoms can be very long (up to 40 years) and a large NGS screening could help

to find the gene involved and so to improve the care of the patient. This is for instance the case of Perrault syndrome type II (MIM# 233400), a rare autosomal recessive condition, characterized by sensorineural hearing loss, gonadic dysgenesis in males and females, and neurological features such as developmental delay or intellectual disability, cerebellar ataxia, motor and sensory peripheral neuropathy. As in patients suffering from PN and hearing loss, the delay between the onset of the two or more symptoms can be up to 40 years, which leads to underdiagnose this phenotype if the involved genes are not tested in "hearing loss" NGS screening (Lerat *et al*, 2016).

Another possibility to explain both PN and hearing loss is the presence of modifier genes that will induce that particular phenotype. That is why, for unsolved cases, WES could be very useful to identify new candidate genes for PN and hearing loss, so as to improve diagnosis and patient care.

In addition, to better understand the physiopathology of neuropathies associated with hearing loss, animal models e.g. in rats and mice, should be developed. Indeed, it could be interesting to perform a biopsy of the auditory nerve and cochlea of wild-type and affected animals in order to localize accurately, for example by immunochemistry the proteins involved in those two features. However, murine phenotype might be different as the organization differs.

Conclusion

Through an NGS strategy, we have been able to establish a molecular diagnosis in 59.26% of the cases presenting inherited PN associated with HL. As a consequence, a precise description of the phenotype can help molecular investigations. *PMP22,* and in a lesser proportion *MPZ,* involvement is not enough to explain hearing loss in patients suffering from hereditary peripheral neuropathy. Hearing loss can be due to cochlear impairment and/or auditory nerve dysfunction. As HL is certainly underdiagnosed in PN patients, we suggest that

audiologic tests should be systematically performed in these patients and their DNA screened with large NGS panels. This would enhance the diagnosis, help to better understand the physiopahology of PN + HL and eventually improve patient's care.

Conflict of interest: None.

Acknowledgements

We are thankful to the nucleic acid platform BISCEM, University of Limoges, France. We also thank Sylvie Gautier for English revision.

References

Abe A, Numakura C, Saito K, Koide H, Oka N, Honma A, Kishikawa Y, Hayasaka K. (2009). Neurofilament light chain polypeptide gene mutations in Charcot-Marie-Tooth disease: nonsense mutation probably causes a recessive phenotype. *J Hum Genet*, 54, 94-7.

Anzalone CL, Nuhanovic S, Olund AP, Carlson ML. (2018). Cochlear Implantation in Charcot-Marie-Tooth Disease: Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Med*, 2018, 1760978.

Azzedine H, LeGuern E, Salih MA. (1993). Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 4C. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., ed. GeneReviews®

Bae S-H, Robertson NG, Cho H-J, Morton CC, Jung DJ, Baek J, Choi SY, Lee J, Lee KY, Kim UK.(2014). Identification of pathogenic mechanisms of COCH mutations, abolished cochlin secretion, and intracellular aggregate formation: genotype-phenotype correlations in DFNA9 deafness and vestibular disorder. *Hum Mutat*, 35, 1506-13.

Baux D, Vaché C, Blanchet C, Willems M, Baudoin C, Moclyn M, Faugère V, Touraine R, Isidor B, Dupin-Deguine D, Nizon M, Vincent M, Mercier S, Calais C, García-García G, Azher Z, Lambert L, Perdomo-Trujillo Y, Giuliano F, Claustres M, Koenig M, Mondain M, Roux AF. (2017). Combined genetic approaches yield a 48% diagnostic rate in a large cohort of French hearing-impaired patients. *Sci Rep*, 7:16783.

Chen AH, Ni L, Fukushima K, Marietta J, O'Neill M, Coucke P, Willems P, Smith RJ. (1995). Linkage of a gene for dominant non-syndromic deafness to chromosome 19. *Hum Mol Genet*, 4, 1073-6.

Choi B-O, Kang SH, Hyun YS, Kanwal S, Park SW, Koo H, Kim SB, Choi YC, Yoo JH, Kim JW, Park KD, Choi KG, Kim SJ, Züchner S, Chung KW.(2011). A complex phenotype of peripheral neuropathy, myopathy, hoarseness, and hearing loss is linked to an autosomal dominant mutation in MYH14. *Hum Mutat*, 32, 669-77.

Claramunt R, Sevilla T, Lupo V, Cuesta A, Millán JM, Vílchez JJ, Palau F, Espinós C. (2007) The p.R1109X mutation in SH3TC2 gene is predominant in Spanish Gypsies with Charcot-Marie-Tooth disease type 4. *Clin Genet*, 71, 343-9.

Dyck PJ, Litchy WJ, Minnerath S, Bird TD, Chance PF, Schaid DJ, Aronson AE. (1994). Hereditary motor and sensory neuropathy with diaphragm and vocal cord paresis. *Ann Neurol*, 35, 608-15.

Fabrizi GM, Cavallaro T, Angiari C, Cabrini I, Taioli F, Malerba G, Bertolasi L, Rizzuto N. (2007). Charcot-Marie-Tooth disease type 2E, a disorder of the cytoskeleton. *Brain*, 130, 394-403.

Goswamy J, Bruce IA, Green KMJ, O'Driscoll MP. (2012). Cochlear implantation in a patient with sensori-neural deafness secondary to Charcot-Marie-Tooth disease. *Cochlear Implants Int*, 13, 184-7.

Kovach MJ, Campbell KCM, Herman K, Waggoner B, Gelber D, Hughes LF, Kimonis VE. (2002). Anticipation in a unique family with Charcot-Marie-Tooth syndrome and deafness: delineation of the clinical features and review of the literature. *Am J Med Genet,* 108, 295-303.
Landouré G, Sullivan JM, Johnson JO, Munns CH, Shi Y, Diallo O, Gibbs JR, Gaudet R, Ludlow CL, Fischbeck KH, Traynor BJ, Burnett BG, Sumner CJ. (2012). Exome sequencing identifies a novel TRPV4 mutation in a CMT2C family. *Neurology*, 79, 192-4.
Lerat J, Jonard L, Loundon N, Christin-Maitre S, Lacombe D, Goizet C, Rouzier C, Van Maldergem L, Gherbi S, Garabedian EN, Bonnefont JP, Touraine P, Mosnier I, Munnich A, Denoyelle F, Marlin S. (2016). An Application of NGS for Molecular Investigations in Perrault Syndrome: Study of 14 Families and Review of the Literature. *Hum Mutat,* 37, 1354-62.
Likar T, Hasanhodžić M, Teran N, Maver A, Peterlin B, Writzl K. (2018). Diagnostic outcomes of exome sequencing in patients with syndromic or non-syndromic hearing loss. *PLoS ONE,* 13, e0188578.
Luigetti M, Zollino M, Conti G, Romano A, Sabatelli M. (2013). Inherited neuropathies and deafness caused by a PMP22 point mutation: a case report and a review of the literature. *Neurol Sci,* 34, 1705-7.
Manolis EN, Yandavi N, Nadol JB, Eavey RD, McKenna M, Rosenbaum S, Khetarpal U, Halpin C, Merchant SN, Duyk GM, MacRae C, Seidman CE, Seidman JG. (1996). A gene for non-syndromic autosomal dominant progressive postlingual sensorineural hearing loss maps to chromosome 14q12-13. *Hum Mol Genet,* 5, 1047-50.
Mathis S, Goizet C, Tazir M, Magdelaine C, Lia A-S, Magy L, Vallat JM. (2015). Charcot-Marie-Tooth diseases: an update and some new proposals for the classification. *J Med Genet,* 52, 681-90.
Mirghomizadeh F, Bardtke B, Devoto M, Pfister M, Oeken J, König E, König E, Vitale E, Riccio A, De Rienzo A, Zenner HP, Blin N. (2002). Second family with hearing impairment linked to 19q13 and refined DFNA4 localisation. *Eur J Hum Genet,* 10, 95-9.
Nishikura N, Yamagata T, Morimune T, Matsui J, Sokoda T, Sawai C, Sakaue Y, Higuchi Y, Hashiguchi A, Takashima H, Takeuchi Y, Maruo Y. (2018). X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 5 with recurrent weakness after febrile illness. *Brain Dev,* pii: S0387-7604(18)30167-0
Pauw RJ, Huygen PLM, Collin RWJ, Cruysberg JRM, Hoefsloot LH, Kremer H, Cremers CW. (2007). Phenotype description of a novel DFNA9/COCH mutation, I109T. *Ann Otol Rhinol Laryngol,* 116, 349-57.
Piscosquito G, Saveri P, Magri S, Ciano C, Gandioli C, Morbin M, Bella DD, Moroni I, Taroni F, Pareyson D. (2016). Screening for SH3TC2 gene mutations in a series of demyelinating recessive Charcot-Marie-Tooth disease (CMT4). *J Peripher Nerv Syst,* 21, 142-9.
Postelmans JTF, Stokroos RJ. (2006). Cochlear implantation in a patient with deafness induced by Charcot-Marie-Tooth disease (hereditary motor and sensory neuropathies). *J Laryngol Otol,* 120, 508-10.
Sivera R, Sevilla T, Vílchez JJ, Martínez-Rubio D, Chumillas MJ, Vázquez JF, Muelas N, Bataller L, Millán JM, Palau F, Espinós C. (2013). Charcot-Marie-Tooth disease: genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology,* 81, 1617-25.
Timmerman V, Nelis E, Van Hul W, Nieuwenhuijsen BW, Chen KL, Wang S, Ben Othman K, Cullen B, Leach RJ, Hanemann CO, et al. (1992). The peripheral myelin protein gene PMP-22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Nat Genet,* 1, 171-5.
Verhagen WIM, Huygen PLM, Gabreëls-Festen A a. WM, Engelhart M, van Mierlo PJWB, van Engelen BGM. (2005). Sensorineural hearing impairment in patients with Pmp22 duplication, deletion, and frameshift mutations. *Otol Neurotol,* 26, 405-14.
Yger M, Stojkovic T, Tardieu S, Maisonobe T, Brice A, Echaniz-Laguna A, Alembik Y, Girard S, Cazeneuve C, Leguern E, Dubourg O. (2012). Characteristics of clinical and electrophysiological pattern of Charcot-Marie-Tooth 4C. *J Peripher Nerv Syst,* 17, 112-22.
Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröder JM, Vance JM. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet,* 36, 449-51.

Supplementary data

Supp. Table S1: 92-gene panel used for CMT-NGS. It includes the 44 known CMT genes, 27 genes involved in HSN (Hereditary Sensitive Neuropathy) and HMN (Hereditary Motor Neuropathy) and 21 other genes of interest involved in neuropathies of differential diagnoses.

Supp. Table S2: 63-gene panel used for hearing loss-NGS.

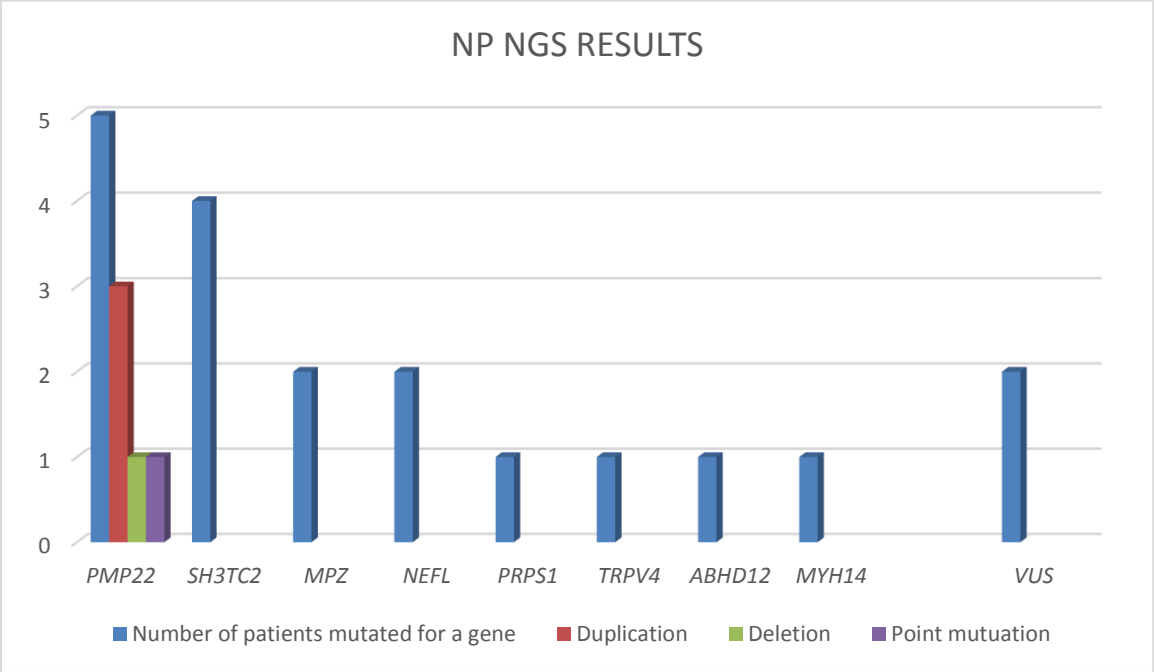


Figure 1: Representation of NP NGS results of our cohort

Genes described to be involved in NP + HL							
AARS	NM_001605.2	*DNAJB2*	NM_006736.5	*PEX12*	NM_000286.2	*SH3TC2*	NM_024577.3
ABHD12	NM_015600.4	*INF2*	NM_022489.3	*PEX7*	NM_000288.3	*SLC5A7*	NM_021815.2
AIFM1	NM_004208.3	*KIF5A*	NM_004984.2	*PHYH*	NM_001323082.1	*SLC25A46*	NM_138773.2
DNMT1	NM_001130823.1	*MFN2*	NM_014874.3	*PMP22*	NM_000304.2	*SOX10*	NM_006941.3
FIG4	NM_014845.5	*MPZ*	NM_001315491.1	*POLG*	NM_001126131.1	*SPTLC1*	NM_001281303.1
GBE1	NM_000158.3	*MYH14*	NM_001145809.1	*PRPS1*	NM_002764.3	*SURF1*	NM_003172.3
GJB1	NM_000166.5	*NDRG1*	NM_006096.3	*SBF2*	NM_030962.3	*TRPV4*	NM_021625.4
GJB3	NM_001005752.1	*NEFL*	NM_006158.3	*SCN9A*	NM_002977.3	*TTR*	NM_000371.3
GLA	NM_000169.2	*PDK3*	NM_001142386.2	*SETX*	NM_015046.5	*TYMP*	NM_001113755.1

Table 1: the 36 genes of interest involved in both inherited PN and deafness

Patient			Polyneuropathy				Hearing loss		Other symptoms
Reference Family	Patient (gender/age in years)	**Form (Fam/spo)/ AD, AR or X-linked**	Neuropathy	Pes cavus	VCM (m/s)	Age at onset (years)	Degree	Age at onset (years)	
I	F, 87	Spo / NA	Sensori-motor Demyelinating	Y	48	12	NC	NC	Urinary incontinence, Small legs
II	F, 90	Spo / NA	Sensori-motor Axonal	Y	NC	61	Severe AN	68	/
III	M, 80	Fam / AD	Sensori-motor Axonal	Y	56	59	Moderate	NC	Cataracts, Retinal detachment
IV	M, 35	Spo/ NA	Sensori-motor Axonal	N	20-30	8	Profound	1	Optic Neuropathy, Balance disorder
V	F, 86	Fam /AD	Sensori-motor Demyelinating	Y	18	68	Progressive	NC	Balance disorder
VI	M, 88	Fam /AD	Sensori-motor Demyelinating	Y	31	72	NC	NC	Ataxia, Alzheimer disease
VII	F, 60	Fam /AD	Demyelinating	NC	NC	NC	Moderate	NC	Balance disorder
VIII	F, 47	Spo /NA	Sensori-motor Demyelinating	Y	27	4	NC	NC	Optic Neuropathy
IX	F, 47	Fam /AD	Sensori-motor Axonal	Y	NC	44	Moderate	35	Pain, Chronic Respiratory Insufficiency
X	M, 69	Fam /AD	Sensori-motor Demyelinating	NC	NC	NC	NC	NC	Severe form
X1	F, 68	Fam /AD	Sensori-motor Axonal	Y	43	35	Moderate and progressive	35	/
XII	M, 33	Fam /AD	Sensori-motor Demyelinating	Y	36	20	Severe AN	5	Tomacular neuropathy
XIII	F, 34	Spo / NA	Sensori-motor Demyelinating	Y	NC	12	Profound	1	Pain, Primary amenorrhea, oesophagus atresia
XIV	F, 68	Fam /AD	Sensori-motor Demyelinating	NC	30	50	Severe to Profound AN	50	Balance disorders, Cochlear Implantation
XV	M, 29	Spo /NA	Sensori-motor Axonal	Y	58	< 5	NC	< 5	/
XVI	F, 75	Fam /AD	Sensori-motor Demyelinating	Y	51	< 5	NC	NC	/
XVII	F, 68	Fam / AR	Sensori-motor Demyelinating	Y	34-37	9	Moderate	60	Scoliosis
XVIII	M, 68	Fam /AD	Sensori-motor Axonal	Y	NC	65	Moderate AN	62	Bilateral Vocal cord Paresis
XIX	F, 69	Fam /AD	Sensori-motor Axonal	Y	NC	45	Moderate	45	
XX	M, 83	Fam /AR	Sensori-motor Demyelinating	Y	31	73	Moderate	60	
XXI	F, 10	Fam /AD	Sensori-motor Demyelinating	Y	NC	2	Moderate	1	/
XXII	F, 80	Spo/ NA	Sensori-motor Axonal	Y	NC	45	NC	NC	Scoliosis, Cataracts
XXIII	M, 19	Spo/ NA	Sensori-motor Axonal	Y	52	11	Mild	6	Urinary incontinence, wheelchair
XXIV	F, 71	Spo / NA	Sensori-motor Demyelinating	Y	41	45	NC	< 5	Scoliosis
XXV	M, 78	Fam /AD	Sensori-motor Axonal	Y	46	NC	NC	NC	Ataxia, Gougerot-Sjogren
XXVI	M, 38	Spo / NA	Sensori-motor Demyelinating	NC	25-30	15	Moderate to profound AN	5	Cataracts, Ataxia
XXVII	M, 61	Spo/ NA	Sensori-motor Axonal	Y	44	NC	Fluctuating	54	/

Table 2: Phenotypes of our 27 patients (F: Female; M: Male; NC: Not communicated; NA: Not Available; AN: Auditory Neuropathy; Fam: Familial; Spo: Sporadic)

Patient									Second gene identified					
Reference Family	Patient (gender/age in years)	**Form (Fam/spo)/ AD, AR or X-linked**	**Gene**	**Mutation type**	**Zygosity**	**Nucleotide change**	**Amino acid change Localization**	**dbSNP**	**Gene**	**Mutation type**	**Zygosity**	**Nucleotide change**	**Amino acid change Localization**	**dbSNP**
I	F, 87	Spo / NA	***SPTLC1***	deletion	htz	c.-35delCCGCTTCCTTCCGGAAGGCGGGTCACAAG		NF	/	/	/	/	/	
II	F, 90	Spo / NA	/	/	/	/	/		/	/	/	/	/	
III	M, 80	Fam / AD	/	/	/	/	/		/	/	/	/	/	
IV	M, 35	Spo/ NA	***PRPS1***	missense	hemizygote	**c.202A>T**	**p.(Met68Leu)**	NF	/	/	/	/	/	
V	F, 86	Fam /AD	***PMP22***	duplication of 1.5 Mb	htz	//	//		N2G	N2G	N2G	N2G	N2G	
VI	M, 88	Fam /AD	***DNMT1***	missense	htz	c.1250C>T	p.(Ala417Val)	NF	/	/	/	/	/	
VII	F, 60	Fam /AD	***PMP22***	duplication of 1.5 Mb	htz	/	/		N2G	N2G	N2G	N2G	N2G	
VIII	F, 47	Spo /NA	***SH3TC2***	missense	HMZ	c.3325C>T	p.(Arg1109*)	rs80338934	/	/	/	/	/	
IX	F, 47	Fam /AD	/	/	/	/	/		/	/	/	/	/	
X	M, 69	Fam /AD	***PMP22***	duplication of 1.5 Mb	htz	/	/		N2G	N2G	N2G	N2G	N2G	
X1	F, 68	Fam /AD	***MPZ***	missense	htz	**c.437T>C**	**p.(Val146Ala)**	NF	N2G	N2G	N2G	N2G	N2G	
XII	M, 33	Fam /AD	***PMP22***	deletion of 1.4 Mb	htz	/	/		***MYH14***	htz	missense	c.1067C>T	p.(Thr356Met)	rs151082668
XIII	F, 34	Spo / NA	/	/	/	/	/		/	/	/	/	/	
XIV	F, 68	Fam /AD	***PMP22***	deletion	htz	c.434delT	p.(Leu145Argfs*9)	rs863225029	***COCH***	htz	missense	c.326T>C	p.(Ile109Thr)	rs1219089
XV	M, 29	Spo /NA	/	/	/	/	//		/	/	/	/	/	
XVI	F, 75	Fam /AD	***MPZ***	missense	htz	**c.418T>C**	**p.(Ser140Pro)**	NF	N2G	N2G	N2G	N2G	N2G	
XVII	♀, 68	Fam / AR	***SH3TC2***	missense x2	htz x2	c.2860C>T + **c.3377T>C**	p.(Arg954Ter) + **p.(Leu1126Pro)**	rs80338933+NF	/	/	/	/	/	
XVIII	♂, 68	Fam /AD	***TRPV4***	missense	htz	c.694C>T	p.(Arg232Cys)	rs387906904	/	/	/	/	/	
XIX	♀, 69	Fam /AD	***NEFL***	missense	htz	**c.269A>G**	**p.(Glu90Gly)**	NF	N2G	N2G	N2G	N2G	N2G	
XX	♂, 83	Fam /AR	***SH3TC2***	missense	HMZ	**c.3617C>A**	**p.(Ala1206Asp)**	NF	/	/	/	/	/	
XXI	♀, 10	Fam /AD	***NEFL***	missense	htz	c.293A>G	p.(Asn98Ser)	rs58982919	/	/	/	/	/	
XXII	♀, 80	Spo/ NA	/	/	/	/	/		/	/	/	/	/	
XXIII	♂, 19	Spo/ NA	/	/	/	/	/		/	/	/	/	/	
XXIV	♀, 71	Spo / NA	***SH3TC2***	missense x2	htz x2	c.2642A>G + c.3596G>A	p.(Asn881Ser) + p.(Trp1199*)	rs80338930+ rs761972717	/	/	/	/	/	
XXV	♂, 78	Fam /AD	/	/	/	/	/		/	/	/	/	/	
XXVI	♂, 38	Spo / NA	***ABHD12***	deletion-insertion	HMZ	**c.379_385delAACTACTinsGATTCCTTATATACCATTGTAGTCTTACTGCTTTTGGTGAACACA**	**p.(Asn127Aspfs*23)**	NF	/	/	/	/	/	
XXVII	♂, 61	Spo/ NA	/	/	/	/	/		/	/	/	/	/	

Table 3: Genotypes of our 27 patients (NA: Not Available; N2G: No second Gene; htz: heterozygote; hmz: homozygote; NF: Not Found)

III. 2 – *ABHD12*

Article N°2

Journal of Peripheral Nervous System, 22:77-84 (2017)

A COMPLEX HOMOZYGOUS MUTATION IN *ABHD12* RESPONSIBLE FOR PHARC SYNDROME DISCOVERED WITH NGS AND REVIEW OF THE LITERATURE

Justine LERAT[1, 2], Pascal CINTAS[3], Hélène BEAUVAIS-DZUGAN[1, 4], Corinne MAGDELAINE[1, 4], Franck STURTZ[1, 4], and Anne-Sophie LIA[1, 4]

III. 2 *ABHD12*

Le syndrome PHARC (MIM612674) est une pathologie neurodégénérative autosomale recessive, qui conduit à une Polyneuropathie démyélinisante, surdité (Hearing loss), Ataxie cérébelleuse, Rétinite pigmentaire, et Cataracte précoce. Ces différents symptômes peuvent apparaitre à des âges différents, et l'atteinte est dûe à des variants pathogènes du gène *ABHD12* (α-β Hydrolase Domain 12). Seuls 14 variants pathogènes ont été rapportés. La plupart de ces variants résultent d'une perte de fonction. En 2010, Fiskerstrand *et al* ont décrit la première famille Norvégienne. Il a alors été démontré le rôle d'*ABHD12* avec le métabolisme endocannabinoide (Fiskerstrand *et al*, 2010).

Nous décrivons ici un nouveau variant complexe homozygote, c.379_385delAACTACTinsGATTCCTTATATACCATTGTAGTCTTACTGCTTTTGGTGAACACA (p.Asn127Aspfs*23). Ce variant a été détecté à l'aide de notre panel NGS de 126 gènes de NP, chez un homme de 36 ans, qui a développé une NP dès l'âge de 15 ans.

Nous avons réalisé une étude comparative des 34 autres patients rapportés avec des variants pathogènes d'*ABHD12* et recherché les éventuelles corrélations génotypes-phénotypes. Ainsi, nous avons pu établir que la surdité était le premier signe clinique à apparaitre dès la fin de l'adolescence. Elle est souvent progressive et varie de moyenne à profonde. Cinq patients ont bénéficié d'un implant cochléaire (Eisenberger *et al*, 2012; Chen *et al*, 2013; Yoshimura *et al*, 2015; Tingaud-Sequeira *et al*, 2017). Les signes ophtalmologiques surviennent ensuite avec la cataracte vers 25 ans, puis la rétinite pigmentaire vers 29 ans. La polyneuropathie est le symptôme le plus variable. Le délai d'apparition entre les différents symptômes peut être d'une dizaine d'année. Une approche multidisciplinaire est donc nécessaire.

L'implication du gène *ABHD12* dans les polyneuropathies est probablement sous-estimée et ce travail montre qu'il est important d'inclure ce gène dans les panels NP.

Depuis la publication de notre article, un nouveau variant homozygote a été mis en évidence chez deux frères espagnols, c.211_223del (p.Arg71Tyrfs*26). Les premiers signes cliniques furent une neuropathie démyélinisante. La surdité à la fois endo et rétrocochléaire, la cataracte et la rétinite pigmentaire sont survenues après 30 ans (Frasquet *et al*, 2018).

REVIEW

A complex homozygous mutation in ABHD12 responsible for PHARC syndrome discovered with NGS and review of the literature

Justine Lerat[1,2], Pascal Cintas[3], Hélène Beauvais-Dzugan[1,4], Corinne Magdelaine[1,4], Franck Sturtz[1,4], and Anne-Sophie Lia[1,4]

[1]*EA6309 – Neuropathies Périphériques et Maintenance Myélinique, Université de Limoges, Limoges, France;* [2]*Service Oto-Rhino-Laryngologie et Chirurgie Cervico-Faciale, CHU Dupuytren, Limoges, France;* [3]*Explorations Neurophysiologiques, Centre SLA, Centre de Référence de Pathologie Neuromusculaire, CHU Toulouse, Hôpital Pierre-Paul Riquet, Toulouse, France; and* [4]*Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, CHU Dupuytren, Limoges, France*

Abstract PHARC syndrome (MIM612674) is an autosomal recessive neurodegen-erative pathology that leads to demyelinating **P**olyneuropathy, **H**earing loss, cerebel-lar **A**taxia, **R**etinitis pigmentosa, and early-onset **C**ataracts (PHARC). These various symptoms can appear at different ages. PHARC syndrome is caused by mutations in *ABHD12* (- hydrolase domain 12), of which several have been described. We report here a new complex homozygous mutation c.379_385delAACTACTinsGATTCC TTATATACCATTGTAGTCTTACTGCTTTTGGTGAACACA (p.Asn127Aspfs*23). This mutation was detected in a 36-year-old man, who presented neuropathic symptoms from the age of 15, using a next-generation sequencing panel. This result suggests that the involve-ment of *ABHD12* in polyneuropathies is possibly underestimated. We then performed a comparative study of other patients presenting *ABHD12* mutations and searched for genotype-phenotype correlations and functional explanations in this heterogeneous pop-ulation.

Key words: ABHD12, Charcot-Marie-Tooth, deafness, neuropathy, PHARC syndrome

Introduction

PHARC syndrome (MIM612674) is a neurode-generative disease characterized by demyelinating **P**olyneuropathy, **H**earing loss, cerebellar **A**taxia, **R**etinitis pigmentosa, and early-onset **C**ataract (PHARC). The various symptoms are slowly pro-gressive and appear in childhood or during the teenage years such that PHARC may be mistaken for Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease. In 2010, Fiskerstrand et al. showed that PHARC syndrome in a Norwegian family was due to mutations in the *ABHD12* gene linked to impairment of endocannabinoid metabolism *(Fisker-strand et al., 2010)*. This syndrome is transmitted in an autosomal recessive manner.

Only 14 mutations (8 in homozygous patients and 6 in 3 compound heterozygous patients) in the *ABHD12* gene linked to PHARC syndrome have been reported in the literature. Most of them appear to result in a loss of function of the protein.

We report the case of a complex homozy-gous mutation discovered in a 36-year-old man who presented CMT symptoms from the age of 15. We performed a comparative study of all other patients presenting *ABHD12* mutations to establish a genotype-phenotype correlation, with the aim of

Address correspondence to: Justine Lerat, Service Oto-Rhino-Laryngologie et Chirurgie Cervico-Faciale, CHU Dupuytren, 2 avenue Martin Luther King, 87042 Limoges, France. Tel: +(33)(0)5-550-58781; Fax: +(33)(0)5-550-56287; E-mail: justine.lerat@unilim.fr

© 2017 Peripheral Nerve Society

improving the diagnosis of these patients who progressively present the various symptoms of PHARC syndrome, some which may be mistaken for those of CMT.

Materials and Methods

Patient

A 36-year-old man with features of CMT at age 15 provided a peripheral blood sample collected in EDTA tubes after providing informed consent. The protocol was in accordance with French ethics legislation.

Mutation detection

Genomic DNA was extracted using standard methods (Illustra DNA Extraction kit BACC3, GEHC). Next-generation sequencing (NGS) was performed using a 92-gene custom panel designed for the diagnosis of CMT and associated neuropathies (Table S1, Supporting Information). The panel included the 44 known CMT genes, 27 genes involved in hereditary sensory neuropathy and hereditary motor neuropathy, and 21 other genes of interest involved in other neuropathies of the differential diagnosis. The amplified library was prepared using the Ion P1 HiQ Template OT2 200 kit (Ampliseq Custom [Life Technologies, Carlsbad, CA, USA]), sequenced on a Proton sequencer (Life Technologies), and mapped to the human reference sequence hg19/GHCh37. Variants were evaluated with Alamut Mutation Inter-pretation Software (Interactive Biosoftware, Rouen, France) using the reference sequence NM_015600.4 for the *ABHD12* gene. Databases, such as the ExAC Genome browser (http://exac.broadinstitute.org), dbSNP135 (National Center for Biotechnology Infor-mation [NCBI], Bethesda, MD, USA, http://www.ncbi .nlm.nih.gov/projects/SNP/), Clin Var (www.ncbi.nlm
.nih.gov/clinvar), and HGMD professional (www.hgmd .cf.ac.uk) were also screened. Mutations of interest were verified by Sanger sequencing using forward and reverse primer pairs.

We performed a review of the literature, and collected all published articles reporting mutations in *ABHD12* (six articles).

Results

Clinical description

The patient was a 36-year-old man who suffered from sensory and motor neuropathy and ataxia from the age of 15. He presented an abnormal ataxic walk, but did not require a cane. He suffered from sensorineural deafness from the age of five. He had surgery for bilateral congenital cataracts at the age of 28. Cerebral magnetic resonance imaging revealed no signal abnormalities. Electrophysiological studies confirmed sensory and motor demyelinating neuropathy with median motor conduction velocities of 30 m/s. He is a sporadic case and comes from a distant consanguinous family (his great-grandparents were cousins).

Genetic testing

We first evaluated the most common CMT genes by Sanger sequencing. We then performed NGS using a large custom panel of CMT genes and those for associated neuropathies, allowing the detection of a complex homozygous mutation, including one deletion and one insertion: c.379_385delAACTACTinsGATTCC
TTATATACCATTGTAGTCTTACTGCTTTTGGTGAACACA.
This induces a frameshift and a stop codon 23 amino acids further downstream producing a truncated pro-tein: p.Asn127Aspfs*23. This mutation was not found in the ExAC, dbSNP, Clin Var, or HGMD databases.

The *ABHD12* gene contains 13 exons and encodes a transmembrane protein with an extracellular catalytic domain in the C-terminal region (Fig. 1). The indel mutation is located in the third exon of the gene, and the resulting putative protein would contain only cytoplas-mic and transmembrane domains and be inactive. This new mutation and the 14 already published are pre-sented in a 2D-model (Fig. 1). No 3-D model of this protein is currently available.

Genotype-phenotype correlations: Tables 1 and 2

Only 14 mutations in *ABHD12* have been reported to date (Fig. 1), including 4 nonsense, 2 large deletions, 3 frameshifts, leading to a stop codon, 4 missense, and 1 splicing mutation among 33 patients from 18 families and 9 countries *(Fiskerstrand et al., 2010; Eisenberger et al., 2012; Chen et al., 2013; Nishiguchi et al., 2014; Yoshimura et al., 2015; Tingaud-Sequeira et al., 2017)*. We report a large complex homozygous indel mutation, leading to a frameshift and a stop codon in exon 3: p.Asn127Aspfs*23. We localized all 15 mutations, including ours, along the protein (Fig. 1). These 15 mutations are organized into 12 different genotypes: 9 homozygous and 3 compound heterozygous *(Fiskerstrand et al., 2010; Eisenberger et al., 2012; Chen et al., 2013; Nishiguchi et al., 2014; Yoshimura et al., 2015; Tingaud-Sequeira et al., 2017)*.

A precise analysis of the described phenotypes of the 34 known patients is shown in Table 1. Sen-sorineural deafness always occurred as the first fea-ture, generally during the late teens and as early as 3 years old and as late as 37 years old, except for patient X.2 for whom neuropathy occurred very early

Table 1. Phenotype of our mutated patient and those of patients from the literature.

				Polyneuropathy, cerebellar ataxia			Hearing loss		Retinis pigmentosa		Cataract	
Reference	Family	Patient (sex/age in years)	Country	Neuropathy	Ataxia	Age at onset (years)	Deafness	Age at onset (years)	Retinis pigmentosa	Age at onset (years)	Cataract	Age at onset (years)
Fiskerstrand et al., 2010	I.1	♀, 62	Norway	Demyelinating sensory polyneuropathy	N	38	Y	Twenties	Y	38	Y	28
	I.2	♂, 56	Norway	Demyelinating sensory polyneuropathy	Y	37	Y	Thirties	Y	37	Y	37
	I.3	♂, 46	Norway	Demyelinating sensory polyneuropathy	Y	38	Y	Childhood	Y	46	Y	25
	II.1	♂, 58	Norway	Demyelinating and axonal sensory polyneuropathy	N	51	Y	Twenties	Y	35	Y	26
	II.2	♂, 54	Norway	Motor neuropathy	N	53	Y	Twenties	Y	25	Y	25
	III.1	♀, 36	Norway	Demyelinating motor polyneuropathy	Y	/	Y	10	Y	36	Y	32
	IV.1	♂, 24	Norway	Demyelinating motor polyneuropathy	N	/	Y	Late in teens	N	/	Y	15
	V.1	♂, 16	Norway	Demyelinating sensory motor polyneuropathy	N	/	Y	13	N	/	Y	16
	VI.1	♂, 11	Algeria	Motor neuropathy	Y	3–4	N	/	N	/	N	/
	VI.2	♀, 10	Algeria	Motor neuropathy	Y	4–5	N	/	N	/	N	/
	VII.1	♂, 44	Algeria	Demyelinating sensory motor polyneuropathy	Y	7–10	Y	/	N	/	/	/
	VII.2	♀, 26	Algeria	Severe demyelinating sensory motor polyneuropathy	Y	4–9	Y	/	Y	/	Y	/
	VIII.1	♀, 26	Algeria	Severe demyelinating sensory motor polyneuropathy	Y	6–12	Y	6	N	/	N	/
	VIII.2	♀, 21	Algeria	Sensory motor polyneuropathy	N	/	/	/	/	/	/	/
	VIII.3	♀, 32	Algeria	Axonal sensory motor polyneuropathy	Y	16–20	Y	/	N	/	N	/
	IX.1	♂, 50	USA	Sensory neuropathy	Y	18	Y	17	Y	Twenties	Y	22
	X.1	♂, 24	UAE	Motor neuropathy	Y	/	Y	14	Y	Twenties	Y	15
	X.2	♂, 20	UAE	Demyelinating motor polyneuropathy	Y	2	Y	6	Y	/	Y	/
	X.3	♀, 6	UAE	Motor neuropathy	Y	/	Y	/	N	/	Y	/

Table 1. Continued

				Polyneuropathy, cerebellar ataxia			Hearing loss		Retinis pigmentosa		Cataract	
Reference	Family	Patient (sex/age in years)	Country	Neuropathy	Ataxia	Age at onset (years)	Deafness	Age at onset (years)	Retinis pigmentosa	Age at onset (years)	Cataract	Age at onset (years)
Eisenberger et al., 2012	XI.1	♀, 55	Lebanon	/	Y	50	Progressive severe to profound sensorineural	14	Y	18	Y	26
	XI.2	♂, 53	Lebanon	/	/	/	Progressive severe to profound sensorineural	14	Y	18	Y	29
Chen et al., 2013	XII.1	♀, 29	USA	Demyelinating sensory motor polyneuropathy	/	Early childhood	Progressive severe sensorineural	3	Y	/	/	/
Nishiguchi et al., 2014	XIII.1	♀, 78	Spain	Sensory neuropathy	N	/	Presbyacousia	/	Y	38	/	/
	XIII.2	♂, 75	Spain	Motor neuropathy	Y	/	Presbyacousia	/	Y	Thirties	/	/
	XIII.3	♀, 72	Spain	No neuropathy	Y	/	/	/	Y	Thirties	/	/
	XIII.4	♂, 66	Spain	No neuropathy	N	/	Presbyacousia	/	Y	Thirties	/	/
	XIV.1	♀, 38	Netherlands	Sensory neuropathy	N	/	Sensorineural	37	Y	22	/	/
	XV.1	♂, 34	Netherlands	Sensory neuropathy	Y	/	Moderate sensorineural	/	Y	31	/	/
Yoshimura et al., 2015	XVI.1	♂, 64	Japan	/	/	/	Progressive profound sensorineural	<10	Y	30	Y	45
	XVI.2	♂, /	Japan	/	/	/	Y	/	Y	/	/	/
	XVI.3	♂, /	Japan	/	/	/	Y	/	Y	/	/	/
	XVII.1	♂, 56	Japan	Sensory motor polyneuropathy	/	27	Progressive severe sensorineural	15	Y	22	Y	18
Tingaud-Sequeira et al., 2017	XVIII.1	♀, 31	Sweden	Demyelinating sensory motor polyneuropathy	Y	8	Progressive profound sensorineural	15	Y	16	Y	8
Our study	XIX.1	♂, 36	France	Sensory motor polyneuropathy	Y	15	Sensorineural	5	N	N	Y	28

Y, yes; N, no; /, no data.

Table 2. Genotype of our mutated patient and those from the literature.

Reference	Country	Family	Mutation type	Homozygous	Nucleotide change	Amino acid change	Localization	Domain
Fiskerstrand et al., 2010	Norway	I, II, III, IV, V	Frameshift	Homozygous	c.337_338delGAinsTTT	p.Asp113Phefs*15	Exon 3	EC
	Algeria	VI, VII, VIII	Frameshift	Homozygous	c.846_852dupTAAGAGC	p.His285fs*1	Exon 9	EC
	USA	IX	Nonsense	Homozygous	c.1054C>T	p.Arg352*	Exon 12	EC
	UAE	X	Large deletion	Homozygous	14 kb deletion including exon 1	/	Exon 1	cytoplasmic
Eisenberger et al., 2012	Lebanon	XI	Nonsense	Homozygous	c.193C>T	p.Arg65*	Exon 2	cytoplasmic
Chen et al., 2013	USA	XII	Nonsense	Heterozygous	c.1129A>T	p.Lys377*	Exon 12	EC
			Large deletion	Heterozygous	59 kb deletion including exon 1	/	Exon 1	cytoplasmic
Nishiguchi et al., 2014	Spain	XIII	Deletion	Heterozygous	c.319delA	p.Arg107Glufs*8	Exon 3	EC
			Missense	Heterozygous	c.605C>T	p.Thr202Ile	Exon 6	EC
	Netherlands	XIV	Missense	Homozygous	c.1116C>G	p.His372Gln	Exon 12	EC
	Netherlands	XV	Nonsense	Heterozygous	c.477G>A	p.Trp159*	Exon 4	EC
			Missense	Heterozygous	c.557G>C	p.Arg186Pro	Exon 5	EC
Yoshimura et al., 2015	Japan	XVI, XVII	Splicing	/	c.316+2T>A	/	Intron 2	Cytoplasmic
Tingaud-Sequeira et al., 2017	Sweden	XVIII	Missense	Homozygous	c.758G>C	p.Thr253Arg	Exon 8	EC
Our study	France	XIX	Deletion-Insertion	Homozygous	c.379_385delAACTACTins GATTCCTTATATAC-CATTGTAGTCTTACT-GCTTTTGGTGAA-CACA	p.Asn127Aspfs*23	Exon 3	EC

EC, extracellular.

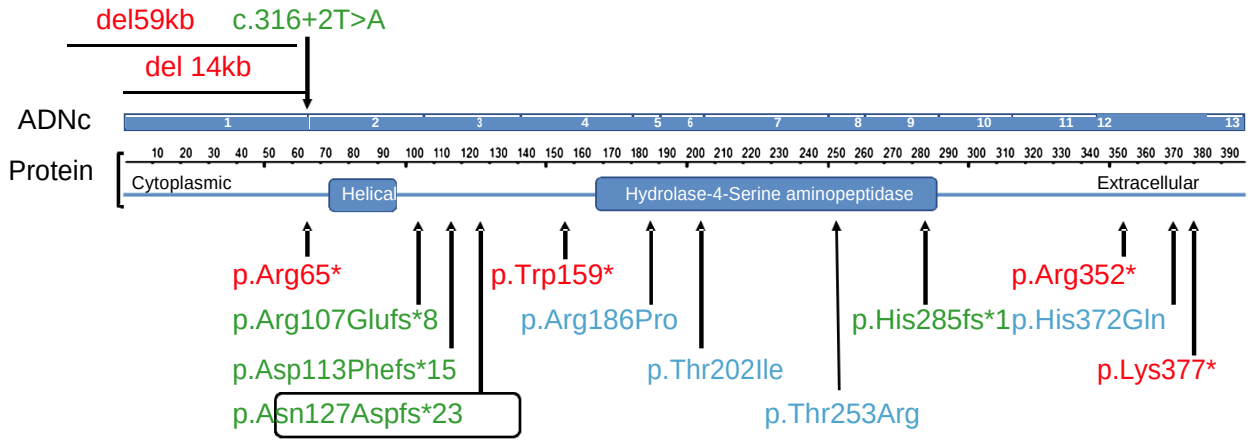


Figure 1. Two-dimensional model of the ABHD12 protein showing the cDNA with exons, corresponding protein with amino acids and protein domains with the location of the mutation reported in our patient and those from the literature. In red, mutations leading to a stop codon or deletion of the promotor; in green, mutations leading to a frameshift or those located in splice-sites; in blue, missense mutations. The mutation found in our patient is circled

(2 years old) and then deafness (6 years old) *(Fiskerstrand et al., 2010)*. Deafness was often progressive and varied from moderate to profound. Five patients were successfully fitted with cochlear implants *(Eisenberger et al., 2012; Chen et al., 2013; Yoshimura et al., 2015; Tingaud-Sequeira et al., 2017)*. The first ophthalmological symptom that appeared was cataract, occurring at a mean age of 25 years (min: 8 years; max: 45 years) followed by retinitis pigmentosa at a mean age of 29 years (min: 16 years; max: 46 years). Polyneuropathy was the most variable characteristic, which mostly appeared in the thirties, but appeared as early as 2 years and as late as 53 years of age. Some patients developed very early onset neuropa-thy, occurring in early childhood. This was the case for patients VI.1, VI.2, VII.1, VII.2, VIII.1, X.2, XII.1, and XVIII.1. Most were sensory-motor demyelinating neuropathies, except for patient VIII.3 who developed axonal neuropathy.

A more precise examination of the phenotypes revealed relatively similar symptom onset among fam-ilies with the same genotype. Indeed, patients from families I, II, III, IV, and V from Norway, who are homozygous for p.Asp113Phefs*15, presented neu-ropathy symptoms after 30 years and retinitis pigmen-tosa symptoms after 25 years of age, whereas patients in families VI, VII, and VIII from Algeria, who are homozygous for p.His285fs*1, presented neuropathy symptoms during childhood or their teen years.

However, it is very difficult to predict the sever-ity of a mutation. Indeed, all the symptoms of patient IX.1, from the USA, appeared during his teens and early twenties although he has the homozygous p.Arg352* mutation, for which the protein is almost complete. Patients from families VI, VII, and VIII also presented with neuropathy during their childhood, although they are homozygous for p.His285fs*1. Inversely, patient XI.1, from Lebanon, presented hearing and opthalmo-logical symptoms during her teens but neuropathy only at 50, although she bears the homozygous p.Arg65* mutation, which would not be expected to produce active protein. For our patient, bearing the homozy-gous p.Asn127Aspfs*23 mutation, deafness occurred during childhood and neuropathy during early adoles-cence. In contrast, patients from Norway, bearing the homozygous mutation p.Asp113Phefs*15 in the same area of the gene as our patient, presented symptoms later (retinitis pigmentosa after 25 years and neuropa-thy after 37 years of age).

It is difficult to establish a correlation for families XIII and XV with compound heterozygous mutations. The phenotype seems to be less severe, but there is little clinical information. A missense mutation is asso-ciated with either a deletion or a nonsense mutation, located close to the active site. Only two patients (XIV.1 and XVIII.1) have homozygous missense mutations, located on exons 12 and 8, respectively. These exons correspond to the extracellular domain and such muta-tions may disturb interactions with other molecules or other parts of the protein and affect protein function, as suggested by *Tingaud-Sequeira et al., 2017*. Indeed, Tingaud-Sequeira et al showed that the p.Thr253Arg mutation abolished ABHD12 activity.

Discussion

We report the case of a 36-year-old man with PHARC syndrome who developed sensorineural deafness at age 5, sensory-motor polyneuropathy at age 15, and cataracts at age 28. This patient has a complex homozygous mutation in the *ABHD12*

gene, composed of one deletion and one inser-tion: c.379_385delAACTACTinsGATTCCTTATATACCAT TGTAGTCTTACTGCTTTTGGTGAACACA, leading to a frameshift and a stop codon 23 amino acids fur-ther downstream, producing a truncated protein: p.Asn127Aspfs*23.

A review of the literature retrieved 11 other dis-tinct genotypes presented in 6 articles *(Fiskerstrand et al., 2010; Eisenberger et al., 2012; Chen et al., 2013; Nishiguchi et al., 2014; Yoshimura et al., 2015; Tingaud-Sequeira et al., 2017)*. PHARC syndrome is generally a slowly progressive disease, with the occurrence of the first symptoms during adolescence. Bilateral cataracts, deafness, and mostly demyelinat-ing peripheral neuropathy occur during adulthood. The appearance of ataxia is more variable, and retinitis pigmentosa appears during the twenties or thirties *(Fiskerstrand et al., 2010)*. Deafness can occur several years before sensory-motor neuropathy (Table 1). PHARC syndrome is probably underdiagnosed at that time, resulting in a delayed diagnosis. Attention must thus be given to young children suffering from deafness, who subsequently develop auditory neu-ropathy, or young adults presenting symptoms of CMT. The time between the appearances of deaf-ness, ophthalmological conditions, and neuropathy can be decades, as for our patient and several of those in the literature. A multidisciplinary approach for diagnosis and treatment is thus required. Molecular diagnosis can streamline the diagnosis using large NGS panels.

Our study found no obvious correlation between genotype and phenotype. Indeed, suspected mild homozygous mutations (e.g., p.Arg352*) led to the early onset of symptoms, whereas supposed severe homozygous mutations (e.g., p.Arg65*), producing a premature stop codon, led to the late onset of symptoms.

However, we found that phenotypes were very similar within a family carrying the same mutations in *ABHD12*, whereas they were very heterogeneous between different families carrying various genotypes. In addition, this autosomal recessive disease is not lethal, even when there is no functional ABHD12. These two points suggest: (1) the involvement of genetic modifiers, as for retinal dystrophies *(Nishiguchi et al., 2014)*; or (2) that other proteins may, at least par-tially, substitute for the function of ABHD12, depending on the genome of the patients. Studies of genetic mod-ifiers of retinal dystrophy, due to recessive mutations in *CRB1* gene (MIM604210), in inbred mice have demon-strated that a large region of chromosome 15 acts as a recessive suppressor(s) or dominant enhancer(s), leading to a highly variable spectrum of phenotypes *(Luhmann et al., 2015)*. Such a phenomenon may also

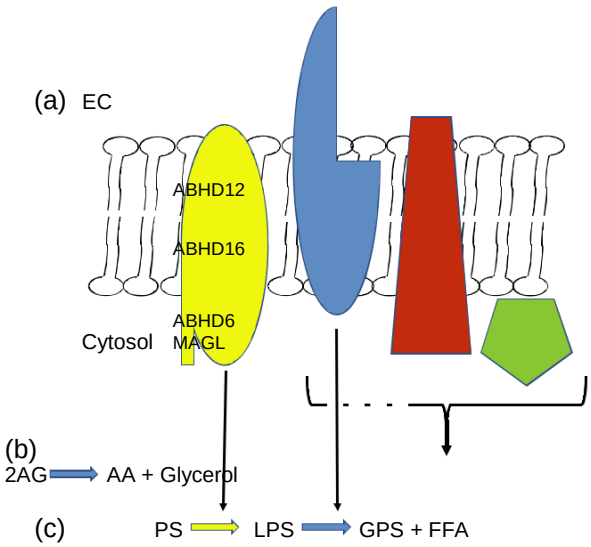


Figure 2. ABHD12 functions. a) Localisation of ABHD12, ABHD16, ABHD6, and MAGL with respect to the cell mem-brane. b) Enzymatic function of ABHD12: 2-AG hydroly-sis. c) Enzymatic function of ABHD12: LPS lipase. (PS: phosphatidylserine; LysoPS: lysophosphatidylserine; FA: fatty acid; GPS: glycerophosphoserine; DAG: diAcylglycerol; 2AG: 2 arachidonoylglycerol; AA: arachidonic acid)

explain the highly variable clinical features of PHARC syndrome. The intracellular localization of ABHD12, its tissue expression, and its functions (Fig. 2) may provide clues about other proteins that could substi-tute for the function of ABHD12. ABHD12 has been described to be a transmembrane protein that presents its active site at the extracellular surface *(Blankman et al., 2007)* (Fig. 2). High levels of ABHD12 protein have been shown in the brains of mice, as well as in microglia, macrophages, osteoclasts, and the prostate *(Fiskerstrand et al., 2010; Navia-Paldanius et al., 2012)*. It was also found, but at a lower level, in all tested tissues. No details are available on inner ear expres-sion *(Eisenberger et al., 2012)*. However, five patients with progressive severe to profound deafness were reported to benefit from cochlear implantation *(Eisen-berger et al., 2012; Chen et al., 2013; Yoshimura et al., 2015)*. This suggests a defect of the cochlea, rather than of the auditory nerve, as suggested by Yoshimura et al. (*2015*) and that ABHD12 may normally be found in this structure.

Two main functions of ABHD12 have been described: (1) it can hydrolyse 2-arachidonoylglycerol (2-AG) *(Blankman et al., 2007)* and (2) it is a lysophos-phatidylserine (LPS) lipase *(Blankman et al., 2013)* (Fig. 2).

Studies in animal and cellular models will be necessary to better understand the physiopathology

of PHARC and test therapeutic approaches. The pri-mary structure of ABHD12 is completely conserved between rodents and humans, consisting of typical - hydrolase domain protein fingerprints, including the lipase motif and catalytic triad *(Savinainen et al., 2012, Savinainen et al, 2016)*. Blankman et al. (*2013*) created an ABHD12 knockout mouse model to mimic PHARC syndrome. The ABHD12$^{-/-}$ mice developed several PHARC-related phenotypes at an advanced age, includ-ing defective auditory function and motor behaviour. In ABHD12$^{-/-}$ mice, brain lysophosphatidylserine lipids increase early in life (2–6 months), followed by age-dependent microglial activation and auditory and motor defects *(Blankman et al., 2013)*. Disruption of ABHD12 promoted an age-dependent neuroinflamma-tory response in the brain that temporally preceded the onset of cerebellar-mediated behavioural abnor-malities. However, this model did not exhibit the entire clinical spectrum of PHARC. Tingaud-Sequeira et al. therefore developed a zebrafish model of ABHD12 insufficiency in which *abhd12* knockdown morphants were characterized by progressive ataxia, motor skill impairment, disruption of the retinal architecture and retinotectal projections, inhibition of lens clarification, and a low number of mechanosensory hair cells in the inner ear and lateral line system. These severe pheno-types were rescued by introducing wild-type human *ABHD12* mRNA, but not mutated human *ABHD12* mRNA. In addition, patient-derived lymphoblastoid cell lines were generated from a patient present-ing a homozygous mutation that demonstrated the complete absence of ABHD12 activity, as assessed by qualitative and quantitative assessment of the activity-based protein profiling gel profiles, whereas those derived from the asymptomatic heterozygous mother exhibited 50% activity *(Chen et al., 2013)*. A complementary cell model could be created consisting of iPSc derived from fibroblasts of PHARC patients. These iPSc could be differentiated into various cells lines known to be affected in PHARC patients, such as motoneurons. This model could be highly useful for understanding the physiopathology of the disease and the development of therapeutic assays.

References

Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. Chem Biol 14:1347–1356.

Blankman JL, Long JZ, Trauger SA, Siuzdak G, Cravatt BF (2013). ABHD12 controls brain lysophosphatidylserine pathways that are deregulated in a murine model of the neurodegenerative disease PHARC. Proc Natl Acad Sci USA 110:1500–1505.

Chen DH, Naydenov A, Blankman JL, Mefford HC, Davis M, Sul Y, Barloon AS, Bonkowski E, Wolff J, Matsushita M, Smith C, Cravatt BF, Mackie K, Raskind WH, Stella N, Bird TD (2013). Two novel mutations in ABHD12: expansion of the mutation spectrum in PHARC and assessment of their functional effects. Hum Mutat 34:1672–1678.

Eisenberger T, Slim R, Mansour A, Nauck M, Nürnberg G, Nürnberg P, Decker C, Dafinger C, Ebermann I, Bergmann C, Bolz HJ (2012). Targeted next-generation sequencing identifies a homozygous nonsense mutation in *ABHD12*, the gene underlying PHARC, in a family clinically diagnosed with Usher syndrome type 3. Orphanet J Rare Dis 7:59.

Fiskerstrand T, H'mida-Ben Brahim D, Johansson S, M'zahem A, Haukanes BI, Drouot N, Zimmermann J, Cole AJ, Vedeler C, Bredrup C, Assoum M, Tazir M, Klockgether T, Hamri A, Steen VM, Boman H, Bindoff LA, Koenig M, Knappskog PM (2010). Mutations in ABHD12 cause the neurodegenerative disease PHARC: an inborn error of endocannabinoid metabolism. Am J Hum Genet 87:410–417.

Luhmann UF, Carvalho LS, Holthaus SM, Cowing JA, Greenaway S, Chu CJ, Herrmann P, Smith AJ, Munro PM, Potter P, Bainbridge JW, Ali RR (2015). The severity of retinal pathology in homozygous Crb1rd8/rd8 mice is dependent on additional genetic factors. Hum Mol Genet 24:128–141.

Navia-Paldanius D, Savinainen JR, Laitinen JT (2012). Bio-chemical and pharmacological characterization of human / - hydrolase domain containing 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12). J Lipid Res 53:2413–2424.

Nishiguchi KM, Avila-Fernandez A, van Huet RA, Corton M, Pérez-Carro R, Martín-Garrido E, López-Molina MI, Blanco-Kelly F, Hoefsloot LH, van Zelst-Stams WA, García-Ruiz PJ, Del Val J, Di Gioia SA, Klevering BJ, van de Warrenburg BP, Vazquez C, Cremers FP, García-Sandoval B, Hoyng CB, Collin RW, Rivolta C, Ayuso C (2014). Exome sequencing extends the phenotypic spectrum for ABHD12 mutations: from syndromic to nonsyndromic retinal degener-ation. Ophthalmology 121:1620–1627.

Savinainen JR, Saario SM, Laitinen JT (2012). The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid recep-tors. Acta Physiol (Oxf) 204:267–276.

Savinainen JR, Navia-Paldanius D, Laitinen JT (2016). A sensitive and versatile fluorescent activity assay for ABHD12. Methods Mol Biol 1412:179–189.

Tingaud-Sequeira A, Raldúa D, Lavie J, Mathieu G, Bordier M, Knoll-Gellida A, Rambeau P, Coupry I, Andre M, Malm E, Möller C, Andreasson S, Rendtorff ND, Tranebjaerg L, Koenig M, Lacombe D, Goizet C, Babin PJ (2017). Functional validation of ABHD12 mutations in the neurodegenerative disease PHARC. Neurobiol Dis 98:36–51.

Yoshimura H, Hashimoto T, Murata T, Fukushima K, Sugaya A, Nishio SY, Usami S (2015). Novel ABHD12 mutations in PHARC patients: the differential diagnosis of deaf-blindness. Ann Otol Rhinol Laryngol 124 (Suppl. 1):77S–83S.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the supporting information tab for this article.

III.3 – SH3TC2

Article N°3

(soumis à *Human Genetics*)

Four new pathogenic variants identified in the *SH3TC2* gene responsible for Charcot-Marie-Tooth disease associated with deafness and/or scoliosis

J. Lerat[1,2], C. Magdelaine[2,3], A. Lunati[2,3], H. Dzugan[2,3], M. Rego[3], E. Bieth[4], P. Calvas[4], P. Cintas[5], B. Gilbert-Dussardier[6], C. Goizet[7], H. Journel[8], L. Magy[9,2], A. Toutain[10], J. Urtizberea[11], F. Sturtz[2,3], A. Lia[2,3]

III. 3 *SH3TC2*

Les formes démyélinisantes autosomiques récessives des CMT peuvent être liées à des variants du gène *SH3TC2* (CMT4C, ou AR-CMTde-*SH3TC2)* (Mathis *et al*, 2015).

L'étude qui suit présente l'analyse d'une cohorte française de 350 patients souffrant de NP génétiques, à l'aide d'un NGS ciblé de 92 gènes NP.

Le diagnostic moléculaire était établi pour 201 patients (57%). Comme nous le suspections, la variation la plus fréquente était la duplication de *PMP22*, détectée chez 52 patients (15%). La délétion de *PMP22* était observée chez 29 patients (8%) et des variants pathogènes étaient détectés chez 120 patients (34%).

Parmi ces 120 patients, 40 patients présentaient une neuropathie démyélinisante. Le gène *SH3TC2* apparait comme le gène le plus fréquemment impliqué avec 13 patients (32.5%).

Quatre nouveaux variants pathogènes ont été identifiés dans *SH3TC2*: deux variants non-sens (p.Tyr970* et p.Trp1199*) et deux variants faux-sens (p.Leu1126Pro et p.Ala1206Asp).

Le phénotype est relativement homogène avec une polyneuropathie démyélinisante de début précoce, avant l'âge de 10 ans. La surdité est rapportée dans cinq cas et/ou la scoliose dans huit cas. Il manque cependant des données cliniques.

Les corrélations génotypes-phénotypes montrent que les patients avec deux variants non-sens, présentent tous une surdité et/ou une scoliose. La moitié des patients qui ont à la fois une scoliose et une surdité est en rapport avec des variants non-sens associés à un variant faux-sens. Les patients homozygotes ou hétérozygotes composites avec les variants faux-sens ont une surdité dans la moitié des cas.

Dans la littérature, la surdité est présente dans plus de 50% des cas, et/ou la scoliose dans 60% des cas (Yger *et al*, 2012 ; Senderek *et al*, 2003 ; Azzedine *et al*, 2008). Nos résultats sont effectivement du même ordre de grandeur. Chez les

deux plus jeunes patients de notre étude, ces symptômes pourraient apparaître secondairement.

SH3TC2 est le gène le plus fréquemment impliqué dans les NP démyélinisante autosomique récessive dans la population française. L'étude génotype/phénotype ne permet actuellement pas de prédire l'apparition des symptômes associés (surdité et/ou scoliose).

Four new pathogenic variants identified in the *SH3TC2* gene responsible for Charcot-Marie-Tooth disease associated with deafness and/or scoliosis

J. Lerat[1,2], C. Magdelaine[2,3], A. Lunati[2,3], H. Dzugan[2,3],C. Dejoie[3], M. Rego[3], E. Bieth[4], P. Calvas[4], P. Cintas[5], B. Gilbert-Dussardier[6,7], C. Goizet[8], H. Journel[9], L. Magy[2,10], A. Toutain[11], JA. Urtizberea[12], F. Sturtz[2,3], A. Lia[2,3]

[1] Service Oto-rhino-laryngologie, Centre hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges, France,

[2] EA6309, Université de Limoges, Limoges, France

[3] Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Centre hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges, France

[4] Service de Génétique Médicale, Centre hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France,

[5] Service de Neurologie et d'explorations fonctionnelles, Centre hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France,

[6] Service de Génétique Médicale, Centre hospitalier Universitaire de Poitiers, Poitiers, France,

[7] EA3808, Université de Poitiers, Poitiers, France

[8] Service de Neurogénétique, Centre hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France

[9] Service de Génétique Médicale, Centre hospitalier Bretagne Atlantique, Vannes, France

[10] Service de Neurologie, Centre hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges, France

[11] Service de Génétique, Centre hospitalier Universitaire de Tours, Tours, France

[12] Centre de Compétence Neuromusculaire, APHP, Filnemus, Centre hospitalier Hendaye, France

ABSTRACT

The autosomal recessive demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth can be due to *SH3TC2* gene pathogenic variants (CMT4C, AR-CMTde-*SH3TC2)*. We report on a series of 13 patients with AR-CMTde-*SH3TC2* among a French cohort of 350 patients suffering from all type of inheritance peripheral neuropathy. The *SH3TC2* gene appeared to be the most frequently mutated gene for demyelinating neuropathy in this series. Four new pathogenic variants have been identified: two nonsense variants (p.Tyr970*, p.Trp1199*) and two missense variants (p.Leu1126Pro, p.Ala1206Asp). The phenotype is fairly homogeneous.

KEY WORDS: *Charcot-Marie-Tooth; Neuropathy; Deafness; Scoliosis; SH3TC2; NGS*

Introduction

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is the most frequent inherited peripheral neuropathies (1/2500). So far, variants in more than 90 genes have been identified causing either the demyelinating or the axonal form. Duplication of the *PMP22* gene is the most frequent cause of the autosomal dominant demyelinating form. The autosomal recessive demyelinating form is often due to *SH3TC2* gene pathogenic variants (CMT4C, or AR-CMTde-*SH3TC2)* (Mathis et al. 2015). Patients with AR-CMTde-*SH3TC2* suffer from early severe neuropathy starting in the first decade. Scoliosis and deafness are often observed (Senderek *et al*. 2003; Azzedine *et al.* 2008; Yger *et al*. 2012).

We report on a series of 13 patients with AR-CMTde-*SH3TC2* among a French cohort of 350 patients suffering from all type of inheritance peripheral neuropathy.

Materials and Methods

After giving their informed consent, 350 patients suffering from inherited peripheral neuropathy were screened by *PMP22* multiplex-ligation-dependent-probe-amplification, followed by targeted next-generation-sequencing using a 92-gene custom panel designed for the diagnosis of CMT and associated neuropathies (detailed in Lerat *et al.* 2017). Sequences were mapped on hg19/GHCh37. Variants were evaluated with the Alamut-Mutation-Interpretation-Software (Interactive-Biosoftware, Rouen, France). Variants were verified by Sanger sequencing.

Results and discussion

Diagnosis was positive for 201 patients (57%). As expected, the most frequent pathogenic variant was *PMP22* duplication detected in 52 patients (15%). Deletion of *PMP22* was observed in 29 patients (8%) and pathogenic point variant were detected in 120 patients (34%).

Among these 120 patients diagnosed with point variants, 40 patients presented with a demyelinating neuropathy and the *SH3TC2* gene appeared to be the most frequently mutated with 13 diagnosed patients (32.5%). Details of their genotypes and phenotypes are presented in ***Table 1.*** In addition to already known pathogenic variants, four new pathogenic variants have been identified: two nonsense variants (p.Tyr970*, p.Trp1199*) and two missense variants (p.Leu1126Pro, p.Ala1206Asp).

Although some clinical information is missing, we can see that most of these patients presented with deafness (n=5) and/or scoliosis (n=8), except for the youngest patients in our series (patients IX, X and XIII). The phenotype is fairly homogeneous with sensori-motor demyelinating polyneuropathy with early onset before the age of 10, except for two patients with adulthood onset (patients XI and XII).

Genotype-phenotype correlations show that patients harboring two nonsense variants (Patients I to VII) all presented with scoliosis and/or deafness (strong grey color in *Table 1*). Four patients harbored a nonsense varaint associated with a missense variant (middle grey color in *Table 1*). Two of them presented with scoliosis and deafness. For the other two patients, these associated symptoms are currently absent. However, as these patients are young (9 and 12 years old), we cannot exclude that these symptoms may appear later. The last two patients have homozygous or compound heterozygous missense variants (mild grey color in *Table 1*) and one of them currently presents with hearing loss.

Conclusion

SH3TC2 appears to be an important gene involved in autosomal recessive CMT disease, often associated with deafness and/or scoliosis. It is important to pay attention to these associated symptoms in CMT patients in order to guide their diagnosis and to improve their medical care.

Conflict of interest: None.

Ethical approval: All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

References

Azzedine H, LeGuern E, Salih MA (2008). Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 4C. In: GeneReviews® (ed) Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al. 1993-2018. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1340/

Lerat J, Cintas P, Beauvais-Dzugan H, Magdelaine C, Sturtz F, Lia AS (2017) A complex homozygous mutation in ABHD12 responsible for PHARC syndrome discovered with NGS and review of the literature. J Peripher Nerv Syst 22(2):77-84.

Mathis S, Goizet C, Tazir M, Magdelaine C, Lia A-S, Magy L, Vallat JM (2015). Charcot-MarieTooth diseases: an update and some new proposals for the classification. J Med Genet 52(10):681-90.

Senderek J, Bergmann C, Stendel C, Kirfel J, Verpoorten N, De Jonghe P, Timmerman V, Chrast R, Verheijen MH, Lemke G, Battaloglu E, Parman Y, Erdem S, Tan E, Topaloglu H, Hahn A, Müller-Felber W, Rizzuto N, Fabrizi GM, Stuhrmann M, Rudnik-Schöneborn S, Züchner S, Michael Schröder J, Buchheim E, Straub V, Klepper J, Huehne K, Rautenstrauss B, Büttner R, Nelis E, Zerres K (2003)Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy. Am J Hum Genet 73(5):1106-19

Yger M, Stojkovic T, Tardieu S, Maisonobe T, Brice A, Echaniz-Laguna A, Alembik Y, Girard S, Cazeneuve C, Leguern E, Dubourg O (2012) Characteristics of clinical and electrophysiological pattern of Charcot-Marie-Tooth 4C. J Peripher Nerv Syst 17(1):112-22.

Supplementary data

Supp. Table S1: 92-gene panel used for NGS. It includes the 44 known CMT genes, 27 genes involved in HSN (Hereditary Sensitive Neuropathy) and HMN (Hereditary Motor Neuropathy) and 21 other genes of interest involved in neuropathies of differential diagnoses.

Table 1: Genotypes and Phenotypes of our 13 patients presenting a demyelinating hereditary neuropathy among a cohort of 350 French patients (NC: Not Communicated; /: not applicable; in Red: novel variants found)

Patient			Genotype					Polyneuropathy		Hearing loss		Scoliosis	Other symptoms
Reference Family	**Patient (gender/age in years)**	**Country**	**Mutation type**	**Zygosity**	**Nucleotide change**	**Amino acid change**	**Localization**	**Neuropathy**	**Age at onset (years)**	**Present (Y/N)**	**Age at onset (years)**	**Present (Y/N)**	
Patient I	F, 22	France	Nonsense	Homozygous	c.2860C>T	p.Arg954*	Exon11	Sensori-motor demyelinating (lower limbs)	NC	NC	/	**Y**	Sphincter disorders
Patient II	F, 29	France	Nonsense	Homozygous	c.2860C>T	p.Arg954*	Exon11	Sensori-motor demyelinating (lower limbs)	NC	NC	NC	**Y**	/
Patient III	M, 43	France	Nonsense	Homozygous	c.2860C>T	p.Arg954*	Exon11	Sensori-motor demyelinating	NC	N	/	**Y**	
Patient IV	F, 23	France	Nonsense + Nonsense	Compound heterozygous	c.2860C>T + c.3325C>T	p.Arg954*+ p. Arg1109*	Exon11+ Exon14	Sensori-motor demyelinating	2	NC	NC	**Y**	/
Patient V	F, 47	France	Nonsense	Homozygous	c.3325C>T	p.Arg1109*	Exon14	Sensori-motor demyelinating (lower limbs)	4	**Y**	NC	NC	Abnormal visual brainstem responses
Patient VI	F, 29	France	Nonsense + Nonsense	Compound heterozygous	c.2860C>T + c.2910C>A	p.Arg954* + **p.Tyr970***	Exon11+ Exon12	Sensori-motor demyelinating (lower limbs)	6	NC	NC	**Y**	/
Patient VII	M, 56	France	Nonsense	Homozygous	c.3321C>A	p.Tyr1107*	Exon14	Sensori-motor demyelinating	NC	**Y**	NC	**Y**	/
Patient VIII	F, 68	France	Nonsense + Missense	Compound heterozygous	c.2860C>T + c.3377T>C	p.Arg954* + **p.Leu1126Pro**	Exon11+ Exon 15	Sensori-motor demyelinating	9	**Y** Moderate slope curve	60	**Y**	/
Patient IX	F, 12	France	Nonsense + missense	Compound heterozygous	c.2860C>T +c.3511C>T	p.Arg954* + p.Arg1171Cys	Exon11+ Exon 16	Sensori-motor demyelinating	5	N	/	N	/
Patient X	M, 9	France	Nonsense + missense	Compound heterozygous	c.2860C>T + c.3511C>T	p.Arg954* + p.Arg1171Cys	Exon11+ Exon 16	Sensori-motor demyelinating	<5	NC	NC	NC	Autism
Patient XI	F, 71	France	Missense + Frameshift	Compound heterozygous	c.2642A>G + c.3596G>A	p.Asn881Ser + **p.Trp1199***	Exon11+ Exon16	Sensori-motor demyelinating (lower limbs)	45	**Y**	< 10	**Y**	/
Patient XII	M, 83	France	missense	Homozygous	c.3617C>A	**p.Ala1206Asp**	Exon16	Sensori-motor demyelinating	73	**Y** Moderate slope curve	NC	NC	/
Patient XIII	M, 27	France	Missense + Missense	Compound heterozygous	c.1969G>A + c.2642A>G	p.Glu657Lys + p. Asn881Ser	Exon11+ Exon11	Sensori-motor demyelinating	NC	N	/	N	Muscular pain

III.4 – PRPS1

Article N°4

(soumis à *Clinical Genetics*)

A novel pathogenic variant in *PRPS1* responsible for CMTX5 discovered with NGS in the French population

Justine LERAT[1,2], Corinne MAGDELAINE[1,3], Paco DEROUAULT[1], Eric BIETH[4], Hélène BEAUVAIS-DZUGAN[1,3] , Marie-Christine ARNE-BES[5], Franck STURTZ[1,3] and Anne-Sophie LIA[1,3]

III.4 *PRPS1*

Le déficit en (PRS)1 est une pathologie rare, lié à des variants faux-sens du gène *PRPS1*, pouvant conduire à 4 phénotypes différents : Arts Syndrome(MIM 301835), maladie de Charcot-Marie-Tooth lié à l'X (CMTX5 ou XL-CMTin-*PRPS1*, MIM 311070), surdité non-syndromique liée à l'X (DFNX1, MIM 304500) et Phosphoribosylpyrophosphate Synthetase Superactivité (MIM 300661). Le mode de transmission est lié à l'X. Les hommes atteints ont des degrés variables de neuropathie centrale et périphérique. La surdité est le point commun entre ces pathologies.

CMTX5 est caractérisée par une NP, une surdité de début précoce et une neuropathie optique.

Seuls sept variants pathogènes sont rapportés jusqu'alors et aucune corrélation génotype-phénotype n'a été mise en évidence (Kim *et al*, 2007; Park *et al*, 2013; Synofzik *et al*, 2014; Robusto *et al*, 2015; Nishikura *et al*, 2018).

PRPS1 a une structure crystallographique, puisqu'elle est composée de trois dimères.

Nous rapportons le cas d'un homme de 35 ans, qui a présenté dès l'enfance des signes de CMT et de surdité, associés à une neuropathie optique bilatérale, sans signe de rétinite pigmentaire.

Une nouveau variant hémizygote à la position chromosomique X:106882604, du gène *PRPS1*, c.202A>T, p.(Met68Leu) a été mis en évidence. Ce variant est prédit pour entrainer une altération de l'affinité entre les différentes sous-unités du dimère, empêchant ainsi la formation de l'hexamère.

CMTX5 est probablement sous-diagnostiqué, du fait du chevauchement possible entre les différents phénotypes liés à *PRPS1*. Les patients suivis pour NP associée à une surdité neurosensorielle et atrophie optique pendant l'enfance, devraient être testés pour *PRPS1*.

A novel pathogenic variant in *PRPS1* responsible for CMTX5 discovered with NGS in the French population

Running title: *PRPS1* in the French population

Justine LERAT[1,2], Corinne MAGDELAINE[1,3], Paco DEROUAULT[3], Hélène BEAUVAIS-DZUGAN[1,3], Eric BIETH[4], Marie-Christine ARNE-BES[5], Franck STURTZ[1,3] and Anne-Sophie LIA[1,3]

[1] EA6309, Université de Limoges, Limoges, France

[2] Service Oto-Rhino-Laryngologie et Chirurgie Cervico-Faciale, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges, France

[3] Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges, France

[4] Explorations neurophysiologiques, Centre SLA, Centre de référence de pathologie neuromusculaire, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France

[5] Unité d'explorations neurophysiologiques, Consultation spécialisée neuromusculaire, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We are thankful to the nucleic acid platform BISCEM, University of Limoges, France. We also thank Sylvie Gautier for English revision.

ABSTRACT

CMTX5 is characterized by peripheral neuropathy, early-onset sensorineural hearing impairment, and optic neuropathy. Only seven variants have been reported and no genotype-phenotype correlations have been established so far. PRPS1 has a crystallographic structure, as it is composed of three dimers that constitute a hexamer. Here we report on the case of a 35-year-old male, who had presented CMT and deafness since childhood associated to bilateral optic neuropathy without any sign of retinitis pigmentosa. A new hemizygous variant on chromosomic position X:106882604, in the *PRPS1* gene, c.202A>T, p.(Met68Leu) was found. This change is predicted to lead to an altered affinity between the different subunits in the dimer, thereby preventing the hexamer formation. CMTX5 is probably under-diagnosed, as an overlap among the different features due to *PRPS1* exists. Patients who developed polyneuropathy associated to sensorineural deafness and optic atrophy during childhood should be assessed for *PRPS1*.

KEY WORDS: *Charcot-Marie-Tooth; Neuropathy; Deafness; PRPS1; NGS*

Introduction

Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase (PRS) I deficiency is a rare medical condition caused by missense variants in PRPS1 that lead to four different phenotypes: Arts Syndrome (MIM 301835), X-linked Charcot-Marie-Tooth (CMTX5, MIM 311070) or X-linked non-syndromic sensorineural deafness (DFNX1, MIM 304500) and Phosphoribosylpyrophosphate Synthetase Superactivity (MIM 300661). All four are X-linked recessively inherited and in two of them the males affected display variable degrees of central and peripheral neuropathy. Hearing loss is the only feature common to all four disorders and the only symptom observed in DFNX1 or DFN2.

CMTX5 is characterized by peripheral neuropathy, early-onset sensorineural hearing impairment, and optic neuropathy. Hypotonia, gait disturbances, and loss

of deep tendon reflexes with an onset between 10 and12 years of age have also been reported [1;2]. Only seven variants have been reported and no genotype-phenotype correlations have been established so far[1;3;4;5;6].

PRPS1 has a crystallographic structure, as it is composed of three dimers that constitute a hexamer [7].

Here we report on the case of a 35-year-old male, who had presented CMT and deafness since childhood associated to a new variant in *PRPS1*. Phenotype-genotype correlation of these specific features have been looked for thanks to a review of the literature.

Materials and Methods

Patient: A 35-year-old male who had presented features of CMT since the age of 8, was sampled with peripheral blood collected in EDTA tubes after giving his informed consent. The protocol was in accordance with French ethical legislation.

Mutation detection: Genomic DNA was extracted by standard methods (Illustra DNA Extraction kit BACC3, GEHC). Next Generation Sequencing (NGS) strategy was performed using a 92-gene custom panel designed for CMT and associated neuropathies diagnosis (***Supplementary data***). It included the 44 known CMT genes (*eg: PRPS1*), 27 genes involved in HSN (Hereditary Sensitive Neuropathy) and HMN (Hereditary Motor Neuropathy) and 21 other genes of interest involved in neuropathies of differential diagnosis. The amplified library was prepared with Ion P1 HiQ Template OT2 200 kit (Ampliseq Custom (Life technologies)), sequenced on Proton sequencer (Life technologies), and mapped to the human reference sequence hg19/GHCh37. Variants were evaluated with Alamut Mutation Interpretation Software (Interactive Biosoftware, Rouen, France) using the reference sequence NM_002764.3 for *PRPS1* gene. Databases such as ExAC Genome browser (http://exac.broadinstitute.org), dbSNP135 (National Center for Biotechnology Information [NCBI], Bethesda, Maryland, USA, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/), Clin Var

(www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar) and HGMD professional (www.hgmd.cf.ac.uk) were also screened. Variants of interest were verified by Sanger sequencing using forward and reverse primer pairs. The *PRPS1* variant was submitted to the corresponding LOVD database at http://databases.lovd.nl/shared/variants/0000438212 (patient ID00207340).

3D Protein model: The tridimensional structure of the Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 protein was obtained from the crystal structure of the human PRS-I protein (Protein Database, PDB:2H06; https://www.rcsb.org) [7].

A review of the literature was performed, based on PubMed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), and all the published articles presenting variants on *PRPS1* and neuropathies were collected. Seven variants are reported to be involved in CMTX5.

Results

Clinical description: The patient was a 35-year-old male, who had suffered from sensory and motor neuropathy since the age of eight. The symptoms were more important and severe in the lower limbs. Amyotrophy was present on limb extremities, especially in the lower limbs. No arched feet were observed. Step walking is observed and the patient cannot walk anymore. Electrophysiologic studies revealed a mixed neuropathy, with Nerve Conduction Velocity (NCV) of 20-30m/s on electromyogram, associated to polyphasic responses and an amplitude of 400µV. Nerve biopsy did not show any demyelinating characteristic. No mental retardation was observed. Profound bilateral sensorineural hearing loss had been diagnosed before one year of age. Auditory Brainstem Responses (ABR) could not be carried out. CT-scan and MRI of the petrous bones were normal. There was no tinnitus but gait disturbances were present. Hearing aids were inefficient and were removed at the age of 15. Communication was based on sign language, but with some difficulties due to reduced hand mobility. Bilateral optic

neuropathy without any sign of retinitis pigmentosa was also present. He was a sporadic case and came from a non-consanguineous family.

Genetic testing: NGS strategy using a custom large panel of CMT genes and associated neuropathies was performed and allowed the detection of the hemizygous variant on chromosomic position X:106882604, c.202A>T, p.(Met68Leu). This missense variant was not found in ExAC, dbSNP, Clin Var and HGMD databases. Neither had it been reported in our French cohort of 3412 patients suffering from inherited peripheral neuropathies (personal data). Familial segregation was also in accordance with an asymptomatic carrier mother. Therefore, this variant is located in exon 2 corresponding to the N-terminal domain of the protein. This variant is located in a crucial region, the flag region of the dimer interface (***Figure 1a) b) and c)***). This change is predicted to lead to an altered affinity between the different subunits in the dimer, thereby preventing the hexamer formation. This substitution could result in the total absence of the PRPS1 hexamer.

This new variant and the seven already published for CMTX5 are presented on a 3D-model (***Figure 1d, e and f***). Like our p.Met68Leu variant, variants on amino acids p.Glu43 (brown), p.Ile107 (pink), p.Met115 (blue), and potentially p.Ala121 (orange) are also located in or close to the dimer interface, but unlike those for p.Gln277 (Purple) , neither p.Val309 (yellow).

Discussion

We report on the case of a 35-year-old male who had developed severe mixed sensory-motor polyneuropathy since the age of eight associated to profound deafness. This patient had a new missense variant, c.202A>T, p.(Met68Leu), located on the head of the protein, in the dimerization region.

Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 (PRSP1) is an essential enzyme in the primary stage of *de novo* and salvage nucleotide synthesis, as it catalyzes the phosphoribosylation of ribose 5-phosphate and ATP to 5-phosphoribosyl-1-

pyrophosphate [8]. It acts as a common substrate for a purine (adenine and guanine), pyrimidine (cytosine and thymine), and pyridine nucleotide (NAD and NADP) synthesis. The functional form of the enzyme has been shown to have a hexameric structure. The PRPS1 monomer has five-stranded parallel β sheets and four α-helices on each of the N- and C-terminal domains, flanked by a short antiparallel β sheet protruding from the central core (a "flag" region). In addition to catalytic and regulatory binding sites, PRPS1 has functional residues involved in intersubunit interactions and in maintaining the stability of the enzyme [1]. The physiologically active PRS unit is a hexamer that consists of three homodimers arranged in a propeller-like shape, each with an active site and two regulatory allosteric sites, I and II. The active site comprises binding sites for both ATP and ribose-5-phosphate and is located at the interface of two domains within one homodimer [2]. Three PRPS genes have been identified; PRPS1 and PRPS2 are widely expressed, while PRPS3 is transcribed only in testis.

The *PRPS1* gene contains seven exons. Missense variants in *PRPS1* are rare and may result in increased or decreased PRS-I activity. The missense variants in CMTX5 are located in exons 2 and 3, close to the flag region/dimerization domain and/or ATP binding site, except for the Synofzik *et al* patient in exon 6 [4]. In our case, the variant is located at the center of the dimerization zone, between two homopolymers, which will probably induce an absence of dimerization, and then an absence of hexamer creation. In our patient's mother, the protein from the normal allele can only be associated to a normal monomer that leads to 50% of present and functional PRPS1 hexamers. His mother had no symptom, meaning that this dose may be sufficient for a normal phenotype. Five of the other CMT5X variants p.Glu43Asp, p.Ile107Val, p.Met115Val, pMet115Thr and potentially p.Ala121Gly are located in or close to this dimerization area. The other two variants, p.Gln277Pro and p.Val309Phe are located at different sites, and do not seem to be linked to a dimerization problem.

In a series of cases from one German family harboring p.Gln277Pro, enzyme activity had been tested and was not detectable in the male index patient, was reduced in the symptomatic carrier sister and normal in the asymptomatic carrier mother [4]. Thus, a correlation is suggested between the enzymatic residual activity, the degree of X chromosome inactivation skewing and the phenotype in the female. As a consequence, the location of the variant and the residual enzymatic activity could be the main determinants of the phenotypic manifestations in males and females [4]. In women, when variant does not prevent dimerization, heterodimers are possible with normal allele and mutated allele that may lead to different clinical presentation, depending on the action of the different created dimers and then hexamers. Indeed, only 1/64 of the hexamers is constituted with only normal monomers.

The spectrum of recognized disorders caused by disrupted PRS-1 function is broad and ranges from adult-onset gout to severe neurological impairment in childhood. Thus, the variants in the *PRPS1* gene can lead to different conditions due to hypoactivity, such as X-linked CMT type 5 (CMTX5), Arts syndrome and X-linked deafness (DFNX1); or PRS superactivity, which can induce gout [9]. Therefore, PRS superactivity is characterized by overproduction of uric acid and its accumulation in both blood (hyperuricemia) and urine (hyperuricosuria), leading to the accumulation of urate crystals in the joints, causing gout. Individuals with PRS superactivity develop stones in the kidneys or bladder, leading to acute renal failure [10;11].

The CMTX5 disease is characterized by a unique symptom triad of peripheral neuropathy, optic neuropathy, and early-onset (prelingual) bilateral profound sensorineural hearing loss. Homogeneity is observed between the different patients, especially for age at onset and severity. Mixed sensori-motor polyneuropathy before the age of 10, prelingual severe to profound sensorineural hearing loss, optic atrophy during teenages (***Table 2)***. Electrophysiology has

revealed mixed features of segmental demyelination and axonal loss [1]. Neither mental retardation nor recurrent infections have been observed.

Arts syndrome causes severe neurological problems in males. Females can be affected by Arts syndrome, but they present with much milder phenotypes. Male teenagers display symptoms of sensorineural hearing loss, ataxia, intellectual disability, muscle tone hypotonia, and developmental delay [12].

DFNX1 is characterized by bilateral, sensorineural, and moderate to profound hearing loss. The onset is prelingual or postlingual. Deafness can be progressive or not. The audiogram shape is variable [13].

Synofzik *et al* described a male with an intermediate phenotype between CMTX5 and Arts syndrome and a carrier female affected with DFN2 due to X-chromosome inactivation skewing [4]. Nevertheless, phenotypic heterogeneity exists among patients with CMTX5 which explains why a Korean family has been reported with CMTX5 features without any sign of optic atrophy [3]. The burden between the different forms of diseases due to *PRPS1* pathogenic variants is very narrow, and some conditions are at the cross lines between two conditions. The severity and progression of CMTX5 phenotypes vary according to the sites of the *PRPS1* pathogenic variants [3]. An overlap of CMTX5 and Arts syndrome has been reported with the c.830A>C, p.(Gln277Pro) pathogenic variant and also X-linked hearing loss and neuropathy with pathogenic variants c.337G>T, p.(Ala113Ser) and c.925G>T p.(Val309Phe) [4;5]. For the overlap between CMTX5 and Arts syndrome, cerebral MRI has revealed cerebellar and parietal atrophy, evidence of structural central nervous system damage [4]. Nishikura *et al* have also recently reported this overlap between CMTX5 and Arts syndrome with transient proximal weakness, showing Gower's sign and waddling gait after suffering from febrile illness [6].

Among a same family, symptoms can also differ. Female carriers might exhibit mild symptoms in case of CMTX5[1;5].Affected females have been described by Almoguera *et al* in a three-generation Spanish family, with optic atrophy and

retinitis pigmentosa as common female features [14]. Ataxia, progressive peripheral neuropathy and hearing loss could be possible variable additional features. This was due to the pathogenic variant c.46T>C, p.(Ser16Pro). Fiorentino *et al* have recently shown that affected females presenting retinal dystrophy with interocular asymmetry in five families with nine affected women due to pathogenic variants c.47C>T, p.(Ser16Phe);c.586C>T, p.(Arg196Trp); c.641G>C, p.(Arg214Pro); and c.640C>T, p.(Arg214Trp). Sensorineural hearing loss was reported in three cases, it was progressive and had started during childhood but had been delayed. It was linked to pathogenic variants c.641G>C, p.(Arg214Pro) and c.640C>T, p.(Arg214Trp). Thus, one differential diagnosis of this presentation is Usher syndrome [15]. As only females were affected in this cohort of five families, we may think that, when inherited in the hemizygous state in males, this could be male embryonic lethal [15].

The phenotypic presentation in males is determined by the exact *PRPS1* pathogenic variant, its structural effect on the enzyme and the residual enzyme activity. There is no way to completely rule out the possibility that other pathogenic variants in coding or regulatory regions of the genome may contribute to modifying the phenotype.

For loss-of-function pathogenic variants resulting in sensorineural hearing loss, Sadenosylmethionine (SAM) supplements in patients with Arts syndrome help to replenish ATP and GTP concentrations to some extent, thereby slowing the progression of sensorineural hearing loss and alleviating some of the neurological symptoms [16].

Conclusion

CMTX5 is a rare condition, with only seven pathogenic variants already reported. However, it is presumably under-diagnosed, as an overlap among the different features due to *PRPS1* exists. Patients who developed polyneuropathy associated to sensorineural deafness and optic atrophy during childhood should

be assessed for *PRPS1*. Here, we report the first novel pathogenic variant in the French population.

References

1. Kim H-J, Sohn K-M, Shy ME, Krajewski KM, Hwang M, Park J-H, Jang SY, Won HH, Choi BO, Hong SH, Kim BJ, Suh YL, Ki CS, Lee SY, Kim SH, Kim JW.. Variants in PRPS1, which encodes the phosphoribosyl pyrophosphate synthetase enzyme critical for nucleotide biosynthesis, cause hereditary peripheral neuropathy with hearing loss and optic neuropathy (cmtx5). Am J Hum Genet 2007;81(3):552-8.

2.de Brouwer APM, van Bokhoven H, Nabuurs SB, Arts WF, Christodoulou J, Duley J. PRPS1 variants: four distinct syndromes and potential treatment. Am J Hum Genet 2010;86(4):506-18.

3.Park J, Hyun YS, Kim YJ, Nam SH, Kim S-H, Hong YB, Park JM, Chung KW, Choi BO.. Exome Sequencing Reveals a Novel PRPS1 Variant in a Family with CMTX5 without Optic Atrophy. J Clin Neurol 2013;9(4):283-8.

4.Synofzik M, Müller vom Hagen J, Haack TB, Wilhelm C, Lindig T, Beck-Wödl S, Nabuurs SB, van Kuilenburg AB, de Brouwer AP, Schöls L. Xlinked Charcot-Marie-Tooth disease, Arts syndrome, and prelingual non-syndromic deafness form a disease continuum: evidence from a family with a novel PRPS1 variant. Orphanet J Rare Dis 2014;9:24.

5.Robusto M, Fang M, Asselta R, Castorina P, Previtali SC, Caccia S, Benzoni E, De Cristofaro R, Yu C, Cesarani A, Liu X, Li W, Primignani P, Ambrosetti U, Xu X, Duga S, Soldà G. The expanding spectrum of PRPS1-associated phenotypes: three novel variants segregating with X-linked hearing loss and mild peripheral neuropathy. Eur J Hum Genet 2015;23(6):766-73.

6.Nishikura N, Yamagata T, Morimune T, Matsui J, Sokoda T, Sawai C, Sakaue Y, Higuchi Y, Hashiguchi A, Takashima H, Takeuchi Y, Maruo Y. X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 5 with recurrent weakness after febrile illness. Brain Dev 2018; pii: S0387-7604(18)30167-0

7.Li S, Lu Y, Peng B, Ding J. Crystal structure of human phosphoribosylpyrophosphate synthetase 1 reveals a novel allosteric site. Biochem J 2007;401(1):39-47

8.Becker MA, Heidler SA, Bell GI, Seino S, Le Beau MM, Westbrook CA, Neuman W, Shapiro LJ, Mohandas TK, Roessler BJ, et al. Cloning of cDNAs for human phosphoribosylpyrophosphate synthetases 1 and 2 and X chromosome localization of PRPS1 and PRPS2 genes. Genomics 1990;8(3):555-61.

9.Agrahari AK, Sneha P, George Priya Doss C, Siva R, Zayed H. A profound computational study to prioritize the disease-causing variants in PRPS1 gene. Metab Brain Dis 2018;33(2):589-600.

10.Sperling O, Eilam G, Sara-Persky-Brosh, De Vries A. Accelerated erythrocyte 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthesis. A familial abnormality associated with excessive uric acid production and gout. Biochem Med 1972;6(4):310-6.

11.Zoref E, De Vries A, Sperling O. Mutant feedback-resistant phosphoribosylpyrophosphate synthetase associated with purine overproduction and gout. Phosphoribosylpyrophosphate and purine metabolism in cultured fibroblasts. J Clin Invest 1975;56(5):1093-9.

12.Arts WF, Loonen MC, Sengers RC, Slooff JL. X-linked ataxia, weakness, deafness, and loss of vision in early childhood with a fatal course. Ann Neurol1993;33(5):535-9.

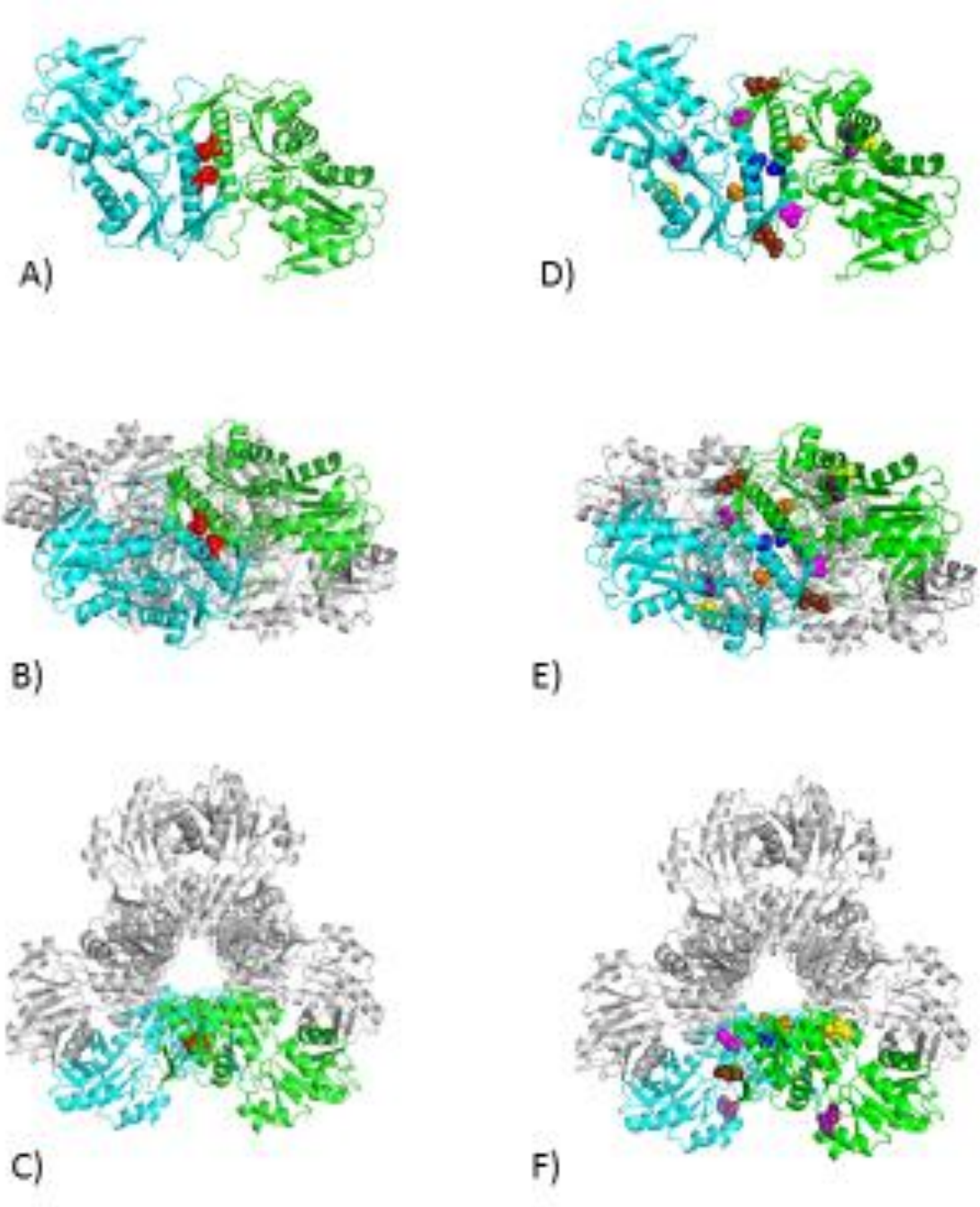
13.Liu X, Han D, Li J, Han B, Ouyang X, Cheng J, Li X, Jin Z, Wang Y, Bitner-Glindzicz M, Kong X, Xu H, Kantardzhieva A, Eavey RD, Seidman CE, Seidman JG, Du LL, Chen ZY, Dai P, Teng M, Yan D, Yuan H.. Loss-of-function variants in the PRPS1 gene cause a type of nonsyndromic X-linked sensorineural deafness, DFN2. Am J Hum Genet 2010;86(1):65-71.

14.Almoguera B, He S, Corton M, Fernandez-San Jose P, Blanco-Kelly F, López-Molina MI, García-Sandoval B, Del Val J, Guo Y, Tian L, Liu X, Guan L, Torres RJ, Puig JG, Hakonarson H, Xu X, Keating B, Ayuso C. Expanding the phenotype of PRPS1 syndromes in females: neuropathy, hearing loss and retinopathy. Orphanet J Rare Dis 2014;9:190.

15.Fiorentino A, Fujinami K, Arno G, Robson AG, Pontikos N, Arasanz Armengol M, Plagnol V, Hayashi T, Iwata T, Parker M, Fowler T, Rendon A, Gardner JC, Henderson RH, Cheetham ME, Webster AR, Michaelides M, Hardcastle AJ; 100,000 Genomes Project, the Japan Eye Genetic Consortium and the UK

Inherited Retinal Dystrophy Consortium. Missense variants in the X-linked gene PRPS1 cause retinal degeneration in females. Hum Mutat 2018;39(1):80-91.
16.Mittal R, Patel K, Mittal J, Chan B, Yan D, Grati M, Liu XZ. Association of PRPS1 Variants with Disease Phenotypes. Dis Markers 2015;2015:127013.

Figure 1: PRPS1 3D model and CMTX5 variants location. Amino acid involved in CMT5X are presented in red balls: Met68 (red) on the dimerization interface for A), B) and C); Glu43 (brown), Ile107 (pink), Met115 (blue), Ala121 (orange), Gln277 (purple) and Val309 (yellow) for D), E) and F). PRPS1 dimer structure is represented with one monomer in blue and the other one in green. In the hexamer structure, one dimer is colored and the other two are in grey. A) and D) Dimer structure; B) and E) PRPS1 hexamer structure, side view; C) and F) PRPS1 hexamer structure, front view.



Reference	Country	Family	Mutation type	Zygosity	Nucleotide change	Amino acid change	Localization	Domain
Kim *et al*, 2007	Europe	I	missense	hemizygous heterozygous	c.129A>C	p.Glu43Asp	Exon 2	Flag region Close to the dimerization domain
	Korea	II			c.344T>C	p.Met115Thr	Exon 3	Dimerization domain
Park *et al*, 2013	Korea	III	missense	hemizygous heterozygous	c.362C>G	p.Ala121Gly	Exon 3	ATP binding site
Synofzik *et al*, 2014	Germany	IV	missense	hemizygous heterozygous	c.830A>C	p.Gln277Pro	Exon 6	C-terminal domain, ATP and R5P binding sites
Robusto *et al*, 2015	Italy	V	missense	hemizygous heterozygous	c.343A>G	p.Met115Val	Exon 3	Dimerization domain
		VI			c.925G>T	p.Val309Phe	Exon 7	Type 1 PRTases domain
Nishikura *et al, 2018*	Japan	VII	missense	hemizygous heterozygous	c.319A>G	p.Ile107Val	Exon 3	Dimerization domain
Our study	France	VIII	missense	hemizygous heterozygous	**c.202A>T**	**p.Met68Leu**	Exon 2	Dimerization domain

Table 1: Genotypes of our mutated patient and from the literature

				Polyneuropathy		Hearing loss		Optic neuropathy		Other symptoms
Reference	Family	Patient (gender/age in years)	Country	Neuropathy	Age at onset (years)	Degree	Age at onset (years)	Degree	Age at onset (years)	
Kim *et al*, 2007	I	M(3-32)	Europe	Mixed polyneuropathy	< 5	NA	< 3	NA	20	None
	II	M(4-28)	Korea	Mixed polyneuropathy	10	NA	< 3	NA	10	None
Park *et al*, 2013	III	M, 15	Korea	Sensory motor mixed polyneuropathy, more severe in the lower limbs	6	Severe to Profound	< 1	Absent		None
Synofzik *et al*, 2014	IV	M, 36	Germany	Mixed polyneuropathy	30	Severe to Profound	< 1	NA	12	Recurrent severe infections, Bulbar paresis Flaccid tetraparesis Ataxia Behavioural and mental disturbances
Robusto *et al*, 2015	V	M	Italy	Axonal sensori-motor neuropathy	<12	Moderate to Profound Progressive	<10	Absent		None
	VI	M		Axonal motor neuropathy	<14	Moderate to Profound Progressive	<10			
Nishikura *et al, 2018*	VII	M (13-NA)	Japan	Sensory motor mixed polyneuropathy	8	NA	< 1	Absent		Transient proximal muscle weakness, sh Gowers' sign and waddling gait after febrile illness.
Our study	VIII	M, 35	France	Sensory motor mixed polyneuropathy, more severe in the lower limbs	8	Profound	< 1	Bilateral	NA	None

Table 2: Phenotypes of our mutated patient and from the literature. (M: Male; NA: Not Available; /: No Data; R5P:Ribose5Phosphate)

III.5 – NEFL

Article N°5

(soumis à *Journal of the Peripheral Nervous System)*

A novel pathogenic variant in *NEFL* responsible for deafness associated with peripheral neuropathy discovered with NGS and review of the literature.

Justine LERAT[1,2], Corinne MAGDELAINE[1,3], Pascal CINTAS[4], Hélène BEAUVAIS-DZUGAN[1,3] ,Caroline ESPIL[5] , Karima GHORAB[6], Paco DEROUAULT[1],Franck STURTZ[1,3] and Anne-Sophie LIA[1, 3]

III.5 *NEFL*

Les neurofilaments sont des filaments intermédiaires spécifiques des neurones, essentiels pour la croissance radiaire des axones au cours du développement et le maintien du diamètre axonal. Les variants de *NEFL* sont associées à CMT1F, CMT2E et CMTDIG, et sont décrits dans moins de 1% des cas de CMT. A ce jour, 35 variants ont été rapportés chez 173 patients CMT. Cependant, seuls six variants chez 17 patients (de sept familles de quatre pays différents, principalement européens) sont associés à la surdité : (p.Glu90Lys, p.Asn98Ser, p.Asn98Thr, p.Leu268Pro, p.Cys322_Asn326del, p.Glu396Lys) (Abe *et al*, 2009; Sivera *et al*, 2013; Fabrizi *et al*, 2006; Zuchner *et al*, 2004; Horga *et al*, *2017*). Aucune correlation genotype-phénotype n'a été établie jusqu'à présent.

Nous rapportons le cas d'une patiente de 69 ans, qui a développé une neuropathie sensitivo-motrice dès 45 ans, associée à une surdité de perception moyenne, avec une chute sur les aigues. A l'aide du NGS, un nouveau variant pathogène de *NEFL* a été trouvé : c.269A>G, p.(Glu90Gly).

En cas de surdité, la neuropathie peut être démyélinisante ou axonale. Il est à noter que la pathologie est plus sévère et de début plus précoce dans ces cas. Cependant, nous faisons face à un manque d'information, et ne pouvons déterminer la chronologie des symptômes. Likar *et al* a décrit une patiente avec le variant, p.(Asn98Ser), et un audiogramme avec une surdité moyenne sur les fréquences aigues (Likar *et al*, 2018). Ceci correspond à l'audiogramme de notre patiente, et pourrait donc être considérée comme un début de corrélation génotype-phénotype.

La surdité est fréquemment corrélée aux variants p.(Glu90Lys) et p.(Asn98Ser). Nous avons localisé sur un modèle 2D de la protéine NEFL, les sept variants hétérozygotes, incluant le nôtre. Alors que les variants *NEFL*, en général, semblent étalés sur l'ensemble de la protéine, ceux associés à une surdité semblent localisés au niveau de « hot spots ».

A novel pathogenic variant in *NEFL* responsible for deafness associated with peripheral neuropathy discovered with NGS and review of the literature.

Justine LERAT[1,2], Corinne MAGDELAINE[1,3], Hélène BEAUVAIS-DZUGAN[1,3] ,Caroline ESPIL[4] , Karima GHORAB[1,5], Paco DEROUAULT[3],Franck STURTZ[1,3] and Anne-Sophie LIA[1, 3]

[1] Univ. Limoges, MMNP, EA 6309, F-87000 Limoges, France

[2] CHU Limoges, Service Oto-Rhino-Laryngologie et Chirurgie Cervico-Faciale, F-87000 Limoges, France

[3] CHU Limoges, Service Biochimie et Génétique Moléculaire, F-87000 Limoges, France

[4] CHU Bordeaux, Service de Pédiatrie, F-33076, France

[5] CHU Limoges, Service Neurologie, F-87000 Limoges, France

Running title: *NEFL* and Peripheral Neuropathy with Deafness

Abstract

Neurofilaments are neuron-specific intermediate filaments essential for the radial growth of axons during development and the maintenance of the axonal diameter. *NEFL* pathogenic variants are associated with CMT1F, CMT2E, and CMTDIG, and have been described in less than 1% of CMT cases, resulting in 35 variants being described to date in 173 CMT patients. However, only six variants in 17 patients have been reported with deafness. No genotype-phenotype correlations have been established so far.

We report on an additional case: a 69-year-old female, who had presented an axonal sensory and motor neuropathy since the age of 45, associated with moderate sensorineural hearing loss, with a slight slope on the high frequencies. Thanks to NGS, a novel pathogenic variant was found, c.269A>G, p.(Glu90Gly). Hearing impairment is often linked to CMT due to *NEFL*, especially in pathogenic variants p.Glu90Lys and p.Asn98Ser, and in our pathogenic variant p.Glu90Gly. All these pathogenic variants are located at hot spots, in the head domain and the two ends of the rod domain of the protein.

Key words: *Charcot-Marie-Tooth; Neuropathy; Deafness; NEFL; NGS*

Introduction

The most common inherited peripheral neuropathy is Charcot-Marie-Tooth disease (CMT), with a prevalence of 1/2500. CMT has a wide range of phenotypes and is genetically heterogeneous. Neurofilaments are neuron-specific intermediate filaments essential for the radial growth of axons during development and the maintenance of the axonal diameter. Pathogenic variants in the *NEFL* gene encoding NFL were first identified as a cause of autosomal dominant CMT in 2000 (*De Jonghe et al., 2001*). The association of *NEFL* pathogenic variants with different phenotypes including a demyelinating dominant or recessive CMT1 form (CMT1F), an axonal dominant CMT2 form (CMT2E) and dominant intermediate CMT (CMTDIG) has been confirmed (*Jordanova et al., 2003; Shin et al., 2008; Abe et al., 2009*). Pathogenic variants in the *NEFL* gene have been described in less than 1% of CMT cases (*Horga et al., 2017*), resulting in 35 being described to date in 173 CMT patients. However, only six variants in 17 patients have been reported with deafness (*Horga et al., 2017*). No genotype-phenotype correlations have been established so far.

Here we report on the case of a 69-year-old female, who presented CMT and deafness associated to a new variant. Phenotype-genotype correlations of these specific features have been looked for thanks to a review of the literature.

Materials and Methods

Patient: A 69-year-old female who had presented features of CMT since the age of 45, was sampled with peripheral blood collected in EDTA tubes after giving her informed consent. The protocol was in accordance with French ethical legislation.

Pathogenic variant detection: Genomic DNA was extracted by standard methods (Illustra DNA Extraction kit BACC3, GEHC). Next Generation Sequencing (NGS) strategy was performed using a 92 genes custom panel designed for CMT and associated neuropathies diagnosis (***Supplementary data***).

It included the 44 known CMT genes, 27 genes involved in HSN (Hereditary Sensitive Neuropathy) and HMN (Hereditary Motor Neuropathy) and 21 other genes of interest involved in neuropathies of differential diagnosis. The amplified library was prepared with Ion P1 HiQ Template OT2 200 kit (Ampliseq Custom (Life technologies)), sequenced on Proton sequencer (Life technologies), and mapped to the human reference sequence GHCh38. Variants were evaluated with Alamut Mutation Interpretation Software (Interactive Biosoftware, Rouen, France) using the NM_006158 reference sequence for the *NEFL* gene. Databases such as ExAC Genome browser (http://exac.broadinstitute.org), dbSNP135 (National Center for Biotechnology Information [NCBI], Bethesda, Maryland, USA, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/), Clin Var (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar) and HGMD professional (www.hgmd.cf.ac.uk) were also screened. Pathogenic variants of interest were verified by Sanger sequencing using forward and reverse primer pairs.

A review of the literature was performed, based on PubMed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), and all the published articles presenting pathogenic variants on *NEFL* and neuropathies were collected. Thirty-five variants have already been reported in *NEFL*, but only six variants are reportedly involved in peripheral neuropathies associated to deafness.

Results

Clinical description:

The patient was a 69-year-old female, who had suffered from sensory and motor neuropathy since the age of 45. Her symptoms were more important and severe in the lower limbs. Amyotrophy was present on limb extremities, more important in the lower limbs. Arched feet were observed. Electrophysiologic studies revealed an axonal neuropathy. Sensorineural hearing loss was moderate, with a slight slope on the high frequencies (thresholds of 65 dB on right ear, and 60 dB on left ear). Speech understanding was in accordance with the results (***Fig. 1).***

There was no tinnitus or dizziness. Hearing aids were efficient. She was a familial case, as her mother and her son also had the same symptoms. An autosomal dominant transmission was suspected thanks to the pedigree.

Genetic testing:

NGS strategy using a custom large panel of CMT genes and associated neuropathies was implemented and allowed to detect the heterozygous pathogenic variant on chromosomic position 8:24813761, c.269A>G, p.(Glu90Gly).

This missense pathogenic variant was not found in ExAC, dbSNP, Clin Var and HGMD databases. It is located in exon 1 and corresponds to the head of the protein. Neither had it ever been observed in our French cohort of 3412 patients suffering from peripheral neuropathies (personal data). This novel variant was also found in the patient's mother and son.

2D Protein Model:

The pathogenic variant observed in our patient, is located just after the filament head domain. The new variant and the six already published for neuropathy associated to deafness are presented on a 2D-model (***Fig. 2***). All these variants are located at the end of a specific domain, apart from the deletion.

Establishing genotype–phenotype correlations in patients with *NEFL*-neuropathies associated to deafness is difficult as the prevalence and number of variants are low.

Discussion

We report on the case of a 69-year-old female who had developed axonal sensory-motor polyneuropathy since the age of 45 associated to moderate deafness on the high frequencies. This patient had a new missense variant, located on the head of the protein.

In our cohort of 3412 CMT patients, a second female patient, aged 10 years, had a *NEFL* pathogenic variant, c.293A>G, p.(Asn98Ser), already reported with the same phenotype (*Yoshihara et al., 2002*). She had suffered from sensory and

motor neuropathy since the age of two. Her symptoms were present in the lower limbs. Electrophysiologic studies were in favour of a demyelinating neuropathy. Sensorineural deafness had been present since birth. She was also a familial case, as her mother had the same symptoms. An autosomal dominant transmission was suspected.

Only six pathogenic variants responsible for CMT and deafness, (p.(Glu90Lys), p.(Asn98Ser), p.(Asn98Thr), p.(Leu268Pro), p.(Cys322_Asn326del), p.(Glu396Lys)) have been reported to date, in 17 patients from seven families and four different countries, mainly in Europe (*Abe et al., 2009; Silvera et al., 2013; Fabrizi et al., 2006; Zuchner et al., 2004; Hortega et al., 2017*) (***Table 1***). All these seven pathogenic variants, including ours, have been localized along the protein (***Fig.2)***. These seven pathogenic variants are all heterozygous genotypes. Patients carrying the p.(Asn98Ser), p.(Cys322_Asn326del) and p.(Glu396Lys) pathogenic variants were initially diagnosed with or tested genetically for spinocerebellar ataxia or Friedreich's ataxia, some of them with dysarthria and/or nystagmus. Cerebellar atrophy on brain MRI was observed in four patients with the p.(Asn98Ser) and p.(Glu396Lys) pathogenic variants (*Hortega et al., 2017*).

Neuropathy onset among these 17 patients, varied between the first decade (5 families), and mid-forties, with 62.5% of patients having an early-onset presentation (<3 years) often associated with delayed walking. *NEFL*-related CMT was classified as axonal, demyelinating in identical proportions. To date, each specific described pathogenic variant seems to lead to a specific form of neuropathy. In case of deafness-associated phenotype, five axonal or three demyelinating neuropathies are observed. We noticed that the condition is often severe with an early onset. However, there is a lack of information about hearing impairment. As a consequence, we cannot determine the chronology of the different symptoms. We report on two female cases, whereas only men index cases have been reported with this phenotype sofar (***Table2).***

Abe *et al* noticed that pathogenic variants in *NEFL* are often complicated with hearing impairment (*Abe et al., 2009*). Deafness has been reported in 64% of the patients who presented one of the two p.(Glu90Lys) and p.(Asn98Ser) variants (*Hortega et al., 2017*). Likar *et al* described a female patient with the p.(Asn98Ser) variant leading to mild sensorineural hearing loss between 0.125 kHz and 4 KHz, moderate hearing loss between 4 KHz and 8 KHz, delayed motoric milestones, difficulty walking, progressive distal weakness of the lower and upper limbs, cerebellar dysfunction, peripheral motor and sensory neuropathy (*Likar et al., 2018*). The described audiologic curves correspond to ours and could therefore be described as a phenotype-genotype correlation. (***Fig. 2).***We suggest that a complete audiometry test should be performed in patients presenting CMT associated with these variants, as deafness may be underestimated.

NEFL gene contains four exons and is located in 8p.21.2, between 8:24,950,954-24,956,868**.** Two mRNAs, approximately 2.6 and 4.3 kb long, exist (*Hurst et al., 1987*). The *NEFL* gene encodes a light chain neurofilament protein of 68kDa ***(Fig.1).*** Neurofilaments are type IV intermediate filament heteropolymers composed of light, medium, and heavy chains. They contain three major domains: globular N-terminal head (2-92 amino acid position), alpha-helical central rod (93-396 amino acid position) and C-terminal tail 397-543 amino acid position). The rod domain is required for co-assembly between subunits, while the head and tail domains are involved in regulation of assembly, axonal transport and radial growth (*Horga et al., 2017*)(***Fig. 1)***. Neurofilaments comprise the axoskeleton and they functionally maintain the neuronal caliber. They may play a role in intracellular transport to axons and dendrites. They are one of the most abundant cytoskeletal components of neuronal cells (*Jordanova et al., 2003*). *NEFL* pathogenic variants associated to neuropathy and deafness are located in the head, the rod coils 1A, 2A and 2B and the beginning of the tail. Hortega *et al* noticed that pathogenic variants in the head domain and the two ends of the rod domain

accounted for 75% of kindreds. Four common pathogenic variants within these regions (p.(Pro8Arg), p.(Pro22Ser), p.(Asn98Ser) and p.(Glu396Lys)) were observed in 55% of kindreds presenting CMT. Only three pathogenic variants (p.(Glu140*), p.(Ala149Val) and p.(Glu210*)) were located in coil 1B. No pathogenic variants were observed in linker regions of the rod domain or the B tail subdomain (*Hortega et al., 2017*). In case of CMT associated to deafness, the seven pathogenic variants are at the end of the head or coil 1A, 2A and 2B domains. Only the deletion is in the middle of coil 2B domain. No variant is observed for that phenotype in coil 1B. That may suggest that the variant location may be associated with real key elements of the protein, or hot spots. A 3D model of the protein could be useful to better understand the functional frame. However, it is not available now.

Interestingly, our case with the new c.269A>G, p.(Glu90Gly) variant, presented a mild axonal sensory motor neuropathy with a late age at onset (mid-forties), while in patient from the literature harbouring p.(Glu90Lys), a severe early-onset demyelinating sensory motor polyneuropathy had been observed. Only one amino acid is different from the previous variant described, but the phenotypes are very divergent: the neuropathy form, age at onset and severity are the opposite. The same tendency is also observed with the c.293A>G, p. (Asn98Ser) and c.293A>C, p.(Asn98Thr) variants: the neuropathy form is different but age at onset close. That may suggest that those amino acids and their position are fundamental for the protein function.

On sural nerve biopsies, onion bulbs as well as a few axonal regeneration clusters sometimes associated with an onion bulb were recognized. There was paucity of large myelinated fibres and a few large fibres had thin myelin sheaths. Irregular foldings of myelin sheaths were observed (*Jordanova et al., 2003*). In cases of chronic axonal neuropathy, focal accumulations of NF with axonal swellings, like giant axons, and significant secondary demyelination are observed (*Fabrizi et al., 2006*). In case of the p.(Glu396Lys) pathogenic variant, decrease in neurofilament

abundance has been described as a pathologic marker. The lack of NF aggregates suggests that they occur proximally leading to subsequent alterations in the axonal cytoskeleton. The small axonal caliber, along with the normal molecular architecture of nodes and paranodes, explains the reduced velocities detected in some patients (*Pisciotta et al., 2015*). Transient transfection studies also indicate that p.Glu90Gly and p.Asn98Ser result in NFL assembly defects (*Leung et al., 2006*). The p.(Asn98Ser) and p.(Glu396Lys) pathogenic variants resulted in cytoplasmic protein aggregates. These aggregates appear to prevent NEFL from transporting to axons. Depletion of neurofilaments in axons would result in small axon caliber, hence, slowed conduction velocity (*Yang et al., 2016*). This is in accordance with the study of the functional protein described just above. However, nothing has been described in the cochlea. As we have little information about hearing impairment, we cannot determine if deafness is due to cochlea suffering or due to auditory nerve alteration. For instance, our patient presented a sensorineural neuropathy without any sign of auditory neuropathy.

Animal models have been developed and Gentil *et al* demonstrated that pathogenic variants in different functional domains of NEFL have different effect on filament assembly (*Gentil et al., 2013*). The mouse *NEFL* mutants, NEFLGln333Pro and NEFLPro8Arg, exhibited different assembly properties in SW13-cells, which lack endogenous intermediate filaments. As a consequence, NEFLGln333Pro could be refolded and form coil–coiled dimers, in cultured cells by induction of HSPA1 and HSPB1. Celastrol, an inducer of chaperone proteins, was tested on NEFLGln333Pro and NEFLPro8Arg, and revealed that sensory and motor neurons do not respond identically. Indeed, celastrol had a protective effect in motor neurons in NEFLGln333Pro, while it had a protective effect in large-sized sensory neurons in NEFLPro8Arg (*Gentil et al., 2013*). The Nefl $^{Asn98Ser/+}$ mice are an excellent model to study the pathogenesis of CMT2E. Those mice had a noticeable tremor, and most of the time a hindlimb clasping phenotype. Electron

microscopic analysis of sciatic nerves showed a reduction in the number of neurofilaments, an increase in the number of microtubules and a decrease in the axonal diameters. However, hearing impairment was not assessed. (*Adebola et al., 2015*)

Pathogenic variants in *NEFL* responsible for CMT are rare and associated to various phenotypes. However, deafness is often linked to neuropathy, especially in pathogenic variants p.(Glu90Lys) and p.(Asn98Ser), and in our p.(Glu90Gly) pathogenic variant. All these pathogenic variants are located at hot spots, in the head domain and the two ends of the rod domain. Deafness is probably underdiagnosed and should be more described so as to better understand the physiopathology common to these two conditions. As a consequence, in case of neuropathy associated to deafness, *NEFL* sequencing should be considered and vice versa deafness impairment testing should be performed in neuropathic patients harbouring *NEFL* pathogenic variant.

Conflict of interest: None.

Acknowledgements

We are thankful to the nucleic acid platform BISCEM, University of Limoges, France. We also thank Sylvie Gautier for English revision.

References

1. De Jonghe P, Mersivanova I, Nelis E, Del Favero J, Martin JJ, Van Broeckhoven C, Evgrafov O, Timmerman V. Further evidence that neurofilament light chain gene pathogenic variants can cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. Ann Neurol 2001;49(2):245-9
2. Jordanova A, De Jonghe P, Boerkoel CF, Takashima H, De Vriendt E, Ceuterick C, Martin JJ, Butler IJ, Mancias P, Papasozomenos SCh, Terespolsky D, Potocki L, Brown CW, Shy M, Rita DA, Tournev I, Kremensky I, Lupski JR, Timmerman V.. Pathogenic variants in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease. Brain 2003;126(Pt 3):590-7
3. Shin JS, Chung KW, Cho SY, Yun J, Hwang SJ, Kang SH, Cho EM, Kim SM, Choi BO. NEFL Pro22Arg pathogenic variant in Charcot-Marie-Tooth disease type 1. J Hum Genet 2008;53(10):936-40
4. Abe A, Numakura C, Saito K, Koide H, Oka N, Honma A, Kishikawa Y, Hayasaka K. Neurofilament light chain polypeptide gene pathogenic variants in Charcot-Marie-Tooth disease: nonsense pathogenic variant probably causes a recessive phenotype. J Hum Genet 2009;54(2):94-7
5. Horga A, Laurà M, Jaunmuktane Z, Jerath NU, Gonzalez MA, Polke JM, Poh R, Blake JC, Liu YT, Wiethoff S, Bettencourt C, Lunn MP, Manji H, Hanna MG, Houlden H, Brandner S, Züchner S, Shy M, Reilly MM. Genetic and clinical characteristics of NEFL-related Charcot-Marie-Tooth disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry2017;88(7):575-85
6. Yoshihara T, Yamamoto M, Hattori N, Misu K, Mori K, Koike H, Sobue G.. Identification of novel sequence variants in the neurofilament-light gene in a Japanese population: analysis of Charcot-Marie-Tooth disease patients and normal individuals. J Peripher Nerv Syst 2002;7(4):221-4
7. Sivera R, Sevilla T, Vílchez JJ, Martínez-Rubio D, Chumillas MJ, Vázquez JF, Muelas N, Bataller L, Millán JM, Palau F, Espinós C. Charcot-Marie-Tooth disease: genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. Neurology 2013;81(18):1617-25
8. Fabrizi GM, Cavallaro T, Angiari C, Cabrini I, Taioli F, Malerba G, Bertolasi L, Rizzuto N. Charcot-Marie-Tooth disease type 2E, a disorder of the cytoskeleton. Brain 2007 ;130(Pt 2):394-403
9. Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröder JM, Vance JM.. Pathogenic variants in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. Nat Genet 2004;36(5):449-51
10. Likar T, Hasanhodžić M, Teran N, Maver A, Peterlin B, Writzl K. Diagnostic outcomes of exome sequencing in patients with syndromic or non-syndromic hearing loss. PLoS ONE 2018;13(1):e0188578.
11. Hurst J, Flavell D, Julien JP, Meijer D, Mushynski W, Grosveld F. The human neurofilament gene (NEFL) is located on the short arm of chromosome 8. Cytogenet Cell Genet 1987;45(1):30-2
12. Pisciotta C, Bai Y, Brennan KM, Wu X, Grider T, Feely S, Wang S, Moore S, Siskind C, Gonzalez M, Zuchner S, Shy ME.. Reduced neurofilament expression in cutaneous nerve fibers of patients with CMT2E. Neurology 2015;85(3):228-34
13. Leung CL, Nagan N, Graham TH, Liem RKH. A novel duplication/insertion pathogenic variant of NEFL in a patient with Charcot-Marie-Tooth disease. Am J Med Genet A 2006;140(9):1021-5
14. Yang Y, Gu L-Q, Burnette WB, Li J. N98S pathogenic variant in NEFL gene is dominantly inherited with a phenotype of polyneuropathy and cerebellar atrophy. J Neurol Sci 2016;365:46-7
15. Gentil BJ, Mushynski WE, Durham HD. Heterogeneity in the properties of NEFL mutants causing Charcot-Marie-Tooth disease results in differential effects on neurofilament assembly and susceptibility to intervention by the chaperone-inducer, celastrol. Int J Biochem Cell Biol 2013;45(7):1499-508
16. Adebola AA, Di Castri T, He C-Z, Salvatierra LA, Zhao J, Brown K, Lin CS, Worman HJ, Liem RK.. Neurofilament light polypeptide gene N98S pathogenic variant in mice leads to neurofilament network abnormalities and a Charcot-Marie-Tooth Type 2E phenotype. Hum Mol Genet 2015;24(8):2163-74

Figure 1: *Pure-Tone audiogram and speech audiometry of our patient*

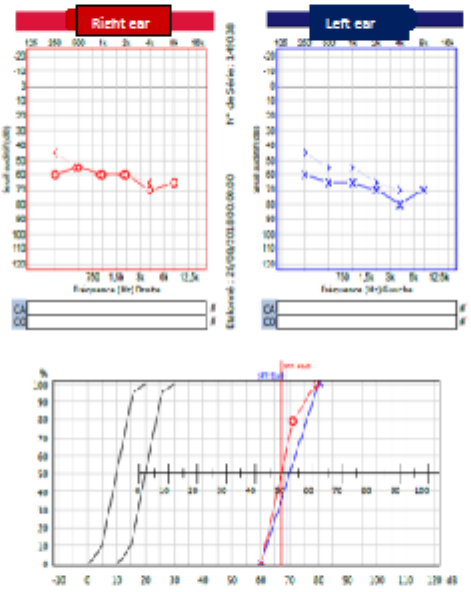
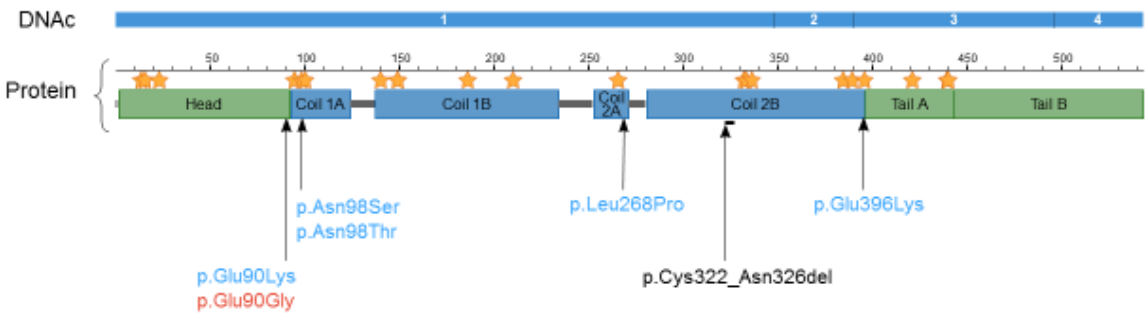


Figure 2: *2-D model of the NEFL protein showing the cDNA with exons, corresponding protein with amino acids and protein domains with the location of the pathogenic variant reported in our patient and those from the literature. Variants leading to neuropathy associated to deafness are specified (in red our new variant). Other variants are indicated by stars.*



Reference	Country	Family	Mutation type	Zygosity	Nucleotide change	Amino acid change	Localization	Domain
Abe *et al*, 2009	Japan	I,	missense	heterozygous	c.268G>A	p.Glu90Lys	Exon 1	Head
Abe *et al*, 2009	Japan	II, III	missense	heterozygous	c.293A>G	p.Asn98Ser	Exon 1	Rod-Coil 1A
Sivera *et al*, 2013	Spain	IV	missense	heterozygous	c.293A>C	p.Asn98Thr	Exon 1	Rod-Coil 1A
Fabrizi *et al*, 2006	Italy	V,VI	missense	heterozygous	c.803C>T	p.Leu268Pro	Exon 1	Rod- Coil 2A
Fabrizi *et al*, 2006	Italy	VII	deletion	heterozygous	c.963_977delATGCCGGGGCATGAA	p.Cys322_Asn326del	Exon 1	Rod- Coil 2B
Zuchner *et al*, 2004	Germany	VIII	missense	heterozygous	c.1189G>A	p.Glu396Lys	Exon 3	Rod- Coil 2B
Our study	France	IX	missense	heterozygous	c.269A>G	p.Glu90Gly	Exon 1	Head

Table 1: *Genotypes of our patient and from the literature*

				Polyneuropathy		Hearing loss		Other symptoms
Reference	Family	Patient (sex/age in years)	Country	Neuropathy	Age at onset (years)	Y or N	Age at onset (years)	
Abe *et al*, 2009	I	M, 15	Japan	Sensory motor demyelinating polyneuropathy	<1	Y	NA	/
Abe *et al*, 2009	II	M, 16	Japan	Sensory motor demyelinating polyneuropathy	<2	Y	NA	Waddling gait
	III	M, 5		Motor demyelinating polyneuropathy	<1	Y	NA	Mental retardation, wide-based gait
Silvera *et al*, 2013	IV	M, 54	Spain	Sensory motor axonal polyneuropathy	3	Y	NA	Wheelchair bound in 4th decade, death at 58
Fabrizi *et al*, 2006	V	M, 59	Italy	Sensory motor axonal polyneuropathy	50s	Y	NA	/
	VI	M, 50	Italy	Sensory motor axonal polyneuropathy	48	Y	NA	Tuberculosis
Fabrizi *et al*, 2006	VII	M, 46	Italy	Sensory (motor) axonal polyneuropathy	10s	Y	NA	Sensory ataxia, postural tremor
Zuchner *et al*, 2004	VIII	M, 82	Germany	Mild sensory motor axonal neuropathy	46	Y Slowly progressive	46	NA
Our study	IX	F, 69	France	Sensory motor axonal polyneuropathy	45	Y Moderate, slight slope	NA	/

Table 2: *Phenotypes of our patient and from the literature. (M: Male; F: Female; NA: Not Available; /: No Data; Y: Yes)*

III.6 – MPZ

Article N°6

(soumis à *European Journal of Human Genetics*)

Peripheral neuropathy associated with deafness

due to two novel variants in *MPZ*

in a French cohort

Justine LERAT[1,2], Corinne MAGDELAINE[1,3], Hélène BEAUVAIS-DZUGAN[1,3] , Marie-Christine ARNE-BES[4], Laurent MAGY[5] , Paco DEROUAULT[1], Franck STURTZ[1,3] and Anne-Sophie LIA[1, 3]

III.6 MPZ

MPZ est une molécule d'adhésion, représentant 50% des protéines de la gaine de myéline. Elle est nécessaire à la myélinisation normale du système nerveux périphérique. Les phénotypes liés aux variants *MPZ* peuvent être des formes démyélinisantes autosomiques dominantes (CMT1B), axonales autosomiques dominantes (CMT2I et CMT2J), intermédiaires autosomiques dominantes (CMTDID) ou bien le syndrome de Dejerine Sottas.

A ce jour, 242 variants ont été rapportés, mais seulement 18 associent CMT et surdité (p.Arg36Trp, p.His39Pro, p.Asp75Val, p.Glu97Val, p.Arg98Cys, p.Arg98His, p.Pro105Thr, p.Ser111Cys, p.Ser111Pro, p.Ile114fs, p.Tyr119Cys, p.Asp121Asn, p.Thr124Met, p.Ile135Thr, p.Gly137Ser, p.Tyr145Ser, p.Arg227Ser et c.614 +2T>G) (De Jonghe *et al*, 1999; Misu *et a.*, 2000; Starr *et al*, 2003; Kilfoyle *et al*, 2006; Kabzi´nska *et al*, 2007, Duan *et al*, 2016; Sanmaneechai *et al*, 2015). La plupart de ces variants sont localisés dans les domaines extracellulaires et transmembranaires, en rapport avec les zones d'adhésion, à l'exception de p.(Arg227Ser), localisée dans le cytosol (Sanmaneechai *et al*, 2015). Ainsi, une altération de cette région fonctionnelle et de la structure tertiaire peut modifier l'adhésion et la compaction de la myéline.

Nous rapportons deux cas cliniques : une femme de 68 ans avec une forme démyélinisante, et une femme de 75 ans avec une forme axonale. La surdité était présente chez les deux femmes, avec notamment un audiogramme tonal avec une surdité en pente descendante sur les fréquences aigues, pour la première patiente. Pour la patiente A, la surdité a débuté à l'âge de 35 ans, tout comme la neuropathie périphérique.

Deux nouveaux variants pathogènes ont été mis en évidence : c.437T>C p.(Val146Ala) pour la patiente A et c.418T>C p.(Ser140Pro) pour la patiente B. Chacune des patientes présentent l'un de ces variants à l'état hétérozygote.

Les variants *MPZ* responsables de neuropathies, ont plusieurs fois été décrits associés à la surdité ou aux anomalies pupillaires. Notre étude permet un état des

lieux et soulève la question de la réelle implication de *MPZ* dans l'apparition de la surdité.

Peripheral neuropathy associated with deafness due to two novel variants in *MPZ* in a French cohort

Justine LERAT[1,2], Corinne MAGDELAINE[1,3], Jérôme LACOUTURE[3] , Marie-Christine ARNE-BES[4], Laurent MAGY[5] , Paco DEROUAULT[3], Franck STURTZ[1,3] and Anne-Sophie LIA[1, 3]

[1] Univ. Limoges, MMNP, EA 6309, F-87000 Limoges, France

[2] CHU Limoges, Service Oto-Rhino-Laryngologie et Chirurgie Cervico-Faciale, F-87000 Limoges, France

[3] CHU Limoges, Service Biochimie et Génétique Moléculaire, F-87000 Limoges, France

[4] CHU Toulouse, Service de Neurologie, Centre de référence de pathologie neuromusculaire, F-31059 Toulouse, France

[5] CHU Limoges, Service Neurologie, F-87000 Limoges, France

[6] CHU Limoges, Service Neurologie, F-87000 Limoges, France

Running title: *MPZ* and Peripheral Neuropathy with Deafness

Conflict of interest: None.

ABSTRACT

MPZ is an adhesion molecule that accounts for more than 50% in the nerve sheath, necessary for normal myelination in the peripheral nervous system. *MPZ* pathogenic variants are reported with different phenotypes, such as a demyelinating dominant CMT1 form (CMT1B), axonal dominant CMT2 forms (CMT2I and CMT2J), dominant intermediate CMT (CMTDID) and with Dejerine Sottas syndrome. To date, 242 variants have been reported, but only 18 variants have been associated with CMT and deafness.

Here we report on two cases of a 68-year-old (axonal CMT) and a 75-year-old (demyelinating CMT) females, who presented CMT and deafness associated to two novel variants in *MPZ*: c.437T>C p.(Val146Ala) and c.418T>C p.(Ser140Pro). We then compared them to the 18 *MPZ* variants already described to cause CMT associated to deafness.

MPZ variants causing neuropathies have sometimes been described to be associated to other features, such as deafness, or pupil abnormality, but not

systematically. Our study is an inventory of MPZ and raises the question of the real implication of this gene in deafness in CMT patients.

KEY WORDS: *Charcot-Marie-Tooth; Neuropathy; Deafness; MPZ; NGS*

Introduction

The most common inherited peripheral neuropathy is Charcot-Marie-Tooth disease (CMT), with a prevalence of 1/2500. CMT has a wide range of phenotypes and is genetically heterogeneous.

MPZ is an adhesion molecule necessary for normal myelination in the peripheral nervous system. It mediates adhesion between adjacent myelin wraps and drives myelin compaction. (1;2). It accounts for more than 50% of the protein present in the sheath of peripheral nerves. Expression of the *MPZ* gene is restricted to Schwann cells. The association of *MPZ* pathogenic variants with different phenotypes including a demyelinating dominant CMT1 form (CMT1B), axonal dominant CMT2 forms (CMT2I and MT2J), dominant intermediate CMT (CMTDID) and with Dejerine Sottas syndrome has been confirmed (3;4;5;6).

MPZ gene is located in 1q23.3. It is composed of 5238 bases spread out over six exons and produces a protein of 219 amino acids. The encoded protein, which belongs to the globulin superfamily, a transmembrane protein, weighs 14.8kDa. It has a single immunoglobulin-like extracellular domain of 124 amino acids, a single transmembrane domain of 25 amino acids, and a single cytoplasmic domain of 69 amino acids (7). Moreover, it is a homophilic adhesion molecule.

To date, 242 variants have been reported in HGMD (http://www.hgmd.org/), but only 18 variants have been associated with CMT and deafness (5;8;9;10;11;12;13).

Here we report on two cases of a 68-year-old and a 75-year-old females, who presented CMT and deafness associated to two novel variants in *MPZ*. Phenotype-genotype correlation of these specific features have been looked for thanks to a review of the literature.

Materials and Methods

Patients: A 68-year-old and a 75-year-old females who presented features of CMT, were sampled with peripheral blood collected in EDTA tubes after giving their informed consent. The protocol was in accordance with French ethical legislation.

Pathogenic variant detection: Genomic DNA was extracted by standard methods (Illustra DNA Extraction kit BACC3, GEHC). Next Generation Sequencing (NGS) was performed using a 92-gene custom panel designed for CMT and associated neuropathies diagnosis (***Supplementary data)***. It included the 44 known CMT genes, 27 genes involved in HSN (Hereditary Sensitive Neuropathy) and HMN (Hereditary Motor Neuropathy) and 21 other genes of interest involved in neuropathies of differential diagnosis. The amplified library was prepared with Ion P1 HiQ Template OT2 200 kit (Ampliseq Custom (Life technologies)), sequenced on Proton sequencer (Life technologies), and mapped to the human reference sequence hg19. Variants were evaluated with Alamut Mutation Interpretation Software (Interactive Biosoftware, Rouen, France) using the NM_001315491.1 reference sequence for the *MPZ* gene. Databases such as ExAC Genome browser (http://exac.broadinstitute.org), dbSNP135 (National Center for Biotechnology Information [NCBI], Bethesda, Maryland, USA, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/), Clin Var (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar) and HGMD professional (www.hgmd.cf.ac.uk) were also screened. Pathogenic variants of interest were verified by Sanger sequencing using forward and reverse primer pairs. The *PRPS1* variant was submitted to the corresponding LOVD database at https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000438296 and https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000438295.

MLPA and Sanger sequencing for *GJB2* and *GJB6* were performed.

3D Protein model: The tridimensional structure of the myelin protein P0 was obtained from the crystal structure of the human MPZ protein (Protein Database, PDB: 3OAI; https://www.rcsb.org) (14). The different locations and protein domain were detailed so as to localise accurately the 20 different variants of *MPZ* implicated in neuropathy and deafness.

A review of the literature was performed, based on PubMed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), and all the published articles presenting pathogenic variants on *MPZ* and neuropathies were collected. Two hundred and forty-two variants have already been reported in *MPZ*, but only 18 variants are reportedly involved in peripheral neuropathies associated to deafness (HGMD).

Results

1. *Clinical description:*

Patient A was a 68-year-old female, who had suffered from sensory and motor neuropathy, mainly in the lower limbs since the age of 35. She presented pedus cavus. Electrophysiologic studies confirmed a sensory and motor homogeneous axonal neuropathy with median motor conduction velocities of 43m/s. Moderate to severe sensorineural deafness had also been present since the age of 35, with a slope curve on the high frequencies (***Figure 1***). Auditory brainstems (ABR) revealed a slight increase of latencies, but were synchronised. Hearing aids were not judged efficient by the patient. No ophthalmological abnormality was observed. She is a familial case as her mother, her maternal aunt, uncle and five cousins all presented the same symptoms. Neuropathy was quite homogeneous among this family, but deafness was the most variable sign.

Patient B was a 75-year-old female who had suffered from sensory and motor neuropathy mainly in the lower limbs, since childhood, with a past history of falls in infancy. She presented pedus cavus. Electrophysiologic studies confirmed a sensory and motor demyelinating neuropathy with median motor conduction velocities of 51m/s. She also suffered from sensorineural deafness. She was a familial case as her sister and her daughter presented the same symptoms of neuropathy. We could not obtain information about deafness within this family.

2. *Genetic testing:*

NGS strategy using a custom large panel of CMT genes and associated neuropathies was implemented and allowed the respective detection of heterozygous pathogenic variants: c.437T>C p.(Val146Ala) for patient A and c.418T>C p.(Ser140Pro) for patient B.

These two missense variants were not found in ExAC, dbSNP, Clin Var and HGMD databases. Moreover, MLPA and Sanger sequencing for *GJB2* and *GJB6* were normal for both patients. Familial segregation was also in accordance.

The *MPZ* gene contains six exons and encodes the major structural protein of peripheral myelin. The pathogenic variants are located in exon 3 of the gene, which corresponds to the extracellular domain of MPZ responsible for its adhesive properties. They are located next to the hydrophobic extracellular domain of MPZ. These variations may be responsible for the uncorrect folding and/or dimerization of MPZ protein.

3. Protein representation:

So far, 18 documented *MPZ* pathogenic variants, associated with neuropathy and deafness, have already been published: p.Arg36Trp, p.His39Pro, p.Asp75Val, p.Glu97Val, p.Arg98Cys, p.Arg98His, p.Pro105Thr, p.Ser111Cys, p.Ser111Pro, p.Ile114fs, p.Tyr119Cys, p.Asp121Asn, p.Thr124Met, p.Ile135Thr, p.Gly137Ser, p.Tyr145Ser, p.Arg227Ser and c.614 +2T>G splice site pathogenic variant (5; 8; 9; 10; 11;12;13).

Among 103 American patients from 71 families, 47 different *MPZ* variants have been reported. Deafness was present in 21 patients: seven with infantile-onset (p.Arg98Cys, p.Arg98His, p.Ser111Cys, p.Ser111Pro, p.Ile135Thr, p.Gly137Ser) and 14 with adult onset (p.Arg36Trp, p.His39Pro, p.Ile114fs, p.Tyr119Cys, p.Thr124Met, p.Arg227Ser, and c.614 +2T>G splice site pathogenic variant). Unfortunately, no information concerning degrees of deafness was available.

In 1998, Chapon *et al* reported on a French family with late onset CMT2 associated with Argyll-Robertson-like pupils, dysphagia and deafness due to the c.372C>T, p.(Thr124Met) variant. Onset of peripheral neuropathy occurred between the fourth and sixth decades, except for two patients with an earlier onset linked to pains. The lower limbs were first affected, as in our two patients. Hearing impairment was reported among six patients out of seven affected kindreds, but degrees or age at onset were not detailed, except for one patient at the age of 44. In fact, the youngest, aged 18, did not suffer from deafness, but may have been affected later on. Argyll-Robertson-like pupils was the first sign of the condition in this family. Nerve biopsy did not show any sign of demyelination but

depopulation and rare clusters of small myelinated fibres (15). Severe hearing impairment has then been reported with this same variant c.372C>T, p.(Thr124Met) in four Belgian patients out of nine families, and also in a Japanese family of two affected kindreds. (5;16) Axonal neuropathy was homogeneous between the different families, usually started in the fourth to fifth decade and progressed rapidly to severe weakness of the lower limbs, leading to wheelchair. Many patients initially complained of lancinating pains in the legs. In the older generations, several patients were diagnosed with tabes dorsalis based on the combination of shooting pains in the legs and pupillary abnormalities. These phenotypes were also confirmed by Misu *et al* in 2000, in seven Japanese families with this previously reported variant and also with the c224A>T, p.(Asp75Val) variant. Hearing impairment was noted in five patients out of 11 tested. It is interesting to say that auditory acuity was slightly reduced in the low tones in only one reported index patient (8). Adie's pupil was also detected in nine patients out of 13 examined. The p.(Thr124Met) and p.(Asp75Val) variants in the *MPZ* gene cause a distinctive clinical phenotype. Axonal neuropathy and deafness are combined with also abnormal pupils, such as Adie's pupil or Argyll Robertson pupil and appeared as the first sign of the disease. As a consequence, *MPZ* may be involved in the early autonomic system affection (12). Besides, in case of p.(Glu87Val) variation, progressive sensorineural hearing loss and abnormal pupillary reaction are present long before any signs of polyneuropathy (17).

Duan *et al* reported *MPZ* pathogenic variant p.(Asp121Asn) associated with late-onset axonal neuropathy, early onset hearing loss and pupil abnormalities. It was first come across in a Chinese family. Hearing loss was progressive and associated to tinnitus. Deafness started at around 35, was progressive and could lead to cophosis. Brainstem Auditory Evoked Potentials (BAEP) when available showed peripheral lesions. Sensorineural hearing loss was symmetric and varied from moderate in standard frequencies to severe in the high frequencies. This kind of audiogram corresponds to patient A (***Figure 1***). Hearing impairment started simultaneously with numbness and weakness in the lower limbs for all patients. This phenotype is quite similar to our patient A. Late-onset axonal neuropathy was also associated to moderate to severe sensorineural deafness in a Polish

family, due to the *MPZ* variant p.(Pro105Thr) (12). This typical audiogram was also observed in case of the p.(Tyr145Ser) variant (9).

Kilfoyle *et al*, reported progressive sensorineural deafness among seven American patients out of 10 affected kindreds with mixed slowly progressive neuropathy, due to the *MPZ v*ariant p.(His39Pro) (10). Age at onset of hearing impairment varied from 18 to 58. Three patients required hearing aids by the age of 40. Restless legs were also present in eight kindreds out of ten and preceded the other features. Multiple sclerosis and acute onset were also reported in one patient (10).

Discussion

We report on two female cases of 68 and 75years of age who had developed sensori-motor neuropathy since the age of 35 and childhood respectively. Deafness was found in both patients, starting at the same age as neuropathy for patient A. Two novel missense variants were found in *MPZ*, such as respectively c.437T>C, p.(Val146Ala) for patient A and c.418T>C, p.(Ser140Pro) for patient B.

Patients with *MPZ* variants present a wide range of phenotypic variability beyond the peripheral nervous system, including pupillary abnormalities such as Adie's pupils, hearing loss, diaphragmatic weakness or chronic cough, restless-leg-like symptoms and multiple sclerosis (5;10;18).

Patient A had a late-onset and moderate form of axonal neuropathy and deafness. On the contrary, patient B had a more severe and early-onset demyelinating neuropathy. Moreover, as observed in our two patients and in the literature, early onset (infantile and childhood) phenotypes seem to be due to developmentally impaired myelination and are more severe, whereas the adult-onset phenotypes are linked to axonal degeneration without previous demyelination and are moderate forms (7;13).

Most *MPZ* point pathogenic variants are located (white balls in *Figure 2)* within the extracellular or transmembrane domain of the mature MPZ protein (adhesive interface, four-fold interface or head-to-head interface areas of the extracellular domain), which is the case of the variants involved in CMT and deafness, except

one, p.(Arg227Ser), located in the cytosolic domain (13). Our two pathogenic variants are in orange in the extracellular domain and in pink in the transmembrane domain on ***Figure2.*** These domains are essential for the adhesion function of the protein, and as a consequence, an alteration of the functional area and the tertiary structure of the protein will induce modifications in MPZ-mediated adhesion and myelin compaction. However, other pathogenic variants have been described in these regions, but we do not have any information about hearing impairment. Deafness may be present but not explained.

Other modulatory factors in the expression of the disease pathology may be involved and explain the variability of deafness onset (before, simultaneously or after neuropathy onset).

Actually, CMV (human CytoMegaloVirus) infection in S-phase fibroblast cells induces genetic damage at 1q23.3, within a maximal region of 37 kb, containing 5 low copy repeat elements. The breakpoint is situated between two hearing impairment loci, DFNA49 and DFNA7, and close to the *MPZ* gene (19). Interestingly, only 18 out of 242 *MPZ* pathogenic variants (7.4%) have been described to be associated with CMT and deafness. One can wonder if deafness is then really caused by *MPZ* pathogenic variants or by additional factors such as CMV infection or pathogenic variant in deafness genes.

However, in the inner ear, MPZ protein has been detected in the organ of Corti, in the spiral ganglion, and in the part of the auditory nerve that runs through the modiolus (20).

In addition, pathological examination of the cochlea in one American deceased patient affected by CMT and deafness and presenting *MPZ* variant c.434A>C, p.(Tyr145Ser), revealed MPZ marked loss of auditory ganglion cells and central and peripheral auditory nerve fibres within the cochlea. The number of inner hair cells with preserved morphology was normal. The outer hair cells were normal in number except for a 30% reduction only in the apical turn (9). Those pathological aspects associated to clinical examination were in favour of auditory neuropathy. The phenotype was characterized by progressive polyneuropathy and deafness starting at the age of 50, associated with Adie’s pupils. Furthermore, the autopsy on a homozygous patient with the c. 371C>T, p.(Thr124Met) variant, revealed a

loss of myelinated fibres in the trigeminal, facial and hypoglossal nerves. However it is difficult to be sure of mutated *MPZ* involvement in deafness in these patients. It would be necessary to explore *MPZ* patients without deafness to compare and then conclude.

Animal models could be very useful to assess this point. Several MPZ transgenic mice harbouring point pathogenic variant have been created (21;22) but to our knowledge, hearing loss has not been described or looked for in these models. It could be very interesting to investigate it. One complementary model has also been developed. Indeed, in a mouse model of noise-induced hearing loss, mpz was upregulated at 6 hours post-systemic dexamethasone and noise exposure whereas Heat shock protein70 (Hsp70) was downregulated in the cochlea. Mpz immunolocalization in the cochlea was limited to the nerve fibers of the spiral neurons. Glucocorticoids have an anti-inflammatory effect and it has been experimentally shown that dexamethasone activates the promoter region of the *MPZ* gene to upregulate MPZ expression at the transcriptional level in Schwann cells (23). However in *MPZ* patients, it could be useful to specifically downregulate the mutated allele and specifically upregulate the wildtype one. Dexamethasone will not be an efficient treatment.

Another therapeutic approach for CMT caused by *MPZ* pathogenic variant could be curcumin, as its derivatives have improved neuropathy in p.(Arg98Cys) mpz mice by alleviating endoplasmic reticulum stress, reducing the activation of unfolded protein response and promoting Schwann cell differentiation. However, we do not know its impact on deafness (24;25).

MPZ variants causing neuropathy have also been associated with other features, such as deafness, or pupil abnormality. A characteristic audiogram of gentle slope curve towards the high frequencies exist in patients suffering from CMT and sensorineural deafness. However since these associated phenotypes are not systematically present, one can wonder if they are really due to *MPZ* pathogenic variant and if so, what modulates the appearance of these associated symptoms. To go further on these investigations, we suggest performing audiologic and ophthalmologic assessment among patients suffering from neuropathy due to

MPZ, and vice versa, patients suffering from neuropathy associated with deafness and/or abnormal pupil should undergo *MPZ* molecular investigations. This additional information about hearing impairment will then help to better understand its cause in order to improve the management of these patients.

Acknowledgements

We are thankful to the nucleic acid platform BISCEM, University of Limoges, France. We also thank Sylvie Gautier for English revision.

Supplementary data

Supp. Table S1: 92-gene panel used for NGS. It includes the 44 known CMT genes, 27 genes involved in HSN (Hereditary Sensitive Neuropathy) and HMN (Hereditary Motor Neuropathy) and 21 other genes of interest involved in neuropathies of differential diagnoses.

References

1. Lagueny A, Latour P, Vital A, *et al*. Peripheral myelin modification in CMT1B correlates with MPZ gene pathogenic variants. *Neuromuscul Disord* 1999;**9**: 361-7.
2. Grandis M, Vigo T, Passalacqua M, *et al.* Different cellular and molecular mechanisms for early and late-onset myelin protein zero pathogenic variants. *Hum Mol Genet* 2008;**17**: 1877-89.
3. Hayasaka K, Himoro M, Wang Y, *et al*. Structure and chromosomal localization of the gene encoding the human myelin protein zero (MPZ). *Genomics* 1993;**17**: 755-8.
4. Marrosu MG, Vaccargiu S, Marrosu G, Vannelli A, Cianchetti C, Muntoni F. Charcot-Marie-Tooth disease type 2 associated with pathogenic variant of the myelin protein zero gene. *Neurology* 1998;**50**:1397-401.
5. De Jonghe P, Timmerman V, Ceuterick C, *et al*. The Thr124Met pathogenic variant in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype. *Brain* 1999;**122** (Pt 2): 281-90.
6. Mastaglia FL, Nowak KJ, Stell R, *et al*. Novel pathogenic variant in the myelin protein zero gene in a family with intermediate hereditary motor and sensory neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;**67**:174-9.
7. Shy ME, Jáni A, Krajewski K, *et al*. Phenotypic clustering in MPZ pathogenic variants. *Brain* 2004;**127**(Pt 2): 371-84.
8. Misu K, Yoshihara T, Shikama Y, *et al*. An axonal form of Charcot-Marie-Tooth disease showing distinctive features in association with pathogenic variants in the peripheral myelin protein zero gene (Thr124Met or Asp75Val). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;**69**: 806-11.
9. Starr A, Michalewski HJ, Zeng F-G, *et al*. Pathology and physiology of auditory neuropathy with a novel pathogenic variant in the MPZ gene (Tyr145->Ser). *Brain* 2003;**126**(Pt 7): 1604-19.
10. Kilfoyle DH, Dyck PJ, Wu Y, *et al*. Myelin protein zero pathogenic variant His39Pro: hereditary motor and sensory neuropathy with variable onset, hearing loss, restless legs and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;**77**: 963-6.
11. Kabzińska D, Korwin-Piotrowska T, Drechsler H, Drac H, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kochański A. Late-onset Charcot-Marie-Tooth type 2 disease with hearing impairment associated with a novel Pro105Thr pathogenic variant in the MPZ gene. *Am J Med Genet A* 2007;**143A**: 2196-9.
12. Duan X, Gu W, Hao Y, *et al*. A Novel Asp121Asn Pathogenic variant of Myelin Protein Zero Is Associated with Late-Onset Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease, Hearing Loss and Pupil Abnormalities. *Front Aging Neurosci* 2016; **8**: 222.
13. Sanmaneechai O, Feely S, Scherer SS, *et al.* Genotype-phenotype characteristics and baseline natural history of heritable neuropathies caused by pathogenic variants in the MPZ gene. *Brain* 2015;**138**(Pt 11):3180-92.
14. Liu XZ, Yuan H, Mittal R, Yan D. DFNX1 Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al (eds). *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993
15. Chapon F, Latour P, Diraison P, Schaeffer S, Vandenberghe A. Axonal phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease associated with a pathogenic variant in the myelin protein zero gene. J *Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; **66**: 779-82.
16. Tokuda N, Noto Y-I, Kitani-Morii F, *et al*. Parasympathetic Dominant Autonomic Dysfunction in Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2J with the MPZ Thr124Met Pathogenic variant. *Intern Med* 2015;**54**: 1919-22.
17. Seeman P, Mazanec R, Huehne K, Suslíková P, Keller O, Rautenstrauss B. Hearing loss as the first feature of late-onset axonal CMT disease due to a novel P0 pathogenic variant. *Neurology* 2004;**63**: 733-5.
18. Baloh RH, Jen JC, Kim G, Baloh RW. Chronic cough due to Thr124Met pathogenic variant in the peripheral myelin protein zero (MPZ gene). *Neurology* 2004; **62**:1905-6.
19. Nystad M, Fagerheim T, Brox V, Fortunato EA, Nilssen Ø. Human cytomegalovirus (HCMV) and hearing impairment: infection of fibroblast cells with HCMV induces chromosome breaks at 1q23.3, between loci DFNA7 and DFNA49 -- both involved in dominantly inherited, sensorineural, hearing impairment. *Mutat Res* 2008;**637**: 56-65.
20. Cao MY1, Dupriez VJ, Rider MH, *et al*. Myelin protein Po as a potential autoantigen in autoimmune inner ear disease. *FASEB J* 1996;**10**:1635-40.
21. Wrabetz L, D'Antonio M, Pennuto M, *et al.* Different intracellular pathomechanisms produce diverse Myelin Protein Zero neuropathies in transgenic mice. *J Neurosci* 2006;**26**: 2358-68.
22. Martini R. P0-deficient knockout mice as tools to understand pathomechanisms in Charcot-Marie-Tooth 1B and P0-related Déjérine-Sottas syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1999;**883**:273-80.
23. Maeda Y, Fukushima K, Kariya S, Orita Y, Nishizaki K. Dexamethasone Regulates Cochlear Expression of Deafness-associated Proteins Myelin Protein Zero and Heat Shock Protein 70, as Revealed by iTRAQ Proteomics. *Otol Neurotol* 2015;**36**:1255-65.

24. Patzko A, Shy ME. Charcot-Marie-Tooth disease and related genetic neuropathies. *Continuum (Minneap Minn)* 2012;**18**(1):39-59.
25. Patzkó A, Bai Y, Saporta MA, *et al*. Curcumin derivatives promote Schwann cell differentiation and improve neuropathy in R98C CMT1B mice. *Brain* 2012;**135**(Pt 12):3551-66.

Figure legends

Figure1**:** *a) Tonal audiogram of Patient A showing moderate hearing loss in middle frequencies and severe hearing loss in high frequencies*
b) Vocal audiogram with poor understanding

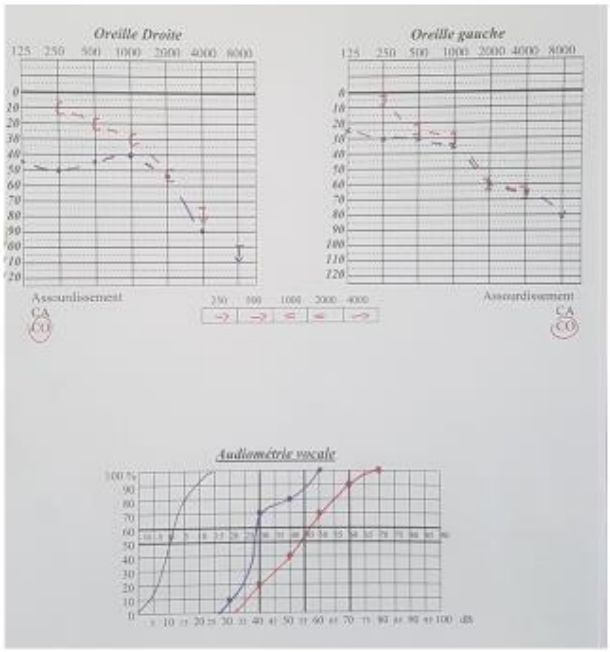
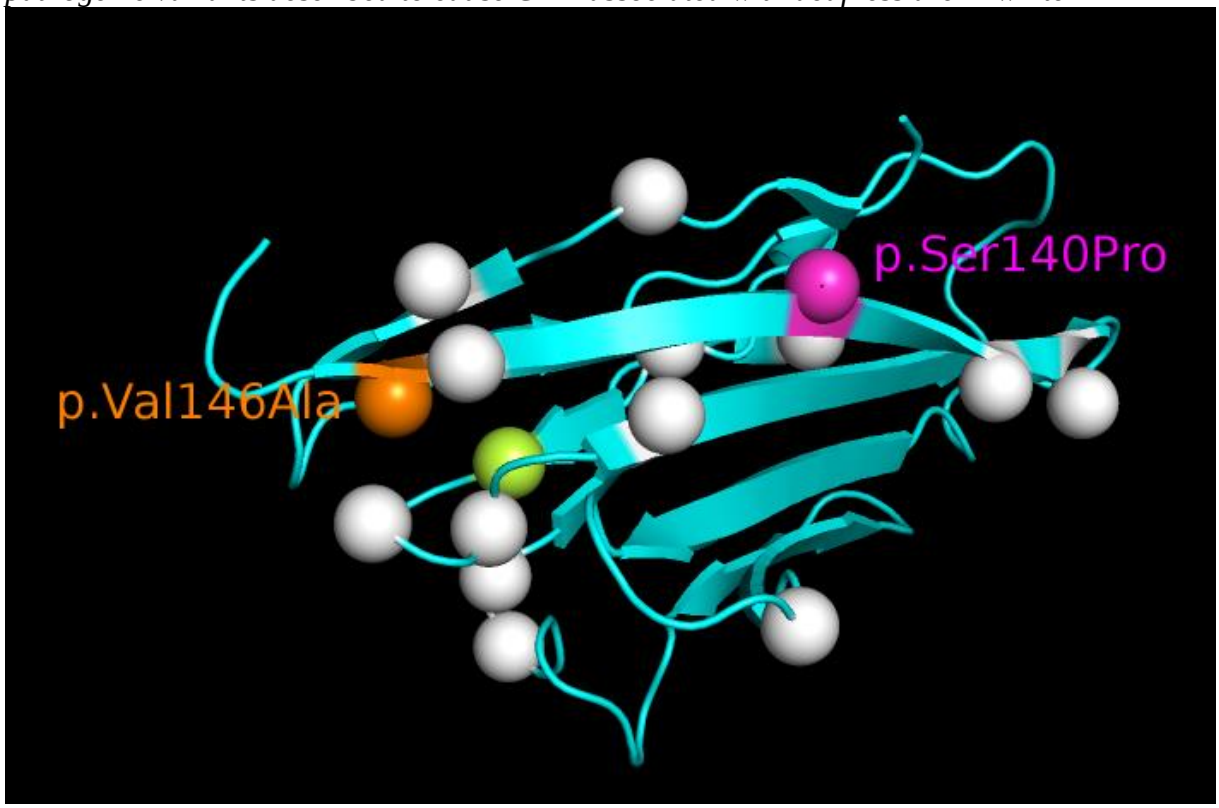


Figure2**:** *3D model of the entracellular domain of MPZ protein with extracellular domain. The two novel variants found in our study are in orange and pink. The already known point pathogenic variants described to cause CMT associated with deafness are in white*



III.7 ETUDE D'EXOMES

III.7 ETUDE D'EXOMES

Les résultats du NGS ont permis de trouver des variants pathogènes chez presque 60% des patients.

Nous nous sommes donc posés la question pour les patients restants, si le séquençage de l'exome pouvait nous aider à trouver un gène candidat responsable du phénotype CMT et surdité.

Nous nous sommes basés sur la technique des trios afin de pouvoir interpréter au mieux les variants retrouvés chez le cas index, à savoir le propositus et ses deux parents si possible.

Nous avons ainsi pu sélectionner un candidat pour lequel nous avions suffisamment d'informations cliniques et d'ADN (**patient XXIII**).

II.7.1 Cas index

Il s'agit d'un patient de 19 ans, issu d'un couple non consanguin. Le cas est sporadique. La neuropathie périphérique axonale sensitivo-motrice a débuté à l'âge de 11 ans. Une atteinte sensitive des membres inférieurs est associée à une atteinte motrice des quatre membres. Les déplacements s'effectuent à présent en fauteuil roulant. Les pieds sont creux. Il existe des troubles mictionnels. L'EMG a révélé une VCN à 52m/s. La surdité, présente depuis l'âge de six ans, est légère à moyenne, prédominant sur les graves, non évolutive. On note des fluctuations dans la sévérité de la surdité, comme dans celle de la neuropathie périphérique. Il n'existe pas d'acouphène ou de syndrome vestibulaire. Les otoémissions sont présentes et les PEA synchronisés. Le tympanogramme est normal et les réflexes stapédiens abolis.

Les parents ne présentent aucune symptomatologie de CMT ou surdité.

II.7.2 Résultats

Pour cette analyse d'exomes, avec le NextSeq d'Illumina et de la capture, 223 775 sondes ont ciblé 25586 gènes au total.
La couverture en fonction de la profondeur pour les trois exomes est représentée sur la *Figure* 23. Plus de 90% des exons sont couverts à plus de 50X, 95% de l'exome est couvert au moins 30X, et 70% de l'exome est couvert à plus de 100X.

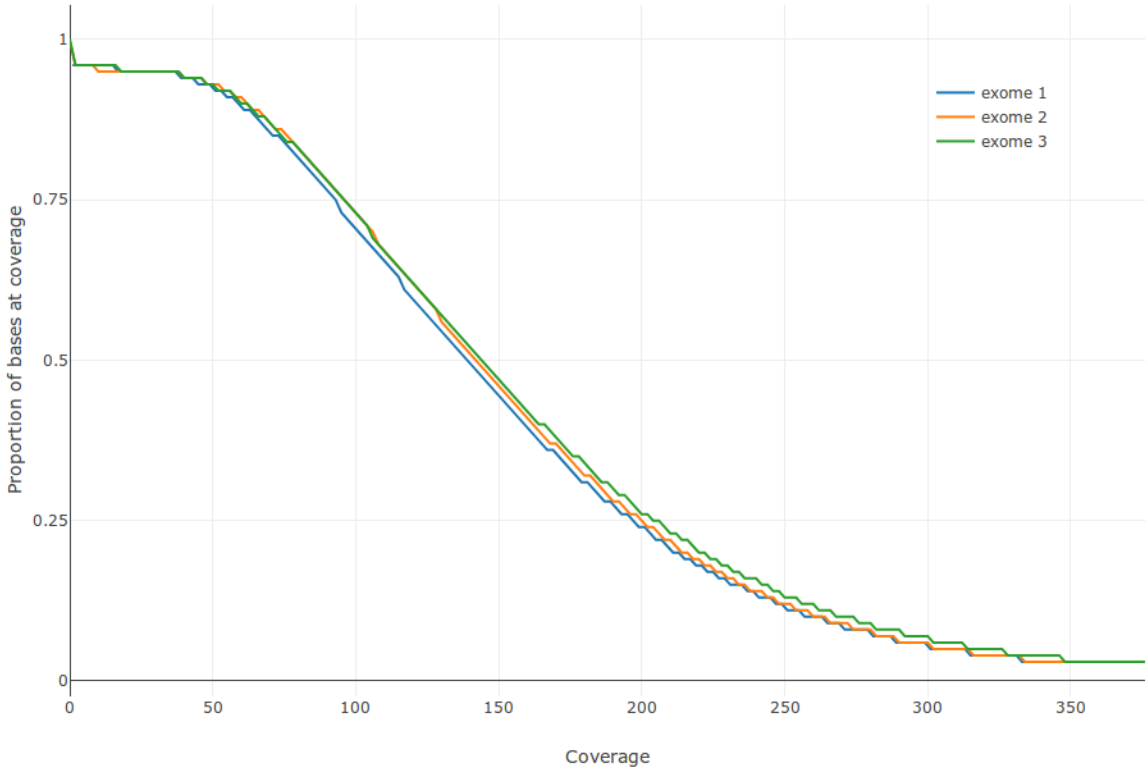


Figure 23 : Représentation de la couverture en fonction de la profondeur de lecture pour le séquençage des exomes, sur la base des trios.

Après l'utilisation des premiers filtres « profondeur de lecture > 20x » et « variants exoniques non synonymes ou d'épissage », 144 696variants restaient à analyser.

L'étape suivante était de tester les variants en fonction de leur transmission : *de novo*, récessif lié à l'X, autosomique récessif homozygote et autosomique récessif hétérozygote composite :

- De novo :

En ce qui concerne les éventuels variants *de novo,* 136 variants ont été mis en évidence. En se focalisant sur CMT et surdité, seuls 6 variants étaient encore exploitables. Aucun ne pouvait cependant expliquer la symptomatologie.

- Récessif lié à l'X :

Uniquement 9 variants ont été détectés, mais aucun n'était sur un gène qui pourrait *a priori* être en relation avec une neuropathie ou une surdité.

- Autosomique récessif, homozygote :

Ainsi 5 variants exoniques ou dans les zones d'épissage ont été mis en évidence dans des formes homozygotes. Aucun variant ne semblait pathogène.

- Autosomique récessif, hétérozygote composite :

Pour les variants hétérozygotes composites, 110 variants étaient pistés, localisés sur 25 gènes différents. Aucun n'était en rapport avec le phénotype décrit.

II.7.3 Conclusion

Au total, cette première analyse du séquençage d'un trio d'exomes dont le propositius est un patient suivi pour NP sensitivo-motrice axonale, associée à une surdité légère, n'a pas permis de mettre en évidence de nouveau gène candidat.

L'analyse de ces séquences pourra être reprise dans un deuxième temps avec des approches complémentaires :

- les variants synonymes pouvant être impliqués dans un défaut d'épissage, il sera important de les analyser. Pour cela, nous aurons besoin d'outils efficaces de prédiction, dont nous ne disposons pas actuellement.
- Un remaniement d'une partie de l'ADN pourrait également être la mutation causale. Nous essayerons d'utiliser les outils informatiques adéquats pour une telle analyse.

Il se peut également que le variant de ce patient soit intronique ou qu'il corresponde à un grand remaniement. Dans ce cas, la cartographie et/ou le séquençage de génome (WGS) seraient utiles, mais actuellement trop onéreux.

III.8 ETUDE DE NERFS COCHLEAIRES MURINS ET HUMAINS PAR IMMUNOHISTOCHIMIE

III.8 Etude de nerfs cochléaires murins et humains par immunohistochimie

III.8.1 Introduction

Après avoir obtenu les résultats moléculaires par NGS CMT, et également MLPA et Sanger *GJB2* et *GJB6* et NGS surdité, nous nous sommes intéressés à l'expression protéique.

En effet, aucun article à l'heure actuelle n'évoque l'expressivité au niveau de la cochlée et/ou du nerf auditif, de ces protéines impliquées à la fois dans les neuropathies périphériques et la surdité, cette dernière pouvant être endocochléaire et/ou rétrocochléaire.

III.8.2 Objectifs

Nos objectifs étaient de déterminer :

- La localisation précise de l'expression des protéines « NP-Surdité », chez les individus normaux, sur le nerf cochléaire et/ou la cochlée.
- Si ces localisations étaient perturbées chez des individus mutés (ici rat CMT uniquement pour notre étude préliminaire)

III.8.3 Résultats

III.8.3.1 - Chez le rat WT

- Nerf sciatique

Le nerf sciatique ayant servi de témoin, a permis d'identifier un marquage homogène au niveau du nerf pour les protéines PMP22, MPZ, NEFL et TRPV4, confirmant le bon fonctionnement de ces anticorps (*Figure 22 de A à D*).

- Nerf Cochléaire

En ce qui concerne le nerf cochléaire, nous observons un marquage net lors de l'utilisation de PMP22, MPZ et NEFL, et plus faible avec TRPV4 (*Figure 22 de E à H*). Ce même résultat a été observé chez les 3 rats WT testés (résultat non montré).

Sur cet échantillonnage, il semble que les quatre protéines sont exprimées au niveau du nerf cochléaire. Ainsi, un défaut de la quantité et/ou de la qualité de

ces protéines pourraient donc potentiellement avoir un effet au niveau de l'audition.

III.8.3.2 Chez le rat CMT

- Nerf sciatique

Le rat CMT présentant une anomalie au niveau du gène *Pmp22*, nous attendions un défaut d'expression de PMP22 au niveau de la gaine de myéline du nerf sciatique comme cela a été décrit par (Niemann *et al*, 1999).C'est en effet ce que nous avons observé *(Figure 22 I*) : aucun marquage de PMP22 sur toute la gaine.

Le marquage par MPZ est présent mais d'intensité plus faible (*Figure 22 J*).

L'immunomarquage par NEFL est présent (*Figure 22 K).*

Quant au marquage par TRPV4, il est faible (*Figure 22 L*).

- Nerf cochléaire

En ce qui concerne le nerf cochléaire des rats $CMT^{pmp22/+}$, deux zones semblent se distinguer : nerf côté cervelet et nerf côté cochlée.

- Pour PMP22, il n'existe aucun marquage sur le nerf à la sortie de la cochlée, puis une augmentation croissante mais faible en se rapprochant du cervelet. (*Figure 22 M)*
- Pour MPZ, il existe un marquage sur l'ensemble du nerf cochléaire (*Figure 22 N*).
- Pour NEFL, le marquage est présent, mais avec une intensité croissante de la cochlée vers le cervelet (*Figure 22 O*).
- Pour TRPV4, le marquage est absent du nerf cochléaire *(Figure 22 P*).

Nous avons pu montrer pour la première fois sur des nerfs auditifs de rats $CMT^{pmp22/+}$, la diminution de l'expression des protéines PMP22 et NEFL lorsqu'on se rapproche de la cochlée. Cependant, on peut se poser la question : comment une surepression du gène *PMP22* peut-elle entrainer une diminution de l'expression le long du nerf auditif ?

On peut noter qu'il s'agit de premiers travaux mettant en évidence l'absence de marquage sur le nerf cochléaire, et la diminution du marquage en regard de la jonction entre le nerf cochléaire et la cochlée. Néanmoins, le nombre restreint de cas étudiés ne nous permet pas de conclure véritablement à l'heure actuelle.

III.8.3.3 Chez l'humain

Nous avons fait face à des difficultés de prélèvements car les corps étaient conservés dans du formol avec un état de décomposition avancée.

Le prélèvement de liquide endocochléaire était rendu impossible. La décalcification après 8 à 12 semaines était nulle, voire faible. L'immunomarquage n'a pu être contributif pour aucun des quatre marqueurs sélectionnés.

III.8.4 Conclusion - Discussion

A notre connaissance, il n'existe jusqu'alors aucune étude sur la surdité des rats $CMT^{pmp22/+}$ ce qui confère un caractère novateur à notre étude. Notre étude a permis de mettre en évidence un marquage de PMPP22, MPZ, NEFL et TRPV4 au niveau du nerf cochléaire de rats normaux, et potentiellement l'absence de marquage de TRPV4 sur le nerf cochléaire, et la diminution du marquage en regard de la jonction entre le nerf cochléaire et le tronc cérébral et le cervelet pour PMP22 et NEFL. Ces derniers résultats sont cependant préliminaires et l'étude d'un plus grand nombre d'animaux est nécessaire pour pouvoir conclure.

De façon intéressante, l'expression de GJB1 dans la cochlée, au cours de l'organogénèse de la souris, a été étudiée il y a une quinzaine d'années (Lopez-Bigas *et al*, 2002). Ainsi, son expression variait au cours du temps au niveau des cellules ciliées. Une expression transitoire avait été mise en évidence dans les cellules basales et intermédiaires de la strie vasculaire, avant disparition à l'âge adulte.

L'ensemble de ces premiers résultats montrent la faisabilité du projet et tout son intérêt pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques « neuropathie et surdité ».

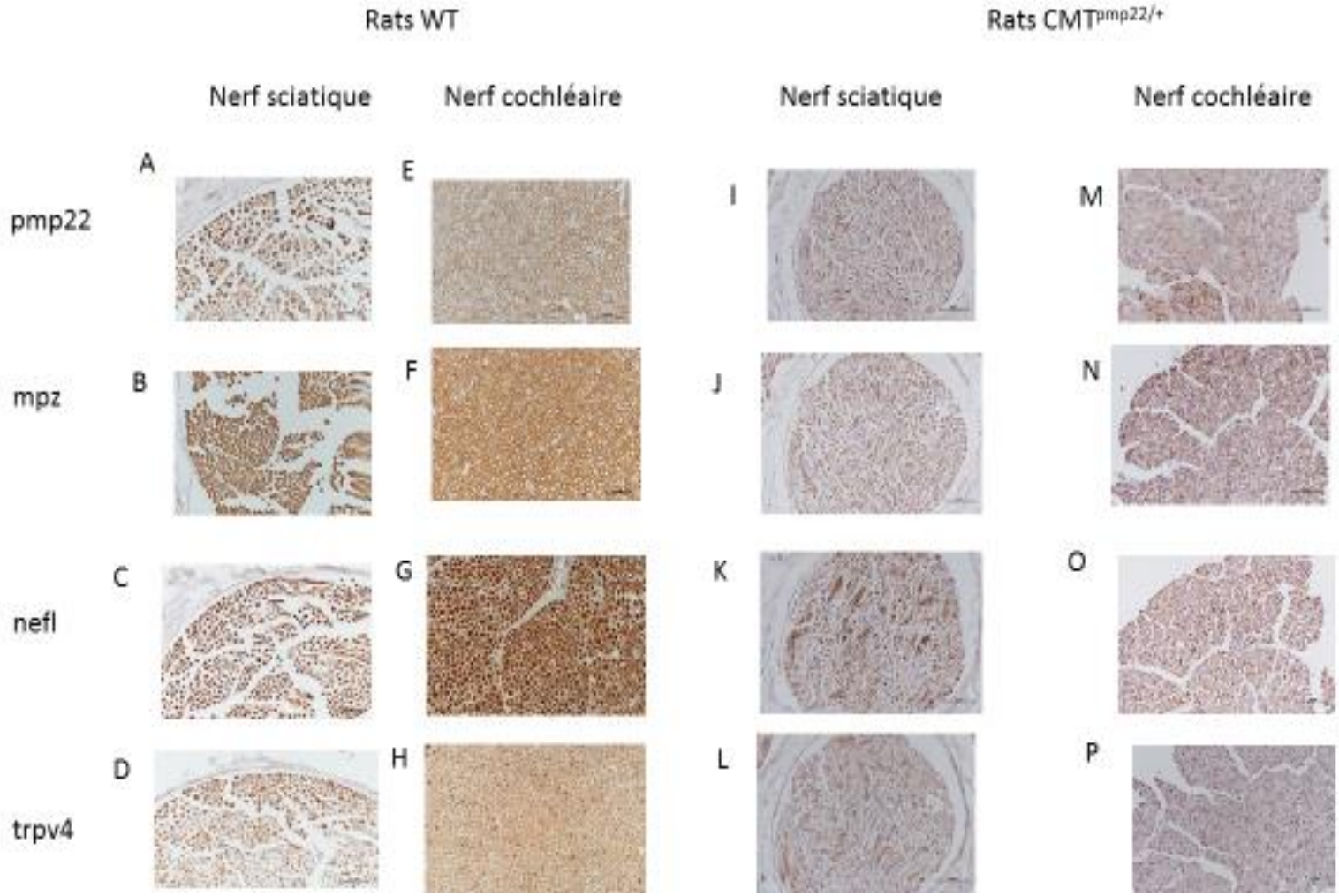


Figure 24: Etude immunohistologique de nerf sciatique et nerf cochléaire de rats WT et CMT$^{pmp22/+}$ pour les protéines pmp22, mpz, nefl et trpv4 (au Microscope grossissement x10 pour Figures I à L, x20 pour Figures A à D et M à P, x40 pour Figures E à H)

III.9 RECHERCHE DE RESEAUX PROTEIQUES VIA UNE APPROCHE *IN SILICO*

III.9 Recherche de réseaux protéiques via une approche *in silico*

Afin de comprendre les interactions entre les différentes protéines impliquées dans NP et surdité, nous nous sommes attachées à étudier les réseaux protéiques et voies métaboliques. En effet, nous avons émis l'hypothèse qu'il pouvait exister une ou des voies métaboliques communes à ces protéines impliquées dans ces deux pathologies.

III.9.1 Résultats

III.9.1.1 Interactions directes

Notre approche *in silico* a permis de confirmer l'interaction entre PMP22 et MPZ, déjà décrite par Hasse *et al.* (Hasse *et al*, 2004) comme vu sur la *Figure 22.* Ce résultat positif valide notre approche *in silico*. Ainsi, PMP22 et MPZ sont impliquées à la fois dans les interactions trans-homophile et trans-hétérophile. L'interaction hétérophile est médiée par la deuxième boucle de PMP22, alors que la première boucle est impliquée dans l'interaction homophile. Les deux modes d'interaction sont dûs à des liaisons directes protéine-protéine. Les domaines spécifiques d'adhésion responsables des interactions des protéines jouent un rôle dans le mécanisme qui détermine l'architecture moléculaire et la stabilité des gaines de myéline compactées dans les nerfs périphériques.

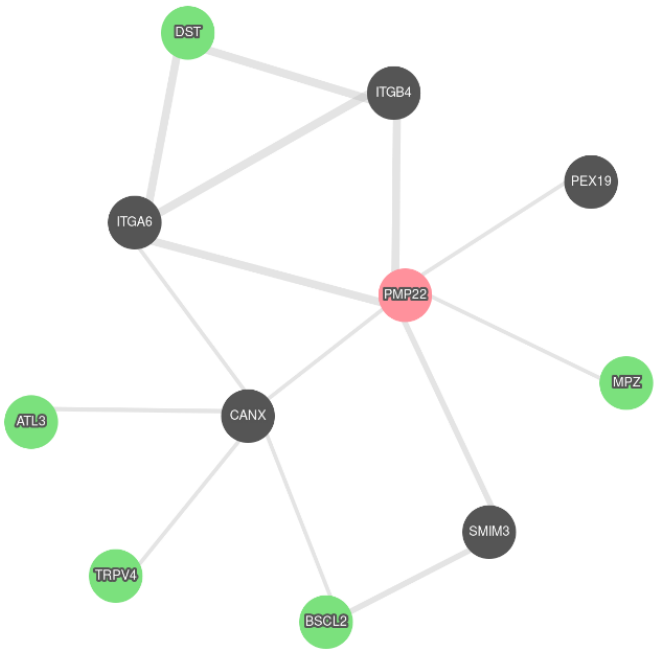


Figure 25 : Réseau protéique de PMP22 confronté à l'ensemble des 126 gènes NP. Nous notons ici un lien direct entre PMP22 et MPZ

III.9.1.2 Interactions indirectes

La figure ci-dessus suggère également des interactions indirectes entre PMP22 et BSCL2, DST, ATL3 et TRPV4. A noté que TRPV4 fait partie de la liste des 36 protéines impliquées à la fois dans NP et surdité.

En ce qui concerne les protéines de la surdité, on constate de nombreuses interactions indirectes avec PMP22. Cependant ces liens se font uniquement via 2 protéines, ITGB4 et ITGB6, qui sont des intégrines localisées à la membrane des cellules et qui ont pour rôle de médier l'adhésion entre cellules ou bien entre cellules et matrice. Elles ont donc de nombreux partenaires protéiques et il est difficile de conclure alors entre un réel lien de PMP22 avec ces deux potentielles protéines partenaires.

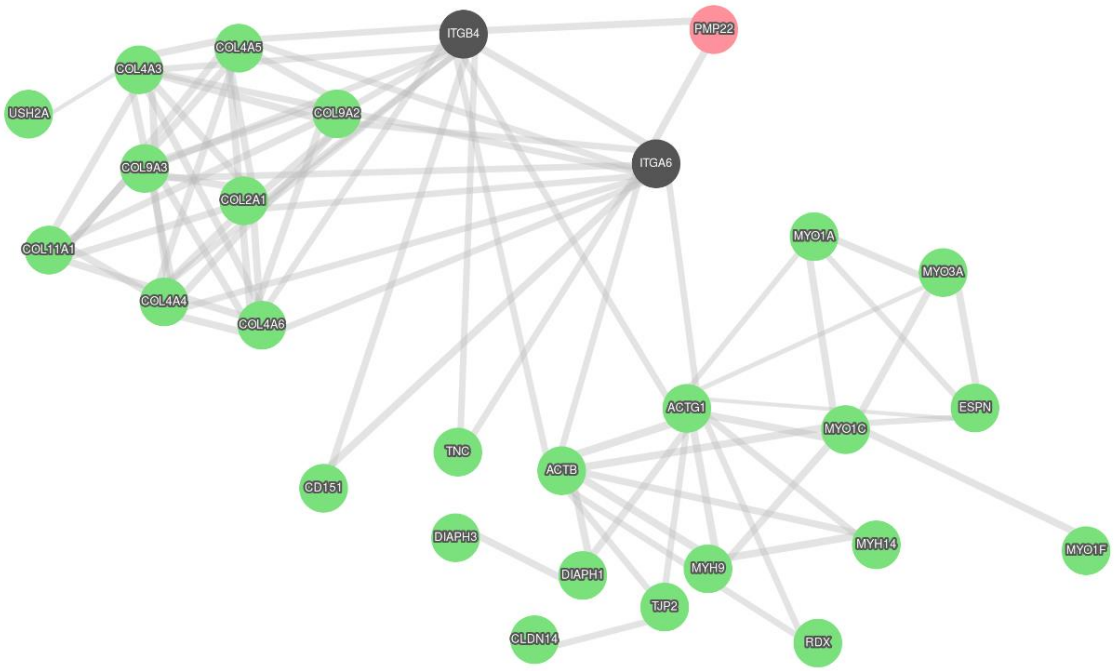


Figure 26: Réseau protéique de PMP22 avec les autres protéines de surdité

Pour PRPS1 (*Figure 24*), aucun lien direct n'a été identifié sur les protéines testées. Néanmoins, notre approche montre un lien indirect entre PRPS1 et les protéines MFN2, TYMP, GBE1 et AARS, impliquées à la fois dans NP et surdité. Cependant, au vu de l'interprétation que nous avons effectuée pour les liens indirects de PMP22, nous ne pouvons pas conclure à de véritables liens entre PRPS1 et MFN2, TYMP, GBE1 et AARS

De nombreuses interactions indirectes, sont également mises en évidence avec les protéines impliquées dans NP (*Figure 25*). Il en est de même avec les protéines

impliquées dans la surdité (*Figure 26*). Cependant, aucune relation spécifique ne peut être individualisée.

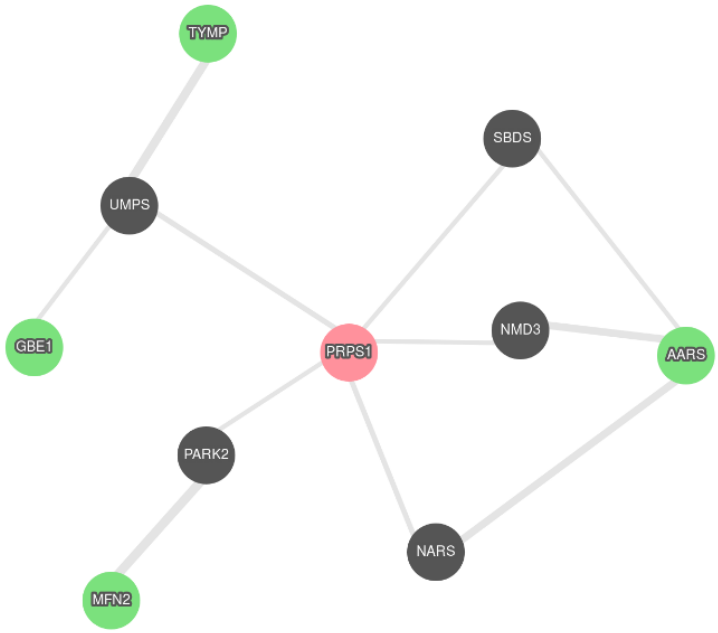


Figure 27 : Interactions de PRPS1 avec les protéines du groupe NP+Surdité

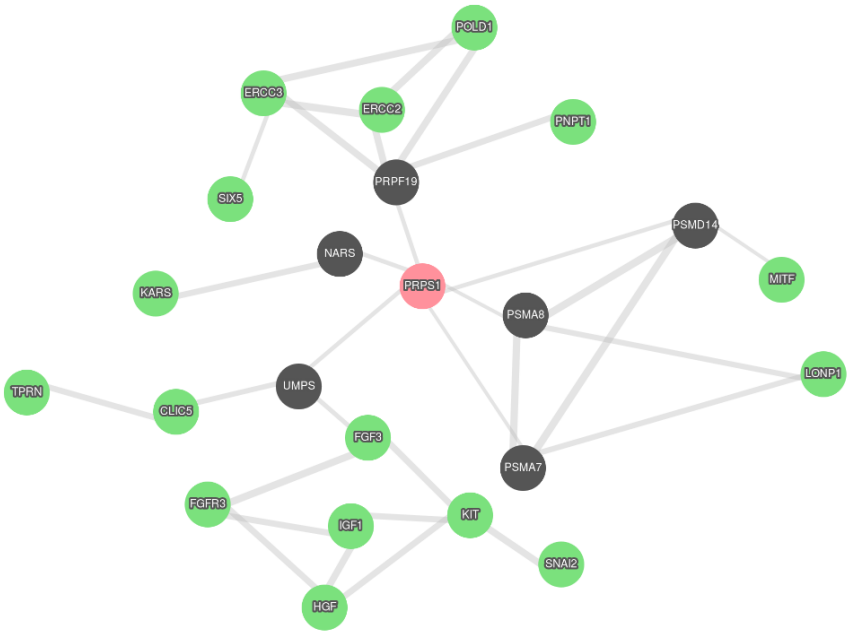


Figure 28: Interactions de PRPS1 avec les protéines du groupe Surdité

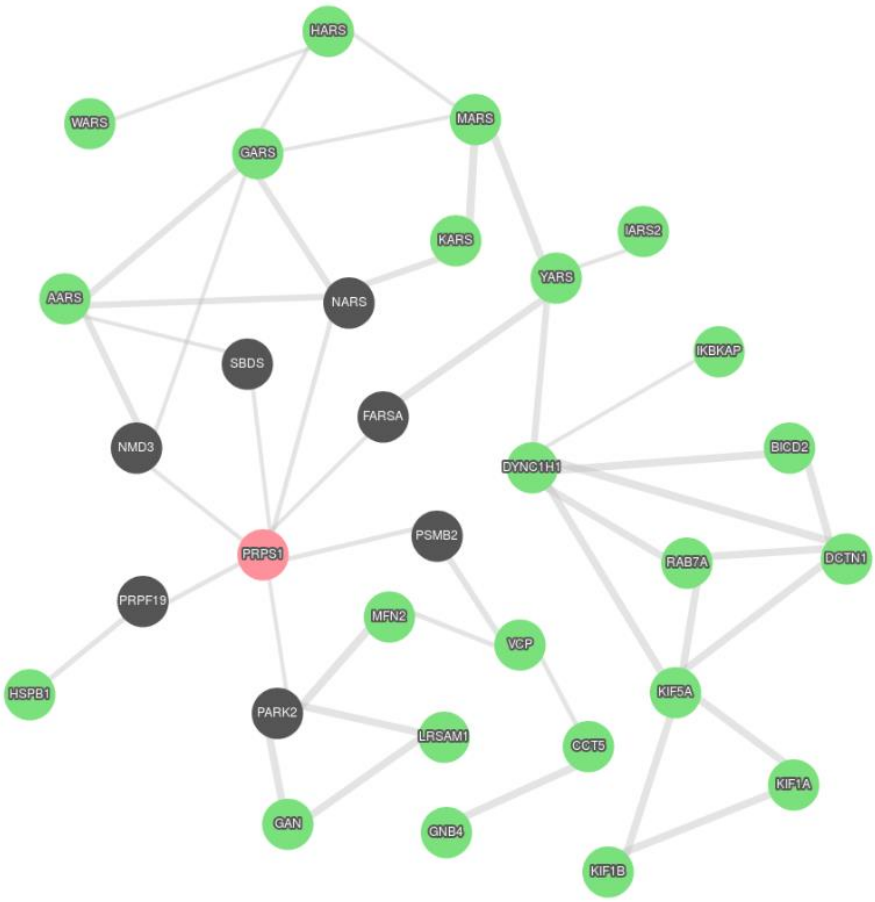


Figure 29 : Interactions de PRPS1 avec les protéines du groupe NP

Pour TRPV4 (*Figure 30)*, nous trouvons des liens avec les protéines impliquées dans NP que sont GNB4, CCT5, VCP, HSPB1 et MFN2. On rapporte également de très nombreux liens avec de multiples protéines jouant un rôle dans la surdité. Cependant, toutes ces interactions sont indirectes, ce qui ne nous permet pas de conclure.

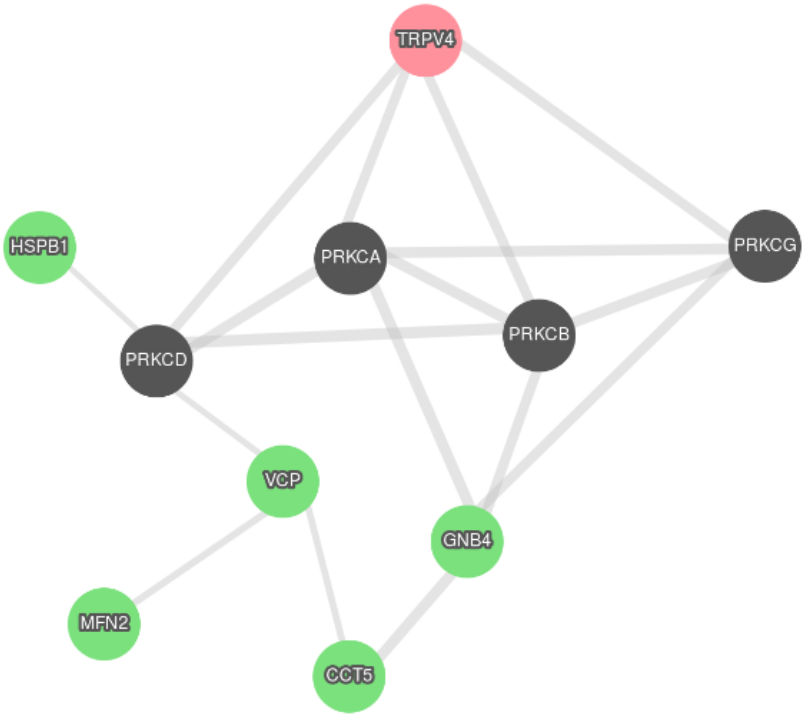


Figure 30: Interaction de TRPV4 avec les protéines de NP

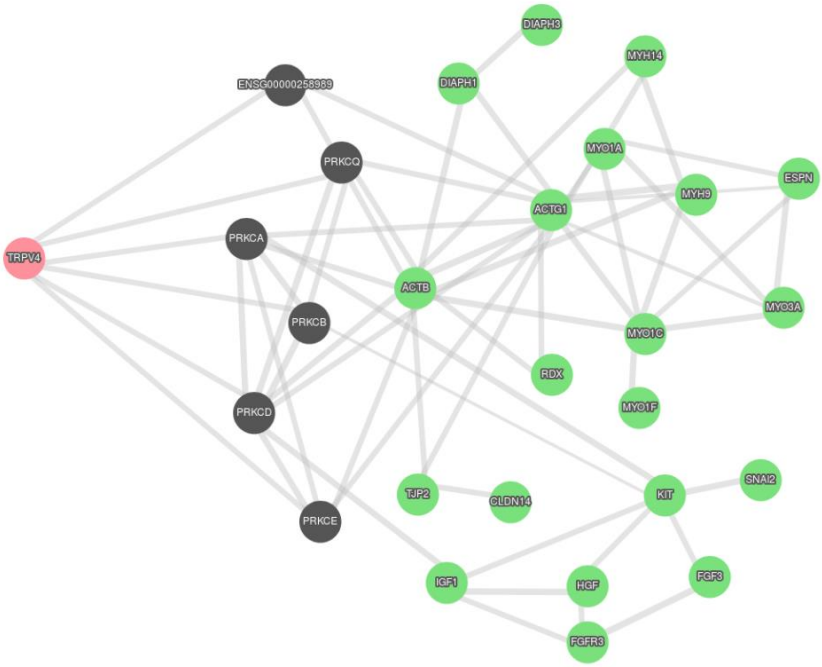


Figure 31 : Interaction de TRPV4 avec les protéines de Surdité

III.9.1.3 Absence d'interaction

Pour les autres protéines, nous n'avons retrouvé aucune interaction, même indirecte, comme cela est le cas pour SH3TC2. *(cf Figure 29)*



Figure 32 : Absence d'interaction de SH3TC2 avec les différentes protéines de NP et de Surdité par l'analyse des hubs moléculaires

III.9.2 Conclusion

La seule interaction directe retrouvée est celle entre PMP22 et MPZ, déjà publiée.

Des interactions protéiques indirectes ont été mises en évidence pour PRPS1 et TRPV4. Cependant, il est difficile à ce stade de conclure sur ces potentielles interactions.

Les réseaux protéiques semblent donc très complexes, et nous n'avons pas réussi via cette approche *in silico* à mettre en évidence de voies métaboliques qui pourraient expliquer l'apparition de surdité chez certains patients atteints de neuropathies.

L'absence de résultat ou interaction peut-être liée à un problème technique, avec notamment des filtres trop stricts, ou bien à des interactions autres que les protéines. Par exemple, des interactions protéiques avec l'ADN pourraient également être supposées

IV. DISCUSSION

IV. DISCUSSION

Lors de cette thèse, trois approches ont été utilisées afin d'établir des corrélations génotypes-phénotypes concernant les NP associées aux surdités : moléculaire avec NGS et exomes, immunohistochimique et bioinformatique avec la recherche des réseaux protéiques.

Dans notre cohorte de 3412 patients référencés au niveau national pour NP, nous avons retrouvé 44 patients sourds (1.29%), dont 27 pour lesquels les données étaient exploitables. Cette étude nous a permis un diagnostic moléculaire chez près de 60% des patients. Les gènes impliqués étaient *PMP22, SH3TC2, MPZ, NEFL, PRPS1, TRPV4* et *ABHD12*. Sept nouveaux variants pathogènes dans cinq gènes différents ont ainsi été découverts : c.202A>T, p.(Met68Leu) pour *PRPS1* ; c.437T>C, p.(Val146Ala) et c.418T>C, p.(Ser140Pro) pour *MPZ* ; c.3377T>C, p.(Leu1126Pro) et c.3617C>A, p.(Ala1206Asp) pour *SH3TC2*; c.269A>G, p.(Glu90Gly) pour *NEFL* et c.379_385delAACTACTinsGATTCCTTATATACCATTGTAGTCTTACTGC TTTTGGTGAACACA, p.(Asn127Aspfs*23) pour *ABHD12*. Des corrélations génotypes-phénotypes ont pu être mises en évidence avec les gènes *ABHD12, SH3TC2*, *NEFL*, *PRPS1* et dans une moindre mesure avec *MPZ*. De plus, nous avons constaté que la surdité peut être endo, rétro ou endo et rétrocochléaire chez les patients suivis pour NP génétique.

Nous avons réalisé une étude préliminaire immunohistochimique sur des nerfs auditifs de rats contrôles et rats CMT. En effet, chez les rats $CMT^{pmp22/+}$, nous constatons une diminution du marquage sur le nerf auditif pour PMP22 et NEFL du tronc cérébral vers la cochlée.

La recherche *in silico* de voies communes à ces différents gènes a permis de confirmer le « hub moléculaire » entre PMP22 et MPZ. Des liens indirects entre PMP22 et des protéines impliquées dans la surdité, entre PRPS1 ou TRPV4 et des protéines de NP et surdité ont également été pistés. Cependant, aucun réseau n'a été réellement trouvé parmi ce groupe de 36 protéines impliquées dans NP et surdité.

Nous allons discuter ces différents points les uns après les autres.

IV.1 La génétique des patients NP + Surdité

IV.1.1 La surdité est-elle sous-diagnostiquée chez les patients NP ? Ou bien, les patients NP sont-ils moins atteints de surdité ?

Nous rappelons que 10% de la population française présente une surdité. Les surdités génétiques représentent plus de 50% des étiologies des surdités neurosensorielles. Il s'agit là d'une moyenne, et il faut impérativement prendre en compte la tranche d'âge. Par ailleurs, les patients NP ne pas testés systématiquement au niveau de l'audition. Il est donc difficile de conclure sur la véritable proportion de patients NP sourds.

Dans notre cohorte de plus de 3400 patients, une surdité de perception a été retrouvée dans 1.29% des cas. Il semble que la surdité est sous-diagnostiquée dans cette population. En effet, les deux symptômes peuvent être exprimés avec près de 40 ans d'écart (patient XVII), et la pathologie otologique n'est pas toujours recherchée chez ces patients développant progressivement une NP. Cet écart est également retrouvé dans le syndrome de Perrault, association d'insuffisance gonadique et surdité plus ou moins atteinte neurologique. Un délai de quarante années était possible entre la surdité prélinguale et l'insuffisance ovarienne secondaire, ce qui entraine un retard de diagnostic (Lerat *et al,* 2016). Il existe peu d'argument pour évoquer une protection vis-à-vis de la surdité pour les patients NP !

Une solution pour palier à ce problème serait d'inclure la question de la surdité systématiquement dans les questionnaires cliniques et de réaliser au moins une audiométrie tonale et vocale chez tous les patients NP.

Par ailleurs, il manque très certainement des données cliniques et audiométriques pour les patients de notre série. Les données obtenues provenaient des dossiers médicaux et des audiogrammes pré-existants. Les patients suivis au CHU de Limoges (n=14) ont tous été reconvoqués, mais seuls 50% ont souhaité une nouvelle évaluation ORL. Ces sept patients ont bénéficié d'un bilan audiologique comprenant audiométrie tonale et vocale, tympanogramme, recherche de réflexes stapédiens, OEA, PEA, voire ASSR. Peu de PEA ont été effectués pour le reste de la cohorte (n=4), et aucun produit de distorsion n'a été réalisé dans cette étude. Nous ne les avons pas à disposition au CHU de Limoges. Ceci a pu sous-estimer

le taux de NA dans cette cohorte. Les conclusions sur les résultats et descriptions cliniques audiologiques sont directement liés aux dossiers exploitables et fournis.

De plus, il est intéressant de constater, dans la limite des données disponibles, qu'aucun traitement ototoxique en rapport avec la prise en charge de NP d'origine génétique n'a été reçu.

IV.1.2 Les gènes décrits « NP et surdité » le sont-ils vraiment ?

Trente-six gènes sont impliqués à la fois dans NP et surdité. Cependant, nous avons trouvé des variants pathogènes dans uniquement sept de ces gènes. Il n'est donc pas possible de conclure pour les 29 gènes restants.

Dans notre étude, *SH3TC2* apparait comme le gène le plus fréquemment impliqué dans les NP démyélinisantes autosomiques récessives, CMT4C ou AR-CMTde-*SH3TC2*, puisque parmi 350 patients testés par NGS, 13 patients ont u variant pathogène *SH3TC2,* et 4 patients rapportés sourds. La surdité est l'atteinte des nerfs crâniens la plus fréquemment retrouvée (Piscosquito *et al*, 2016 ; Yger *et al*, 2012 ; Azzedine *et al*, 2008). La scoliose est présente dans plus d'un tiers des cas (Claramunt *et al*, 2007). La surdité est donc statistiquement différente de la population générale en cas de variant pathogène *SH3TC2*.

Pour *ABHD12,* nous avons pu établir que la surdité était le premier signe clinique, dès la fin de l'adolescence. Elle est souvent progressive et varie de moyenne à profonde. Elle est quasiment systématique. La polyneuropathie est le symptôme le plus variable.

PRPS1 est à l'origine de trois principaux phénotypes avec surdité : CMTX5, DFNX1 et le Arts syndrome. La surdité est toujours présente. Dans notre cohorte de 3412 patients, seul un patient est atteint avec un nouveau variant pathogène. A l'heure actuelle, 7 variants sont rapportés pour CMTX5 ou Xlinked-CMTde-*PRPS*1. Le chevauchement entre ces trois syndromes existent, et le diagnostic précis parfois difficile. Ainsi, Nishikura *et al* a très récemment mis en évidence le chevauchement des signes entre CMTX5 et le Arts syndrome, et un spectre continu des pathologies liées à une hypoactivité de PRS-1(Nishikura *et al*, 2018). Nous avons mis en évidence un nouveau variant pathogène hémizygote du gène *PRPS1,* c.202A>T, p.(Met68Leu). Le variant trouvé dans notre étude, est prédit

pour entrainer une altération de l'affinité entre les différentes sous-unités du dimère, empêchant ainsi la formation de l'hexamère.

Pour *NEFL*, la surdité est associée aux variant pathogènes suivants: (p.(Glu90Lys), p.(Asn98Ser), p.(Asn98Thr), p.(Leu268Pro), p.(Cys322_Asn326del), p.(Glu396Lys)) (Abe *et al*, 2009; Sivera *et al*, 2013; Fabrizi *et al*, 2006; Zuchner *et al*, 2004; Horga *et al, 2017*) ; ainsi que pour le nouveau variant pathogène trouvé à l'aide du NGS dans notre cohorte: c.269A>G, p.(Glu90Gly). Un audiogramme avec une surdité moyenne sur les fréquences aigues, semble être caractéristique des variant pathogènes p.(Asn98Ser) et p.(Glu90Gly) (Likar *et al*, 2018). Les sept variants pathogènes hétérozygotes, incluant le nôtre, sont localisés au niveau de « hot spots ».

TRPV4 est responsable de CMT2C ou AD-dHMN-*TRPV4*. Le phénotype est caractérisé par l'association d'une paralysie des cordes vocales et/ou du diaphragme, et d'une surdité (Landoure *et al*, 2012 ; Dyck *et al*, 1994). Le phénotype de notre patient XVIII correspond tout à fait. Dans notre cohorte, cinq patients ont un variant pathogène de *TRPV4*, mais un seul est décrit comme sourd.

Par ailleurs, notre étude suggère que *PMP22* et *MPZ*, deux gènes très fréquemment impliqués dans CMT, ne sont peut-être pas la cause de la surdité observée chez certains de ces patients. En effet, les variants dans *PMP22* expliquent 23% des diagnostics de notre cohorte française de 3412 patients. Cependant, seuls 5 patients ont été retrouvés sourds, soit 0.06% des patients *PMP22* de notre cohorte. Les variations retrouvées étaient la duplication dans trois cas, la délétion dans un cas et une nouvelle délétion ponctuelle. On peut donc se poser la question de l'implication d'un deuxième gène pouvant expliquer la surdité. Nous avons mis ce résultat en évidence chez deux patients avec des variants pathogènes de *PMP22* (variant pathogène ponctuel de *PMP22* et *COCH* ; délétion de *PMP22* et *MYH14*).

Par ailleurs, le laboratoire de génétique moléculaire du CHU de Lille a intégré *PMP22* dans son panel de NGS-Surdité, et aucun variant pathogène n'a été retrouvé à ce jour dans ce gène chez les patients sourds testés (information personnelle).

Nous pouvons donc proposer pour tous les patients avec un variant pathogène de *PMP22* et atteints de surdité, de réaliser un séquençage « NGS-surdité » afin de réellement conclure sur l'origine de la surdité chez ces patients. Une collaboration inter-laboratoires, telle que « filnemus » pour les NP, serait ainsi utile.

Il en est de même avec *MPZ,* puisque 60 patients de la cohorte ont un variant pathogène de ce gène, mais seuls deux patients sont rapportés comme sourds (3.33%). On connaît également les liens entre les protéines PMP22 et MPZ.

MFN2 est responsable de CMT2A ou AD-CMTax-MFN2, forme axonale et autosomique dominante. C'est le gène le plus fréquemment retrouvé dans ce type de forme de CMT. Les symptômes sont variables, avec début précoce et forme sévère et l'association possible aux neuropathies optiques. Les mitofusins sont des GTPases, localisées dans la membrane externe des mitochondries. Des neuropathies auditives ont été rapportées (Bombelli *et al*, 2014). Cependant, dans notre cohorte aucun variant pathogène n'a été retrouvé pour ce gène.

GJB1 fait partie de la famille des connexines au même titre que *GJB2* et *GJB6*, bien connues dans DFN1B. Dans notre étude, aucun patient ne présentait de variant pathogène pour ce gène. *GJB1* est responsable de CMTX1, avec des formes démyélinisantes ou axonales. Les connexines, protéines intégrales de la membrane, forment des canaux transmembranaires, regroupés au niveau des jonctions intercellulaires de type gap. La séquence et la topographie ont été conservées au cours de l'évolution. Leur expression est ubiquitaire, mais la symptomatologie localisée, ce qui suggère l'implication là-aussi de facteurs modificateurs de l'expression. Les connexinopathies décrites, induisent une perte de fonction partielle ou totale des canaux de gap-junction. Cependant, la corrélation entre la sévérité de la pathologie et le niveau de perte de fonction des canaux de gap-junction est incertaine. Les variants associés à une perte de fonction sont localisées tout le long des protéines, sans segment particulier type hot-spot. Ceci suggère que la fonctionnalité des canaux de gap-junction est très sensible aux modifications mineures des protéines connexines, et ainsi un changement subtil dans la fonction des canaux de gap-junction est suffisant pour causer la pathologie (Garcia *et al,* 2015).

Pour les patients non résolus, un séquençage des exomes peut être proposé, comme cela a été le cas pour un de nos patients (patient XXIII). Néanmoins, nous n'avons pas été dans la mesure de trouver un gène candidat. Cette technique peut se développer aux neuf autres patients restants, selon toujours la technique des trios (propositus et deux membres de la famille). Le CMT comprend à présent plus de 90 gènes, la NP plus de 200 gènes et la surdité syndromique plus de 100 gènes également, ce qui laisse présager la découverte encore de nombreux gènes impliqués dans NP et surdité.

Nous pouvons donc nous poser la question d'adapter un nouveau panel de gènes pour le NGS. A l'heure du développement de l'exome, l'étude de gènes cibles a néanmoins son intérêt, pour un coût et un délai moindres. Le panel des 36 gènes impliqués pourraient donc être utilisé chez les patients présentant à la fois NP et surdité. En cas de négativité, le panel de 126 gènes de NP pourrait alors être utilisé.

IV.1.3 VUS : comment aller plus loin ?

Nous avons mis en évidence trois VUS dans notre cohorte, pour lesquels il n'a pas été possible de conclure, du fait notamment du manque d'information clinique.

Ainsi, nous avons retrouvé un nouveau variant hétérozygote jamais décrit dans *SPTLC1*, pour le patient I, c.-35delCCGCTTCCTTCCGGAAGGCGGGTCACAAG. Il s'agissait d'un cas sporadique de neuropathie démyélinisante sensitivo-motrice, mais la ségrégation familiale n'a pu être réalisée. *SPTLC1* est responsable de HSN1A, où la surdité est fréquemment présente à partir de 40 ans et progressive (Nicholson *et al*, 1993-2018 ; Hicks *et al*, 1922).

Un autre variant hétérozygote faux-sens de *DNTM1*, a été trouvé chez le patient VI, c.1250C>T, p.(Ala417Val). Cependant, ce variant est peu conservé parmi les espèces, et est probablement bénin. Klein *et al* ont rapporté une surdité progressive dès 20 à 35 ans dans le cadre de HSN1E (Klein *et al*, 2011). Les variants retrouvés étaient : c.1484A>G, (p.Tyr495Cys) et c.1470–1472TCC>ATA, p.(Asp490Glu–Pro491Tyr). Le patient VI a une neuropathie sensitivo-motrice démyélinisante associée à une ataxie et une démence débutante

type maladie d'Alzheimer. Ces deux derniers signes ont déjà été rapportés avec DNMT1 (Kernohan *et al*, 2016 ; Klein *et al*, 2012). La ségrégation familiale dans ce cas n'a pas pu être réalisée, et est nécessaire pour conclure.

IV.2 Clinique des surdités et neuropathies

IV.2.1 Degré de la surdité

La surdité était légère à moyenne dans les cas de surdité liée à *SH3TC2* (n=2), *NEFL* (n=2), *MPZ* (n=1), *TRPV4* (n=1) ; sévère à profonde dans les cas de variants pathogènes dans les gènes *PRPS1* (n=1) et *ABHD12* (n=1). Pour *PMP22*, la surdité était décrite comme très variable.

Bien que les données soient limitées, des tendances entre le degré de surdité et le gène impliqué peuvent donc être suggérées.

Nous avons constaté dans notre cohorte que le phénotype de NP et surdité était plus sévère en cas d'âge d'apparition précoce. Par contre, la survenue de la surdité ne modifiait pas la sévérité de la NP.

IV.2.2 Délai d'apparition de la surdité

La surdité était concomitante à la NP dans les cas liés aux variants pathogènes de *PRPS1* (n=1), *NEFL* (n=2), *MPZ* (n=1), *TRPV4* (n=1) ; à distance en cas de surdité liée à *SH3TC2* (n=2) et *ABHD12* (n=1). Là encore, la survenue de la surdité avec *PMP22* était très variable.

On peut donc ici aussi constater des tendances entre l'apparition de la surdité et le gène impliqué.

IV.2.3 Quelle est la cause des troubles de l'équilibre des patients NP + Surdité ?

Dans notre étude, nous avons rapporté quatre cas de troubles de l'équilibre et trois d'ataxie. Par ailleurs, peu ou pas de bilan vestibulaire poussé n'ont été réalisés. Or, la proximité des nerfs cochléaires et vestibulaires supérieurs et inférieurs est connue dans l'angle ponto-cérébelleux, dans le cas notamment des schwannomes de l'acoustique. Il existe là aussi un probable sous-diagnostic des déficits vestibulaires chez les patients atteints de NP et surdité. Ceci est confirmé

par les données de la littérature, où peu de données sur le vestibule de ces patients sont rapportées (Buetti *et al*, 2014). Les paires crâniennes les plus fréquemment impliquées dans les neuropathies sont les nerfs optiques, trijumeaux et faciaux. L'atteinte de la huitième paire crânienne est plus rare. La gaine de myéline du nerf vestibulaire, nerf crânial sensitif, est constituée de cellules de Schwann et d'oligodendrocytes. Ainsi, le nerf auditif est myélinisé par les cellules de Schwann, alors que la portion centrale est myélinisée par les oligodendrocytes (Butinar *et al*, 1999; Natout *et al*, 1987). Palla *et al* ont documenté le déficit vestibulaire chez les patients atteints de NP. Le réflexe oculo-vestibulaire était réduit de 81% en cas de NP axonale, et de 63% en cas de NP démyélinisante (Palla *et al*, 2009). Par ailleurs, Zingler *et al* ont démontré chez 22% des patients avec une atteinte vestibulaire bilatérale l'association avec une NP (Zingler *et al*, 2007). Un tiers des patients avait aussi une atteinte cérébelleuse. Il semblerait donc intéressant de réaliser un bilan cochléo-vestibulaire complet chez les patients suivis pour NP avec surdité, afin d'améliorer le diagnostic étiologique des troubles de la marche. En effet, les difficultés à la marche fréquemment rencontrées par les patients avec NP, peuvent être liées à l'évolution de la neuropathie, à l'ataxie cérébelleuse, aux déficits de proprioception ou bien à une atteinte vestibulaire dans des proportions variées. Une prise en charge adaptée, notamment par kinésithérapie pourrait être d'une grande aide.

L'atteinte vestibulaire est donc probablement sous-diagnostiquée, et sa recherche devrait être systématique, tout comme dans le bilan pré-implantatoire.

IV.2.4 Place de l'implant cochléaire chez les patients sourds et atteints de NP

Une de nos patientes a bénéficié d'un implant cochléaire, dans le cadre d'une délétion ponctuelle dans l'exon 4 de *PMP22*, associée à un variant pathogène de *COCH*. Un deuxième cas, le patient XII avec la délétion de *PMP22* et le variant potentiel de *MYH14* est en cours de bilan pré-implant. Dans la littérature, seuls trois cas sont rapportés de patients atteints de CMT avec implantation cochléaire (absence d'information sur CMT ou surdité chez Anzalone *et al*, 2018 ; neuropathie auditive et absence de variant de *PMP22* ou *GJB1* pour Goswamy *et*

al, 2012 ; atteinte endo et rétrocochléaire et variant pathogène ponctuel *PMP22* c.193G>T, p.(Val65Phe) par Postelmans *et al*, 2006). Les résultats étaient satisfaisants, bien que en deçà des résultats escomptés et la progression plus lente. Ces données sont caractéristiques des neuropathies auditives. L'implant cochléaire peut permettre la reconstitution d'une activité neuronale synchrone par le biais de l'électrostimulation, et ainsi améliorer les scores de discrimination vocale. Les patients décrivent au final un bénéfice significatif. On note que la prise en charge de ces surdités est souvent tardive, en rapport avec un retard de diagnostic de la surdité dans cette population. Ainsi, en cas d'implant cochléaire, les résultats auditifs sont corrélés à la durée de la neuropathie : les résultats sont meilleurs si l'implantation est précoce. On peut donc proposer un suivi audiométrique systématique des patients suivis pour NP, et une évaluation neurologique pour les enfants diagnostiqués pour surdité. Cette dernière proposition est actuellement réalisée au CHU de Limoges, pour les enfants suivis pour surdité sévère à profonde, voire en cas de surdité moyenne.

IV.3 Mécanismes d'apparition des surdités chez les patients atteints de neuropathies

IV.3.1 S'agit-il de neuropathie auditive uniquement ?

Il a longtemps été évoqué le fait que la surdité était liée à une neuropathie auditive et une atteinte du nerf cochléaire qui est myélinisé. Postlemans *et al* a ainsi suggéré que les variants pathogènes de *PMP22* ou délétions au niveau du domaine transmembranaire, pouvaient entrainer une hypo ou démyélination du nerf cochléaire (Postelmans *et al*, 2006). Verhagen *et al* ont également émis la démyélination du nerf auditif comme une explication de l'atteinte rétrocochléaire (Verhagen *et al*, 2005).

Dans notre étude, les neuropathies auditives ont été avérées dans cinq cas, à savoir trois cas chez des patients présentant une implication de *PMP22*, un cas de *TRPV4* et un cas d'*ABHD12*. Les symptômes de NP et surdité débutaient le plus souvent à l'âge adulte, alors qu'on aurait pu penser, du fait de la neuropathie, un début précoce et sévère. Les deux formes plus précoces étaient en rapport avec

des variants pathogènes : pour *PMP22* et possiblement *MYH14* et, *ABHD12* avec une neuropathie auditive dès l'âge de 5 ans.

Pour ces cinq cas, des PEA ont été réalisés et montraient une désynchronisation. Les OEA ont été retrouvées dans les dossiers médicaux ou réalisées en consultation dans trois cas, et étaient présentes dans tous les cas. Les PEA réalisés chez huit autres patients ne montraient pas de signe de NA.

Il est intéressant de souligner que le terme NA a été décrit au départ pour caractériser les surdités neurosensorielles chez des patients atteints de neuropathies sensitivo-motrices génétiques (Starr *et al*, 1996).

La surdité chez les patients NP ne semble donc pas uniquement de type NA.

IV.3.2 La surdité pourrait-elle être également endochléaire ?

Une surdité endocochléaire était retrouvée chez nos patients avec les variants pathogènes *PRPS1, PMP22, MPZ, SH3TC2* et *NEFL*. Cependant, il manque des informations dans certains cas pour préciser au mieux la surdité.

Des données de la littérature montrent que la protéine MPZ est exprimée dans une partie du nerf auditif au niveau du modiulus, mais également dans le ganglion spinal et dans l'organe de Corti (Cao *et al*, 1995). Une atteinte endocochléaire semble donc possible. Il serait utile de continuer dans ce sens avec l'étude de l'expression des autres protéines impliquées dans NP et surdité. L'étude de l'expression intracochléaire de ces différents gènes pourrait donc être utile à la compréhension de la physiopathologie.

La physiopathologie des neuropathies auditives est encore incomprise. La synaptopathie pourrait être une explication avec l'atteinte localisée à la jonction cellule ciliée-synapse, ou bien au niveau du nerf auditif. La neuropathie auditive est liée à une perte des cellules ciliées internes et de leurs synapses, un défaut de transmission synaptique aux neurones du ganglion spiral, et une rupture de propagation de l'information auditive le long du nerf auditif (Moser *et al*, 2016).

Les neurones du ganglion spiral sont des neurones bipolaires, enveloppés de cellules de Schwann dans la cochlée, et d'oligodendrocytes à l'entrée du tronc cérébral (Moser *et al*, 2016).

La surdité peut être liée à une atteinte conjointe des systèmes nerveux afférents et efférents dans la cochlée.

Il est important de préciser que l'apparition de surdité de perception après 60 ans, et prédominant sur les fréquences aigues, peut être en rapport avec une presbyacousie.

L'étude des produits de distorsion est donc nécessaire chez les patients NP, afin d'aider au diagnostic de NA.

IV.3.3 Où sont exprimés les 36 protéines NP+Surdité ?

Notre étude immunohistochimique, notamment sur les nerfs auditifs de rats WT, a permis de montrer la présence des protéines PMP22, MPZ, NEFL et TRPV4 à ce niveau, ce qui n'avait pas été réalisé jusqu'à présent. Cependant, un biais majeur de notre étude, est le faible nombre de cas étudiés. Il parait donc nécessaire d'étudier l'expression et le marquage protéique des 36 gènes impliqués dans NP et surdité, sur toute la longueur du nerf auditif, et plus spécifiquement du nerf cochléaire, mais également au niveau de la cochlée sur un plus grand nombre d'animaux. De plus, nous avons pu pister pour la première fois sur des nerfs auditifs de rats $CMT^{pmp22/+}$, la diminution de l'expression des protéines PMP22 et NEFL lorsqu'on se rapproche de la cochlée. Il s'agit donc d'une étude préliminaire. On peut se poser la question comment une surepression du gène PMP22 peut entrainer une diminution de l'expression le long du nerf. Par ailleurs, aucune relation entre PMP22 et NEFL n'a été mise en évidence. Or, le rat $CMT^{pmp22/+}$ a une diminution de l'expression de NEFL le long du nerf auditif. Une intrication entre ces deux protéines, l'une ayant une action sur la gaine de myéline, l'autre sur l'axone, est donc envisageable. Il est nécessaire de tester plus d'animaux avant de conclure.

De plus, lors de cette étude préliminaire, nous avons rencontrés des difficultés de prélèvement pour ne pas endommager le nerf auditif des rats. Par ailleurs, nous avions un accès limité aux anticorps et avons sélectionné les protéines fréquemment impliquées dans CMT, et à notre disposition. Pour perfectionner cette étude, il serait utile de tester des anticorps pour l'ensemble des 36 gènes NP + surdité sur des animaux WT, puis d'avoir à notre disposition différents modèles

animaux présentant des variants pathogènes sur les différents gènes d'intérêt NP+ surdité.

Un autre problème rencontré fut la décalcification de cochlée humaine. Une étude chez un cadavre humain, atteint de CMT2 et NA, avec le variant c.434A>C, p. (Tyr145Ser) de *MPZ*, avait permis de mettre en évidence une réduction significative de cellules du ganglion spiral, et la perte sélective des cellules ganglionnaires auditives et des fibres nerveuses avec conservation des cellules ciliées. Cependant, il s'agissait d'un cas unique familial (Starr *et al*, 2003). Il aurait été nécessaire de vérifier l'absence de variant pathogène dans les gènes de surdité, afin de pouvoir commencer à impliquer *MPZ* dans ces phénotypes comme nous l'avons précisé dans la partie **Résultats III.6 *MPZ*.**

Par ailleurs, des taux élevés de transcrits *PMP22* ont été retrouvé dans la cochlée fœtale humaine, ce qui implique que *PMP22* pourrait aussi altérer la fonction cochléo-vestibulaire indépendamment de son rôle dans la myéline périphérique et les cellules de Schwann (Robertson *et al*, 1994). Cependant peu de patients *PMP22* ont une surdité et il est alors difficile d'impliquer *PMP22* dans les surdités.

Un effet longueur de la neuropathie peut également être discuté. En effet, les patients qui développent une NP, et plus particulièrement CMT, ont une atteinte préférentielle aux membres inférieurs, voire supérieurs. Ceci signifie que les nerfs de gros calibres, tel que le nerf sciatique (diamètre de 15 mm), sont atteints. Or, comme nous l'avons décrit précédemment, le nerf cochléaire ne mesure que 2.4 cm, et est constitué de fibres myélinisés de type I. Il en est de même pour la longueur réduite des nerfs crâniens, qui peuvent être également affectés dans les NP tels que le nerf optique avec *PRPS1* ou *SH3TC2*, ou bien le nerf récurrent avec *TRPV4*, comme cela est le cas dans notre étude. Or l'atteinte des nerfs crâniens n'est pas systématique. On peut donc supposer que plus le nerf est long, plus l'atteinte est importante.

IV.3.4 Les 36 gènes interagissent-ils entre eux ?

Nous pouvons nous poser la question pourquoi ces 36 gènes sont impliqués dans NP et surdité. Nous avons étudié pour cela, les réseaux protéiques à l'aide d'une approche bioinformatique. Nous recherchions une ou des voies métaboliques communes pouvant expliquer le mécanisme de la surdité parmi les patients NP.

Cela n'a pas permis de mettre en évidence un pathway ou hub commun, mise à part la relation forte déjà connue entre PMP22 et MPZ (Hasse *et al*, 2004)

Cela est témoin de la complexité du réseau. En effet, PMP22 et MPZ complexent ensemble dans les cellules de Schwann. Cela laisse donc supposer que certains variants de *PMP22* peuvent être pathogènes en déstabilisant les interactions de *MPZ*, nécessaires à la formation et au maintien de la myéline compacte (Boerkel *et al*, 2002). Seulement, cela ne montre pas leur implication dans le processus d'apparition de la surdité chez certains patients NP.

Il serait intéressant de pousser les investigations en modifiant certains filtres, comme par exemple le score minimum d'interaction, mais cela risque de conduire à un nombre de liens trop important, avec certaines relations aberrantes.

Nous nous sommes attachés à étudier le niveau protéique, mais il pourrait être nécessaire d'évaluer au niveau génomique, voire transcriptomique. En effet, les protéines ne sont pas exprimées de la même façon ou en même quantité. Une autre option est une interaction entre ADN et protéine, ou bien entre ARN et protéine, ce que nous n'avons pas testé pour l'instant.

Les protéines impliquées se situent le long de la gaine de myéline (PMP22, MPZ), mais également le long de l'axone (NEFL), ou bien dans le corps cellulaire (TRPV4), comme la mitochondrie. Il serait extrêmement utile de connaître leurs interactions potentielles, mais l'approche *in silico* ne nous a pas permis de répondre à cette question. Des études fonctionnelles permettraient d'évaluer les éventuelles relations entre les différentes protéines.

Nous avons également recherché si les 36 gènes étaient à proximité génomiquement les uns des autres, ce qui n'est pas le cas.

IV.3.5 Existe-t-il des gènes modificateurs ?

Seuls 31% de nos patients avec des variants pathogènes de *SH3TC2*, avaient également une surdité. Il est possible que la surdité se manifeste plus tardivement, mais ce n'est pas certain. En effet, nous avons constaté une variabilité inter et intrafamiliale. En effet, dans la même famille, la surdité n'est pas rapportée à chaque génération, ou bien elle est de degrés divers.

L'expressivité variable inter et intrafamiliale peut laisser supposer la présence de gènes modificateurs. *SOX10*, gène impliqué dans le syndrome de Waardenburgh, notamment le type 4, mais également dans les neuropathies périphériques démyélinisantes, est un facteur de transcription. Ainsi, *SOX10* régule directement *GJB1* et *MPZ* (Bondurand *et al*, 2001). SOX10 est exprimée dans les cellules gliales du système nerveux et est aussi impliquée au cours du développement. Le variant pathogène g-713G>A dans le promoteur de *GJB1* associé à CMTX1, altère la régulation du promoteur par *SOX10*. Des variations de séquences dans ces deux gènes conduiraient éventuellement à des phénotypes différents au sein d'une même famille, pour laquelle, seul le varaint de *GJB1* aurait été pisté.

On constate également un phénotype plus sévère chez les patients *PMP22* tant au niveau de la NP, avec des patients en fauteuil roulant, que de la surdité avec une neuropathie auditive sévère. Outre un gène modificateur, l'implication d'un deuxième gène pourrait expliquer les phénotypes des patients.

Nous avons en effet mis en évidence deux patients avec des variants pathogènes à la fois pour *PMP22* et *COCH* et, *PMP22* et *MYH14*. Cela n'avait pas encore été démontré dans ce phénotype. Ceci semble plausible dans le cas des gènes *PMP22* et *MPZ*, très fréquemment impliqués dans le CMT, mais au final avec peu de patients sourds (0.06% et 3.33% respectivement dans notre cohorte de 3412 patients). On peut donc conclure que deux variants pathogènes indépendants sont responsables de phénotypes différents associés : un variant explique la NP et l'autre la surdité.

L'autre possibilité est l'action de l'environnement et de l'épigénétique sur cette population plus fragile.

IV.4 Apport des modèles animaux et/ou cellulaire pour aller plus loin

IV.4.1 Les rats CMT1A du laboratoire sont-ils sourds ?

Nous avons réalisé une étude préliminaire immunohistochimique sur des nerfs auditifs de rats contrôles et rats CMT. En effet, chez les rats $CMT^{pmp22/+}$, on constate une diminution du marquage sur le nerf auditif pour PMP22 et NEFL du tronc cérébral vers la cochlée.

Les rats n'étaient pas testés au niveau de l'audition. L'étude de sursaut acoustique aurait pu être utile pour évaluer l'audition des rats (Koch *et al*, 1997), tout comme l'étude des PEA.

Cependant se pose la question de savoir si une duplication de *Pmp22* perturbe l'expression de NEFL, sachant que le lieu d'action de ces protéines diffère. On peut se demander s'il s'agit d'interférence, ou bien si l'atteinte de la gaine de myéline, va induire dans une certaine proportion une atteinte de l'axone. En clinique, c'est l'inverse qui est observé, avec une atteinte démyélinisante dans les formes axonales évoluées. Une intrication de ces phénomènes est donc plausible.

IV.4.2 Les autres modèles animaux

Le développement d'un modèle animal est donc nécessaire à la fois pour mieux comprendre la physiopathologie, mais également à visée thérapeutique. Nous avons utilisé un modèle de rat CMT1A pour notre étude immunohistochimique, mais ce n'est certainement pas le meilleur modèle pour évaluer la fonction auditive.

Le modèle de zebrafish a été développé pour *PRPS1* à partir de variants pathogènes ponctuels. Le phénotype était caractérisé par des yeux plus petits et une diminution des cellules ciliées, ce qui correspond à l'atrophie optique et la surdité. Le double mutant avait également un développement anormal des motoneurones primaires, de l'innervation des cellules ciliées et des leucocytes diminués, en rapport avec la neuropathie et les infections récurrentes (Pei *et al*, 2016). Ce modèle pourrait être extrêment intéressant pour les études de physiopathologie de la surdité.

De multiples modèles murins ont été développés pour CMT (Fledrich *et al*, 2012). Un modèle a été mis au point avec *MPZ,* comme protéine de

l'inflammation, pour les surdités auto-immunes (Matsuoka *et al*, 1999). Cependant, aucun modèle murin de NP avec surdité n'a été élaboré jusqu'alors. Cela constitue une piste à investiguer et permettrait ainsi d'une part, de localiser précisément les 36 protéines impliquées dans NP et surdité, et d'autre part, d'ouvrir des perspectives thérapeutiques.

IV.4.3 Modèles cellulaires

Une autre possibilité est le développement d'un modèle cellulaire à partir d'iPSc, dérivées des fibroblastes de nos patients. Ces iPSc pourraient être différenciées en différentes lignées cellulaires, tels que les motoneurones ou les nerfs auditifs. Cette stratégie est initiée dans notre laboratoire EA6309. Une différenciation plus poussée en neurones du ganglion spiral pourrait également être contributive. Ceci pourrait nous permettre de comprendre la physiopathologie des pathologies impliquées et donc de développer des essais thérapeutiques par la suite.

Ainsi, Chen *et al* ont réussi à différencier des iPSCs de souris en cellules ciliées et cellules du ganglion spiral après transplantation dans la cochlée murine, mais il n'était pas constaté d'amélioration des PEA à court terme (Chen *et al*, 2017).

IV.5 Thérapie

Peu d'études existent à l'heure actuelle sur le traitement des NP. Une orientation possible est l'utilisation de Crispr/Cas9. En effet, cet outil génomique permettant les ruptures ciblées des doubles brins d'ADN, pourrait permettre la correction du gène défectueux parmi les 36 gènes impliqués dans NP et surdité.

Cela a déjà été testé sur un modèle murin muté *gjb1*, par une unique injection intrathécale. L'expression de la connexine 32 était présente jusqu'à 50% des cellules de Schwann des racines lombaires dorsales ou des nerfs périphériques (Kagiava *et al*, 2016).

La curcumine est également une approche thérapeutique, puisqu'elle permet la promotion de la différenciation des cellules de Schwann et l'amélioration de neuropathie CMT1B pour le variant p.(Arg98Cys), en réduisant la réponse des protéines dépliées et en réduisant le stress du reticulum endoplasmique (Patzko *et al*, 2012). Cette approche est également utilisée actuellement dans notre

laboratoire. Des doses locales de curcumine améliore la récupération et la remyélination d'écrasement du nerf sciatique dans un modèle de rat CMT$^{pmp22/+}$, par l'inhibition du stress oxydatif (Caillaud *et al,* 2018). Ce traitement augmente l'expression de MPZ et PMP22, l'épaisseur de la gaine de myéline, et donc les vitesses de conduction motrices et sensitives.

V. CONCLUSION

Lors de cette étude, nous avons pu caractériser les phénotypes variés des patients atteints de NP génétique et surdité (1.29%), et ainsi constater que la surdité peut être endo, rétro ou endo et rétrocochléaire.

Trente-six gènes ont été rapportés comme associées à NP et surdité. Le génotype a pu être établi dans 60% des cas, avec la découverte de sept nouveaux variants pathogènes dans cinq gènes différents. Nous avons également démontré que *PMP22*, bien qu'étant le gène le plus impliqué dans les CMT, ne l'était pas forcément dans les surdités. C'est pour cela que l'implication d'un deuxième gène indépendant a été trouvée dans deux cas : *PMP22* avec *COCH* et *PMP22* avec *MYH14*. Dans une moindre mesure, une tendance semblable semble se dégager pour *MPZ*.

Des corrélations génotypes-phénotypes ont pu être mises en évidence avec les gènes *ABHD12, SH3TC2, NEFL et PRPS1*, ce qui peut être une grande aide au diagnostic.

L'étude préliminaire immunohistochimique sur des nerfs auditifs de rats contrôles et rats CMT, a permis de souligner une diminution du marquage sur le nerf auditif pour PMP22 et NEFL du tronc cérébral vers la cochlée chez les rats $CMT^{pmp22/+}$. La poursuite des travaux de recherche sur l'expression des 36 protéines impliquées, dans la cochlée et le nerf cochléaire, pourrait être utile pour la compréhension de la physiopathologie.

La recherche *in silico* de voies communes à ces différents gènes a permis de confirmer le « hub moléculaire » entre PMP22 et MPZ, mais n'a pas permis de mettre en évidence de réseaux supplémentaires. Cette thèse montre également que la surdité est très certainement sous-diagnostiquée dans cette population de NP génétique. Nous proposons donc un suivi audiométrique systématique des patients atteints de NP héréditaire, et une évaluation neurologique pour les enfants diagnostiqués pour surdité génétique. Une exploration vestibulaire pourra compléter ce bilan. En effet, le diagnostic reste difficile, avec des écarts de près de 40 ans entre les deux symptômes, et une progression possible vers la surdité profonde. L'implant cochléaire peut être proposé mais une prise en charge précoce permettrait d'obtenir de meilleurs résultats.

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abe A, Numakura C, Saito K, Koide H, Oka N, Honma A, et al. Neurofilament light chain polypeptide gene mutations in Charcot-Marie-Tooth disease: nonsense mutation probably causes a recessive phenotype. J Hum Genet. févr 2009;54(2):94-7.

2. Adebola AA, Di Castri T, He C-Z, Salvatierra LA, Zhao J, Brown K, et al. Neurofilament light polypeptide gene N98S mutation in mice leads to neurofilament network abnormalities and a Charcot-Marie-Tooth Type 2E phenotype. Hum Mol Genet. 15 avr 2015;24(8):2163-74.

3. Agrahari AK, Sneha P, George Priya Doss C, Siva R, Zayed H. A profound computational study to prioritize the disease-causing mutations in PRPS1 gene. Metab Brain Dis. avr 2018;33(2):589-600.

4. Almoguera B, He S, Corton M, Fernandez-San Jose P, Blanco-Kelly F, López-Molina MI, et al. Expanding the phenotype of PRPS1 syndromes in females: neuropathy, hearing loss and retinopathy. Orphanet J Rare Dis. 10 déc 2014;9:190.

5. Anzalone CL, Nuhanovic S, Olund AP, Carlson ML. Cochlear Implantation in Charcot-Marie-Tooth Disease: Case Report and Review of the Literature. Case Rep Med. 2018;2018:1760978.

6. Arnaud E, Zenker J, de Preux Charles A-S, Stendel C, Roos A, Médard J-J, et al. SH3TC2/KIAA1985 protein is required for proper myelination and the integrity of the node of Ranvier in the peripheral nervous system. Proc Natl Acad Sci USA. 13 oct 2009;106(41):17528-33.

7. Arts WF, Loonen MC, Sengers RC, Slooff JL. X-linked ataxia, weakness, deafness, and loss of vision in early childhood with a fatal course. Ann Neurol. mai 1993;33(5):535-9.

8. Azzedine H, LeGuern E, Salih MA. Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 4C. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., éditeurs. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 23 oct 2018]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1340/

9. Bae S-H, Robertson NG, Cho H-J, Morton CC, Jung DJ, Baek J-I, et al. Identification of pathogenic mechanisms of COCH mutations, abolished cochlin secretion, and intracellular aggregate formation: genotype-phenotype correlations in DFNA9 deafness and vestibular disorder. Hum Mutat. déc 2014;35(12):1506-13.

10. Baloh RH, Jen JC, Kim G, Baloh RW. Chronic cough due to Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ gene). Neurology. 25 mai 2004;62(10):1905-6.

11. Barwick KES, Wright J, Al-Turki S, McEntagart MM, Nair A, Chioza B, et al. Defective presynaptic choline transport underlies hereditary motor neuropathy. Am J Hum Genet. 7 déc 2012;91(6):1103-7.

12. Becker MA, Heidler SA, Bell GI, Seino S, Le Beau MM, Westbrook CA, et al. Cloning of cDNAs for human phosphoribosylpyrophosphate synthetases 1 and 2 and X chromosome localization of PRPS1 and PRPS2 genes. Genomics. nov 1990;8(3):555-61.

13. Ben-Ari Fuchs S, Lieder I, Stelzer G, Mazor Y, Buzhor E, Kaplan S, et al. GeneAnalytics: An Integrative Gene Set Analysis Tool for Next Generation Sequencing, RNAseq and Microarray Data. OMICS. mars 2016;20(3):139-51.

14. Blankman JL, Long JZ, Trauger SA, Siuzdak G, Cravatt BF. ABHD12 controls brain lysophosphatidylserine pathways that are deregulated in a murine model of the neurodegenerative disease PHARC. Proc Natl Acad Sci USA. 22 janv

2013;110(4):1500-5.

15. Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. Chem Biol. déc 2007;14(12):1347-56.

16. Boerkoel CF, Takashima H, Garcia CA, Olney RK, Johnson J, Berry K, et al. Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype-phenotype correlation. Ann Neurol. févr 2002;51(2):190-201.

17. Bombelli F, Stojkovic T, Dubourg O, Echaniz-Laguna A, Tardieu S, Larcher K, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A: from typical to rare phenotypic and genotypic features. JAMA Neurol. août 2014;71(8):1036-42.

18. Bondurand N, Girard M, Pingault V, Lemort N, Dubourg O, Goossens M. Human Connexin 32, a gap junction protein altered in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor SOX10. Hum Mol Genet. 15 nov 2001;10(24):2783-95.

19. Bondurand N, Dastot-Le Moal F, Stanchina L, Collot N, Baral V, Marlin S, et al. Deletions at the SOX10 gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4. Am J Hum Genet. déc 2007;81(6):1169-85.

20. Buetti B, Luxon LM. Vestibular involvement in peripheral neuropathy: a review. Int J Audiol. juin 2014;53(6):353-9.

21. Butinar D, Zidar J, Leonardis L, Popovic M, Kalaydjieva L, Angelicheva D, et al. Hereditary auditory, vestibular, motor, and sensory neuropathy in a Slovenian Roma (Gypsy) kindred. Ann Neurol. juill 1999;46(1):36-44.

22. Butinar D, Starr A, Zidar J, Koutsou P, Christodoulou K. Auditory nerve is affected in one of two different point mutations of the neurofilament light gene. Clin Neurophysiol. févr 2008;119(2):367-75.

23. Caillaud M, Chantemargue B, Richard L, Vignaud L, Favreau F, Faye P-A, et al. Local low dose curcumin treatment improves functional recovery and remyelination in a rat model of sciatic nerve crush through inhibition of oxidative stress. Neuropharmacology. 1 sept 2018;139:98-116.

24. Cao MY, Gersdorff M, Deggouj N, Warny M, Tomasi JP. Detection of inner ear disease autoantibodies by immunoblotting. Mol Cell Biochem. 24 mai 1995;146(2):157-63.

25. Chaïb H, Place C, Salem N, Chardenoux S, Vincent C, Weissenbach J, et al. A gene responsible for a sensorineural nonsyndromic recessive deafness maps to chromosome 2p22-23. Hum Mol Genet. janv 1996;5(1):155-8.

26. Chapon F, Latour P, Diraison P, Schaeffer S, Vandenberghe A. Axonal phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease associated with a mutation in the myelin protein zero gene. J Neurol Neurosurg Psychiatry. juin 1999;66(6):779-82.

27. Chen AH, Ni L, Fukushima K, Marietta J, O'Neill M, Coucke P, et al. Linkage of a gene for dominant non-syndromic deafness to chromosome 19. Hum Mol Genet. juin 1995;4(6):1073-6.

28. Chen D-H, Naydenov A, Blankman JL, Mefford HC, Davis M, Sul Y, et al. Two novel mutations in ABHD12: expansion of the mutation spectrum in PHARC and assessment of their functional effects. Hum Mutat. déc 2013;34(12):1672-8.

29. Chen J, Guan L, Zhu H, Xiong S, Zeng L, Jiang H. Transplantation of mouse-induced pluripotent stem cells into the cochlea for the treatment of sensorineural hearing loss. Acta Otolaryngol. nov 2017;137(11):1136-42.

30. Choi B-O, Kang SH, Hyun YS, Kanwal S, Park SW, Koo H, et al. A complex phenotype of peripheral neuropathy, myopathy, hoarseness, and hearing loss is linked to an autosomal dominant mutation in MYH14. Hum Mutat. juin 2011;32(6):669-77.

31. Claramunt R, Sevilla T, Lupo V, Cuesta A, Millán JM, Vílchez JJ, et al. The p.R1109X mutation in SH3TC2 gene is predominant in Spanish Gypsies with Charcot-Marie-Tooth disease type 4. Clin Genet. avr 2007;71(4):343-9.

32. D'Urso D, Ehrhardt P, Müller HW. Peripheral myelin protein 22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. J Neurosci. 1 mai 1999;19(9):3396-403.

33. de Brouwer APM, van Bokhoven H, Nabuurs SB, Arts WF, Christodoulou J, Duley J. PRPS1 mutations: four distinct syndromes and potential treatment. Am J Hum Genet. 9 avr 2010;86(4):506-18.

34. De Jonghe P, Mersivanova I, Nelis E, Del Favero J, Martin JJ, Van Broeckhoven C, et al. Further evidence that neurofilament light chain gene mutations can cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. Ann Neurol. févr 2001;49(2):245-9.

35. De Jonghe P, Timmerman V, Ceuterick C, Nelis E, De Vriendt E, Löfgren A, et al. The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype. Brain. févr 1999;122 (Pt 2):281-90.

36. De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat J-M, Tazir M, Kassouri N, et al. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. Am J Hum Genet. mars 2002;70(3):726-36.

37. Del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, et al. Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. Am J Hum Genet. déc 2003;73(6):1452-8.

38. Docherty RJ, Charlesworth G, Farrag K, Bhattacharjee A, Costa S. The use of the rat isolated vagus nerve for functional measurements of the effect of drugs in vitro. J Pharmacol Toxicol Methods. juin 2005;51(3):235-42.

39. Duan X, Gu W, Hao Y, Wang R, Wen H, Sun S, et al. A Novel Asp121Asn Mutation of Myelin Protein Zero Is Associated with Late-Onset Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease, Hearing Loss and Pupil Abnormalities. Front Aging Neurosci. 2016;8:222.

40. Dyck PJ, Litchy WJ, Minnerath S, Bird TD, Chance PF, Schaid DJ, et al. Hereditary motor and sensory neuropathy with diaphragm and vocal cord paresis. Ann Neurol. mai 1994;35(5):608-15.

41. Eisenberger T, Slim R, Mansour A, Nauck M, Nürnberg G, Nürnberg P, et al. Targeted next-generation sequencing identifies a homozygous nonsense mutation in ABHD12, the gene underlying PHARC, in a family clinically diagnosed with Usher syndrome type 3. Orphanet J Rare Dis. 2 sept 2012;7:59.

42. Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). Nat Genet. déc 1997;17(4):411-22.

43. Fabrizi GM, Cavallaro T, Angiari C, Cabrini I, Taioli F, Malerba G, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2E, a disorder of the cytoskeleton. Brain. févr 2007;130(Pt 2):394-403.

44. Fiorentino A, Fujinami K, Arno G, Robson AG, Pontikos N, Arasanz Armengol M, et al. Missense variants in the X-linked gene PRPS1 cause retinal degeneration in females. Hum Mutat. 2018;39(1):80-91.

45. Fledrich R, Stassart RM, Sereda MW. Murine therapeutic models for Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease. Br Med Bull. juin 2012;102:89-113.

46. Frasquet M, Lupo V, Chumillas MJ, Vázquez-Costa JF, Espinós C, Sevilla T. Phenotypical features of two patients diagnosed with PHARC syndrome and carriers of a new homozygous mutation in the ABHD12 gene. J Neurol Sci. 15 avr 2018;387:134-8.

47. Fridman V, Bundy B, Reilly MM, Pareyson D, Bacon C, Burns J, et al. CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: a cross-sectional analysis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. août 2015;86(8):873-8.

48. García IE, Maripillán J, Jara O, Ceriani R, Palacios-Muñoz A, Ramachandran J, et al. Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome-associated Cx26 mutants produce nonfunctional gap junctions but hyperactive hemichannels when co-expressed with wild type Cx43. J Invest Dermatol. mai 2015;135(5):1338-47.

49. Gentil BJ, Mushynski WE, Durham HD. Heterogeneity in the properties of NEFL mutants causing Charcot-Marie-Tooth disease results in differential effects on neurofilament assembly and susceptibility to intervention by the chaperone-inducer, celastrol. Int J Biochem Cell Biol. juill 2013;45(7):1499-508.

50. Gooding R, Colomer J, King R, Angelicheva D, Marns L, Parman Y, et al. A novel Gypsy founder mutation, p.Arg1109X in the CMT4C gene, causes variable peripheral neuropathy phenotypes. J Med Genet. déc 2005;42(12):e69.

51. Goswamy J, Bruce IA, Green KMJ, O'Driscoll MP. Cochlear implantation in a patient with sensori-neural deafness secondary to Charcot-Marie-Tooth disease. Cochlear Implants Int. août 2012;13(3):184-7.

52. Grandis M, Vigo T, Passalacqua M, Jain M, Scazzola S, La Padula V, et al. Different cellular and molecular mechanisms for early and late-onset myelin protein zero mutations. Hum Mol Genet. 1 juill 2008;17(13):1877-89.

53. Hackney CM, Furness DN. The composition and role of cross links in mechanoelectrical transduction in vertebrate sensory hair cells. J Cell Sci. 15 avr 2013;126(Pt 8):1721-31.

54. Hasse B, Bosse F, Hanenberg H, Müller HW. Peripheral myelin protein 22 kDa and protein zero: domain specific trans-interactions. Mol Cell Neurosci. déc 2004;27(4):370-8.

55. Hayasaka K, Himoro M, Wang Y, Takata M, Minoshima S, Shimizu N, et al. Structure and chromosomal localization of the gene encoding the human myelin protein zero (MPZ). Genomics. sept 1993;17(3):755-8.

56. Horga A, Laurà M, Jaunmuktane Z, Jerath NU, Gonzalez MA, Polke JM, et al. Genetic and clinical characteristics of NEFL-related Charcot-Marie-Tooth disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2017;88(7):575-85.

57. Ikezono T, Omori A, Ichinose S, Pawankar R, Watanabe A, Yagi T. Identification of the protein product of the Coch gene (hereditary deafness gene) as the major component of bovine inner ear protein. Biochim Biophys Acta. 26 mars 2001;1535(3):258-65.

58. Ionasescu V, Searby C, Ionasescu R. Point mutations of the connexin32 (GJB1) gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. Hum Mol Genet. févr 1994;3(2):355-8.

59. Jonard L, Marlin S, Louha M, Bonnet C, Couderc R, Garabedian N, et al. Molecular diagnosis of genetic deafness. Clin Biochem. mai 2011;44(7):510-1.

60. Jordanova A, De Jonghe P, Boerkoel CF, Takashima H, De Vriendt E, Ceuterick C, et al. Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease. Brain. mars 2003;126(Pt 3):590-7.

61. Julien JP, Grosveld F, Yazdanbaksh K, Flavell D, Meijer D, Mushynski W. The structure of a human neurofilament gene (NF-L): a unique exon-intron organization in the intermediate filament gene family. Biochim Biophys Acta. 6 juin 1987;909(1):10-20.

62. Kabzińska D, Korwin-Piotrowska T, Drechsler H, Drac H, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kochański A. Late-onset Charcot-Marie-Tooth type 2 disease with hearing impairment associated with a novel Pro105Thr mutation in the MPZ gene. Am J Med Genet A. 15 sept 2007;143A(18):2196-9.

63. Kagiava A, Sargiannidou I, Theophilidis G, Karaiskos C, Richter J, Bashiardes S, et al. Intrathecal gene therapy rescues a model of demyelinating peripheral neuropathy. Proc Natl Acad Sci USA. 26 avr 2016;113(17):E2421-2429.

64. Kernohan KD, Cigana Schenkel L, Huang L, Smith A, Pare G, Ainsworth P, et al. Identification of a methylation profile for DNMT1-associated autosomal dominant cerebellar ataxia, deafness, and narcolepsy. Clin Epigenetics. 2016;8:91.

65. Kilfoyle DH, Dyck PJ, Wu Y, Litchy WJ, Klein DM, Dyck PJB, et al. Myelin protein zero mutation His39Pro: hereditary motor and sensory neuropathy with variable onset, hearing loss, restless legs and multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. août 2006;77(8):963-6.

66. Kim H-J, Sohn K-M, Shy ME, Krajewski KM, Hwang M, Park J-H, et al. Mutations in PRPS1, which encodes the phosphoribosyl pyrophosphate synthetase enzyme critical for nucleotide biosynthesis, cause hereditary peripheral neuropathy with hearing loss and optic neuropathy (cmtx5). Am J Hum Genet. sept 2007;81(3):552-8.

67. Klein CJ. DNMT1-Related Dementia, Deafness, and Sensory Neuropathy. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., éditeurs. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 23 oct 2018]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK84112/

68. Klein CJ, Botuyan M-V, Wu Y, Ward CJ, Nicholson GA, Hammans S, et al. Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss. Nat Genet. juin 2011;43(6):595-600.

69. Koch M, Schnitzler HU. The acoustic startle response in rats--circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. Behav Brain Res. déc 1997;89(1-2):35-49.

70. Kovach MJ, Campbell KCM, Herman K, Waggoner B, Gelber D, Hughes LF, et al. Anticipation in a unique family with Charcot-Marie-Tooth syndrome and deafness: delineation of the clinical features and review of the literature. Am J Med Genet. 1 avr

2002;108(4):295-303.

71. Lagueny A, Latour P, Vital A, Rajabally Y, Le Masson G, Ferrer X, et al. Peripheral myelin modification in CMT1B correlates with MPZ gene mutations. Neuromuscul Disord. oct 1999;9(6-7):361-7.

72. Landouré G, Sullivan JM, Johnson JO, Munns CH, Shi Y, Diallo O, et al. Exome sequencing identifies a novel TRPV4 mutation in a CMT2C family. Neurology. 10 juill 2012;79(2):192-4.

73. Lautermann J, ten Cate WJ, Altenhoff P, Grümmer R, Traub O, Frank H, et al. Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. Cell Tissue Res. déc 1998;294(3):415-20.

74. Lerat J, Cintas P, Beauvais-Dzugan H, Magdelaine C, Sturtz F, Lia A-S. A complex homozygous mutation in ABHD12 responsible for PHARC syndrome discovered with NGS and review of the literature. J Peripher Nerv Syst. juin 2017;22(2):77-84.

75. Lerat J, Jonard L, Loundon N, Christin-Maitre S, Lacombe D, Goizet C, et al. An Application of NGS for Molecular Investigations in Perrault Syndrome: Study of 14 Families and Review of the Literature. Hum Mutat. 2016;37(12):1354-62.

76. Leung CL, Nagan N, Graham TH, Liem RKH. A novel duplication/insertion mutation of NEFL in a patient with Charcot-Marie-Tooth disease. Am J Med Genet A. 1 mai 2006;140(9):1021-5.

77. Li S, Lu Y, Peng B, Ding J. Crystal structure of human phosphoribosylpyrophosphate synthetase 1 reveals a novel allosteric site. Biochem J. 1 janv 2007;401(1):39-47.

78. Likar T, Hasanhodžić M, Teran N, Maver A, Peterlin B, Writzl K. Diagnostic outcomes of exome sequencing in patients with syndromic or non-syndromic hearing loss. PLoS ONE. 2018;13(1):e0188578.

79. Liu W, Boström M, Kinnefors A, Rask-Andersen H. Unique expression of connexins in the human cochlea. Hear Res. avr 2009;250(1-2):55-62.

80. Liu XZ, Yuan H, Mittal R, Yan D. DFNX1 Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., éditeurs. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 23 oct 2018]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57098/

81. Liu X, Han D, Li J, Han B, Ouyang X, Cheng J, et al. Loss-of-function mutations in the PRPS1 gene cause a type of nonsyndromic X-linked sensorineural deafness, DFN2. Am J Hum Genet. janv 2010;86(1):65-71.

82. López-Bigas N, Arbonés ML, Estivill X, Simonneau L. Expression profiles of the connexin genes, Gjb1 and Gjb3, in the developing mouse cochlea. Gene Expr Patterns. nov 2002;2(1-2):113-7.

83. Luhmann UFO, Carvalho LS, Holthaus S-MK, Cowing JA, Greenaway S, Chu CJ, et al. The severity of retinal pathology in homozygous Crb1rd8/rd8 mice is dependent on additional genetic factors. Hum Mol Genet. 1 janv 2015;24(1):128-41.

84. Luigetti M, Zollino M, Conti G, Romano A, Sabatelli M. Inherited neuropathies and deafness caused by a PMP22 point mutation: a case report and a review of the literature. Neurol Sci. sept 2013;34(9):1705-7.

85. Maeda Y, Fukushima K, Kariya S, Orita Y, Nishizaki K. Dexamethasone Regulates Cochlear Expression of Deafness-associated Proteins Myelin Protein Zero and Heat Shock Protein 70, as Revealed by iTRAQ Proteomics. Otol Neurotol. août 2015;36(7):1255-65.

86. Magy L, Mathis S, Le Masson G, Goizet C, Tazir M, Vallat J-M. Updating the classification of inherited neuropathies: Results of an international survey. Neurology. 6 mars 2018;90(10):e870-6.

87. Manolis EN, Yandavi N, Nadol JB, Eavey RD, McKenna M, Rosenbaum S, et al. A gene for non-syndromic autosomal dominant progressive postlingual sensorineural hearing loss maps to chromosome 14q12-13. Hum Mol Genet. juill 1996;5(7):1047-50.

88. Marlin S, Feldmann D, Nguyen Y, Rouillon I, Loundon N, Jonard L, et al. Temperature-sensitive auditory neuropathy associated with an otoferlin mutation: Deafening fever! Biochem Biophys Res Commun. 9 avr 2010;394(3):737-42.

89. Marrosu MG, Vaccargiu S, Marrosu G, Vannelli A, Cianchetti C, Muntoni F. Charcot-Marie-Tooth disease type 2 associated with mutation of the myelin protein zero gene. Neurology. mai 1998;50(5):1397-401.

90. Martini R. P0-deficient knockout mice as tools to understand pathomechanisms in Charcot-Marie-Tooth 1B and P0-related Déjérine-Sottas syndrome. Ann N Y Acad Sci. 14 sept 1999;883:273-80.

91. Mastaglia FL, Nowak KJ, Stell R, Phillips BA, Edmondston JE, Dorosz SM, et al. Novel mutation in the myelin protein zero gene in a family with intermediate hereditary motor and sensory neuropathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry. août 1999;67(2):174-9.

92. Mathis S, Goizet C, Tazir M, Magdelaine C, Lia A-S, Magy L, et al. Charcot-Marie-Tooth diseases: an update and some new proposals for the classification. J Med Genet. oct 2015;52(10):681-90.

93. Matsuoka H, Cheng KC, Krug MS, Yazawa Y, Yoo TJ. Murine model of autoimmune hearing loss induced by myelin protein P0. Ann Otol Rhinol Laryngol. mars 1999;108(3):255-64.

94. Migliosi V, Modamio-Høybjør S, Moreno-Pelayo MA, Rodríguez-Ballesteros M, Villamar M, Tellería D, et al. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. J Med Genet. juill 2002;39(7):502-6.

95. Mirghomizadeh F, Bardtke B, Devoto M, Pfister M, Oeken J, König E, et al. Second family with hearing impairment linked to 19q13 and refined DFNA4 localisation. Eur J Hum Genet. févr 2002;10(2):95-9.

96. Misu K, Yoshihara T, Shikama Y, Awaki E, Yamamoto M, Hattori N, et al. An axonal form of Charcot-Marie-Tooth disease showing distinctive features in association with mutations in the peripheral myelin protein zero gene (Thr124Met or Asp75Val). J Neurol Neurosurg Psychiatry. déc 2000;69(6):806-11.

97. Mittal R, Patel K, Mittal J, Chan B, Yan D, Grati M, et al. Association of PRPS1 Mutations with Disease Phenotypes. Dis Markers. 2015;2015:127013.

98. Moser T, Predoehl F, Starr A. Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. Otol Neurotol. août 2013;34(6):995-1004.

99. Moser T, Starr A. Auditory neuropathy--neural and synaptic mechanisms. Nat Rev Neurol. mars 2016;12(3):135-49.

100. Murphy SM, Laura M, Fawcett K, Pandraud A, Liu Y-T, Davidson GL, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. J Neurol Neurosurg Psychiatry. juill 2012;83(7):706-10.

101. Natout MA, Terr LI, Linthicum FH, House WF. Topography of vestibulocochlear nerve fibers in the posterior cranial fossa. Laryngoscope. août 1987;97(8 Pt 1):954-8.

102. Navia-Paldanius D, Savinainen JR, Laitinen JT. Biochemical and pharmacological characterization of human α/β-hydrolase domain containing 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12). J Lipid Res. nov 2012;53(11):2413-24.

103. Nicholson GA. Hereditary Sensory Neuropathy Type IA. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., éditeurs. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 23 oct 2018]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1390/

104. Nishiguchi KM, Avila-Fernandez A, van Huet RAC, Corton M, Pérez-Carro R, Martín-Garrido E, et al. Exome sequencing extends the phenotypic spectrum for ABHD12 mutations: from syndromic to nonsyndromic retinal degeneration. Ophthalmology. août 2014;121(8):1620-7.

105. Nishikura N, Yamagata T, Morimune T, Matsui J, Sokoda T, Sawai C, et al. X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 5 with recurrent weakness after febrile illness. Brain Dev. 31 août 2018;

106. Nystad M, Fagerheim T, Brox V, Fortunato EA, Nilssen Ø. Human cytomegalovirus (HCMV) and hearing impairment: infection of fibroblast cells with HCMV induces chromosome breaks at 1q23.3, between loci DFNA7 and DFNA49 -- both involved in dominantly inherited, sensorineural, hearing impairment. Mutat Res. 1 janv 2008;637(1-2):56-65.

107. Palla A, Schmid-Priscoveanu A, Studer A, Hess K, Straumann D. Deficient high-acceleration vestibular function in patients with polyneuropathy. Neurology. 9 juin 2009;72(23):2009-13.

108. Park J, Hyun YS, Kim YJ, Nam SH, Kim S-H, Hong YB, et al. Exome Sequencing Reveals a Novel PRPS1 Mutation in a Family with CMTX5 without Optic Atrophy. J Clin Neurol. oct 2013;9(4):283-8.

109. Patzkó A, Bai Y, Saporta MA, Katona I, Wu X, Vizzuso D, et al. Curcumin derivatives promote Schwann cell differentiation and improve neuropathy in R98C CMT1B mice. Brain. déc 2012;135(Pt 12):3551-66.

110. Patzko A, Shy ME. Charcot-Marie-Tooth disease and related genetic neuropathies. Continuum (Minneap Minn). févr 2012;18(1):39-59.

111. Pauw RJ, Huygen PLM, Collin RWJ, Cruysberg JRM, Hoefsloot LH, Kremer H, et al. Phenotype description of a novel DFNA9/COCH mutation, I109T. Ann Otol Rhinol Laryngol. mai 2007;116(5):349-57.

112. Pei W, Xu L, Varshney GK, Carrington B, Bishop K, Jones M, et al. Additive reductions in zebrafish PRPS1 activity result in a spectrum of deficiencies modeling several human PRPS1-associated diseases. Sci Rep. 18 2016;6:29946.

113. Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Préhu MO, Puliti A, et al. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. Nat Genet. févr 1998;18(2):171-3.

114. Pingault V, Bodereau V, Baral V, Marcos S, Watanabe Y, Chaoui A, et al. Loss-of-function mutations in SOX10 cause Kallmann syndrome with deafness. Am J Hum Genet. 2 mai 2013;92(5):707-24.

115. Pisciotta C, Bai Y, Brennan KM, Wu X, Grider T, Feely S, et al. Reduced neurofilament expression in cutaneous nerve fibers of patients with CMT2E. Neurology. 21 juill 2015;85(3):228-34.

116. Piscosquito G, Saveri P, Magri S, Ciano C, Gandioli C, Morbin M, et al. Screening for SH3TC2 gene mutations in a series of demyelinating recessive Charcot-Marie-Tooth disease (CMT4). J Peripher Nerv Syst. 2016;21(3):142-9.

117. Plaisier E, Mougenot B, Verpont MC, Jouanneau C, Archelos JJ, Martini R, et al. Glomerular permeability is altered by loss of P0, a myelin protein expressed in glomerular epithelial cells. J Am Soc Nephrol. nov 2005;16(11):3350-6.

118. Postelmans JTF, Stokroos RJ. Cochlear implantation in a patient with deafness induced by Charcot-Marie-Tooth disease (hereditary motor and sensory neuropathies). J Laryngol Otol. juin 2006;120(6):508-10.

119. Pusch C, Hustert E, Pfeifer D, Südbeck P, Kist R, Roe B, et al. The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor. Hum Genet. août 1998;103(2):115-23.

120. Robertson NG, Khetarpal U, Gutiérrez-Espeleta GA, Bieber FR, Morton CC. Isolation of novel and known genes from a human fetal cochlear cDNA library using subtractive hybridization and differential screening. Genomics. 1 sept 1994;23(1):42-50.

121. Robusto M, Fang M, Asselta R, Castorina P, Previtali SC, Caccia S, et al. The expanding spectrum of PRPS1-associated phenotypes: three novel mutations segregating with X-linked hearing loss and mild peripheral neuropathy. Eur J Hum Genet. juin 2015;23(6):766-73.

122. Rossor AM, Polke JM, Houlden H, Reilly MM. Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. Nat Rev Neurol. oct 2013;9(10):562-71.

123. Sanmaneechai O, Feely S, Scherer SS, Herrmann DN, Burns J, Muntoni F, et al. Genotype-phenotype characteristics and baseline natural history of heritable neuropathies caused by mutations in the MPZ gene. Brain. nov 2015;138(Pt 11):3180-92.

124. Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. J Cell Sci. mars 2001;114(Pt 5):867-74.

125. Savinainen JR, Saario SM, Laitinen JT. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. Acta Physiol (Oxf). févr 2012;204(2):267-76.

126. Savinainen JR, Navia-Paldanius D, Laitinen JT. A Sensitive and Versatile Fluorescent Activity Assay for ABHD12. Methods Mol Biol. 2016;1412:179-89.

127. Schoen CJ, Burmeister M, Lesperance MM. Diaphanous homolog 3 (Diap3) overexpression causes progressive hearing loss and inner hair cell defects in a transgenic mouse model of human deafness. PLoS ONE. 2013;8(2):e56520.

128. Seeman P, Mazanec R, Huehne K, Suslíková P, Keller O, Rautenstrauss B. Hearing loss as the first feature of late-onset axonal CMT disease due to a novel P0 mutation. Neurology. 24 août 2004;63(4):733-5.

129. Senderek J, Bergmann C, Stendel C, Kirfel J, Verpoorten N, De Jonghe P, et al. Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy. Am J Hum Genet. nov 2003;73(5):1106-19.

130. Sereda M, Griffiths I, Pühlhofer A, Stewart H, Rossner MJ, Zimmerman F, et al. A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. Neuron. mai 1996;16(5):1049-60.

131. Sevilla T, Lupo V, Martínez-Rubio D, Sancho P, Sivera R, Chumillas MJ, et al. Mutations in the MORC2 gene cause axonal Charcot-Marie-Tooth disease. Brain. janv 2016;139(Pt 1):62-72.

132. Shin JS, Chung KW, Cho SY, Yun J, Hwang SJ, Kang SH, et al. NEFL Pro22Arg mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1. J Hum Genet. 2008;53(10):936-40.

133. Shy ME, Jáni A, Krajewski K, Grandis M, Lewis RA, Li J, et al. Phenotypic clustering in MPZ mutations. Brain. févr 2004;127(Pt 2):371-84.

134. Sivera R, Sevilla T, Vílchez JJ, Martínez-Rubio D, Chumillas MJ, Vázquez JF, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. Neurology. 29 oct 2013;81(18):1617-25.

135. Snipes GJ, Suter U, Welcher AA, Shooter EM. Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). J Cell Biol. avr 1992;117(1):225-38.

136. Sperling O, Eilam G, Sara-Persky-Brosh null, De Vries A. Accelerated erythrocyte 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthesis. A familial abnormality associated with excessive uric acid production and gout. Biochem Med. août 1972;6(4):310-6.

137. Starr A, Picton TW, Sininger Y, Hood LJ, Berlin CI. Auditory neuropathy. Brain. juin 1996;119 (Pt 3):741-53.

138. Starr A, Michalewski HJ, Zeng F-G, Fujikawa-Brooks S, Linthicum F, Kim CS, et al. Pathology and physiology of auditory neuropathy with a novel mutation in the MPZ gene (Tyr145->Ser). Brain. juill 2003;126(Pt 7):1604-19.

139. Synofzik M, Müller vom Hagen J, Haack TB, Wilhelm C, Lindig T, Beck-Wödl S, et al. X-linked Charcot-Marie-Tooth disease, Arts syndrome, and prelingual non-syndromic deafness form a disease continuum: evidence from a family with a novel PRPS1 mutation. Orphanet J Rare Dis. 14 févr 2014;9:24.

140. Timmerman V, Nelis E, Van Hul W, Nieuwenhuijsen BW, Chen KL, Wang S, et al. The peripheral myelin protein gene PMP-22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. Nat Genet. juin 1992;1(3):171-5.

141. Tingaud-Sequeira A, Raldúa D, Lavie J, Mathieu G, Bordier M, Knoll-Gellida A, et al. Functional validation of ABHD12 mutations in the neurodegenerative disease PHARC. Neurobiol Dis. févr 2017;98:36-51.

142. Tokuda N, Noto Y-I, Kitani-Morii F, Hamano A, Kasai T, Shiga K, et al. Parasympathetic Dominant Autonomic Dysfunction in Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2J with the MPZ Thr124Met Mutation. Intern Med. 2015;54(15):1919-22.

143. Touraine RL, Attié-Bitach T, Manceau E, Korsch E, Sarda P, Pingault V, et al. Neurological phenotype in Waardenburg syndrome type 4 correlates with novel SOX10 truncating mutations and expression in developing brain. Am J Hum Genet. mai 2000;66(5):1496-503.

144. Tyson J, Bellman S, Newton V, Simpson P, Malcolm S, Pembrey ME, et al. Mapping of DFN2 to Xq22. Hum Mol Genet. déc 1996;5(12):2055-60.

145. Valentijn LJ, Baas F, Wolterman RA, Hoogendijk JE, van den Bosch NH, Zorn I, et al. Identical point mutations of PMP-22 in Trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Nat Genet. déc 1992;2(4):288-91.

146. van Paassen BW, van der Kooi AJ, van Spaendonck-Zwarts KY, Verhamme C, Baas F, de Visser M. PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies. Orphanet J Rare Dis. 19 mars 2014;9:38.

147. Verhagen WIM, Huygen PLM, Gabreëls-Festen A a. WM, Engelhart M, van Mierlo PJWB, van Engelen BGM. Sensorineural hearing impairment in patients with Pmp22 duplication, deletion, and frameshift mutations. Otol Neurotol. mai 2005;26(3):405-14.

148. Warner LE, Hilz MJ, Appel SH, Killian JM, Kolodry EH, Karpati G, et al. Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. Neuron. sept 1996;17(3):451-60.

149. Wrabetz L, D'Antonio M, Pennuto M, Dati G, Tinelli E, Fratta P, et al. Different intracellular pathomechanisms produce diverse Myelin Protein Zero neuropathies in transgenic mice. J Neurosci. 22 févr 2006;26(8):2358-68.

150. Yang Y, Gu L-Q, Burnette WB, Li J. N98S mutation in NEFL gene is dominantly inherited with a phenotype of polyneuropathy and cerebellar atrophy. J Neurol Sci. 15 juin 2016;365:46-7.

151. Yger M, Stojkovic T, Tardieu S, Maisonobe T, Brice A, Echaniz-Laguna A, et al. Characteristics of clinical and electrophysiological pattern of Charcot-Marie-Tooth 4C. J Peripher Nerv Syst. mars 2012;17(1):112-22.

152. Yoshihara T, Yamamoto M, Hattori N, Misu K, Mori K, Koike H, et al. Identification of novel sequence variants in the neurofilament-light gene in a Japanese population: analysis of Charcot-Marie-Tooth disease patients and normal individuals. J Peripher Nerv Syst. déc 2002;7(4):221-4.

153. Yoshimura H, Hashimoto T, Murata T, Fukushima K, Sugaya A, Nishio S-Y, et al. Novel ABHD12 mutations in PHARC patients: the differential diagnosis of deaf-blindness. Ann Otol Rhinol Laryngol. mai 2015;124 Suppl 1:77S-83S.

154. Zingler VC, Weintz E, Jahn K, Mike A, Huppert D, Rettinger N, et al. Follow-up of vestibular function in bilateral vestibulopathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry. mars 2008;79(3):284-8.

155. Zoref E, De Vries A, Sperling O. Mutant feedback-resistant phosphoribosylpyrophosphate synthetase associated with purine overproduction and gout. Phosphoribosylpyrophosphate and purine metabolism in cultured fibroblasts. J Clin Invest. nov 1975;56(5):1093-9.

156. Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth

neuropathy type 2A. Nat Genet. mai 2004;36(5):449-51.

157. Gillepsie DC. Neural Circuit development and function in the brain. Comprehensive developmental neuroscience. 2013. Pages 731-759

VII. ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Liste des gènes CMT……p206
Annexe 2 : Liste des gènes de Surdité ……p210
Annexe 3 : Panel NGS des 126 gènes CMT du CHU de Limoges…..p219
Annexe 4 : Panel NGS des 63 gènes Surdité du CHU de Montpellier……p221

Annexe1 : Liste des gènes CMT

Genes Loci

HMSN					
Form	**Inheritance**	**Locus**	**Reference**	**Gene**	**Reference**
CMT1					
CMT1A	AD	17p11.2	Vance et al., 1989	*PMP22*	Raeymaekers et al., 1991 Lupski et al., 1991
CMT1B, DSS,CH	AD	1q22-q23	Bird et al., 1982	*MPZ (P0)*	Hayasaka et al., 1993 Hayasaka et al., 1993 Hayasaka et al., 1993
CMT1C	AD	16p13.1-p12.3	Street et al., 2001	*LITAF (SIMPLE)*	Street et al., 2003
CMT1 (CMT1D), DSS, CH	AD	10q21.1-q22.1		*EGR2*	Warner et al., 1998
CMT1 (CMT1E)	AD	8p21		*NEFL*	Jordanova et al., 2003
DSS	AD	8qter	Ionasescu et al., 1996	unknown	
CMT4					
CMT4A	AR	8q13-q21	Ben Othmane et al., 1993	*GDAP1*	Baxter et al., 2002
CMT4B2	AR	11p15	Ben Othmane et al., 1999	*SBF2 (MTMR13)*	Senderek et al., 2003
CMT4B1	AR	11q23	Bolino et al., 1996	*MTMR2*	Bolino et al., 2000
CMT4C	AR	5q23-q33	LeGuern et al., 1996	*SH3TC2 (KIAA1985)*	Senderek et al., 2003
CMT4D (HMSN-L)	AR	8q24	Kalaydjieva et al., 1996	*NDRG1*	Kalaydjieva et al., 2000
CMT4E (CHN)	AR	10q21.1-q22.1		*EGR2*	Warner et al., 1998
CMT4F (DSS)	AR	19q13.1-q13.3	Delague et al., 2000	*PRX*	Boerkoel et al., 2001 Guilbot et al., 2001
CCFDN	AR	18q23-qter	Angelicheva et al., 1999	*CTDP1*	Varon et al., 2003
CMT4G (HMSN-R)	AR	10q23	Rogers et al., 2000	unknown	
CMT4H	AR	12p11.1-q13.11	De Sandre-Giovannoli et al., 2005	*FGD4*	Stendel et al., 2007

					Delague et al., 2007
CMT4J	AR	6q21		*FIG4*	Chow et al., 2007
DI-CMT					
DI-CMTA	AD	10q24.1-q25.1	Verhoeven et al., 2001	unknown	
DI-CMTC	AD	1p34-p35	Jordanova et al., 2003	*YARS*	Jordanova et al., 2006
DI-CMT	AD	1q22-q23		*MPZ*	Mastaglia et al., 1999
HMSN-P	AD	3q13.1	Takashima et al., 1997	unknown	
slow NCV	AD	8p23	Verhoeven et al., 2003	*ARHGEF10*	Verhoeven et al., 2003
CMT2					
CMT2A	AD	1p35-p36	Ben Othmane et al., 1993	*MFN2*	Züchner et al., 2004
CMT2A	AD	1p35-p36	Ben Othmane et al., 1993	*KIF1B*	Zhao et al., 2001
CMT2B	AD	3q13-q22	Kwon et al., 1995	*RAB7*	Verhoeven et al., 2003
CMT2C	AD	12q23-q24	Klein et al., 2003	*unknown*	
CMT2D	AD	7p14	Ionasescu et al., 1996	*GARS*	Antonellis et al., 2003
CMT2E	AD	8p21	Mersiyanova et al., 2000	*NEFL*	Mersiyanova et al., 2000
CMT2F	AD	7q11-21	Ismailov et al., 2001	*HSPB1 (HSP27)*	Evgrafov et al., 2004
CMT2G	AD	12q12-q13.3	Nelis et al., 2004	unknown	
CMT2	AD	1q22-q23		*MPZ*	De Jonghe et al., 1999 Marrosu et al., 1997
CMT2L	AD	12q24	Tang et al., 2004	*HSPB8*	Tang et al., 2005
AR-CMT2 or CMT4C					
AR-CMT2A (CMT4C1)	AR	1q21.2-q21.3	Bouhouche et al., 1999	*LMNA*	De Sandre-Giovannoli et al., 2002
AR-CMT2 (CMT4C2)	AR	8q21.3	Barhoumi et al., 2001	unknown	
AR-CMT2B (CMT4C3)	AR	19q13.3	Leal et al., 2001	unknown	

AR-CMT2 (CMT4C4)	AR	8q21	Cuesta et al., 2002	*GDAP1*	Cuesta et al., 2002
CMTX					
CMTX or CMT1X	XR/XD	Xq13.1	Gal et al., 1985	*GJB1 (Cx32)*	Bergoffen et al., 1993
CMT2X or Cowchock syndrome	XR	Xq24-q26	Priest et al., 1995	unknown	
CMT3X	XR	Xp22.2	Ionasescu et al., 1991	unknown	
CMT4X	XR	Xq26-q28	Ionasescu et al., 1991	unknown	
CMTX5	XR	Xq21.32-q24	Kim et al., 2005	*PRPS1*	Kim et al., 2007

distal HMN					
Form	**Inheritance**	**Locus**	**Reference**	**Gene**	**Reference**
distal HMN II	AD	12q24	Timmerman et al., 1996	*HSPB8 (HSP22)*	Irobi et al., 2004
distal HMN V	AD	7p	Christodoulou et al., 1995	*GARS*	Antonellis et al., 2003
distal HMN VI	AR	11q13-q23	Grohmann et al., 1999	*IGHMBP2*	Grohmann et al., 2001
distal HMN VIIA	AD	2q14	McEntagart et al., 2001	*unknown*	
distal HMN VIIB	AD	2p13	Puls et al., 2003	*DCTN1*	Puls et al., 2003
distal HMN / ALS4	AD	9q34	Chance et al., 1998	*ALS4 (SETX)*	Chen et al., 2004
distal HMN-Jerash-type	AR	9p21.1-p12	Christodoulou et al., 2000	unknown	
congenital distal SMA	AD	12q23-q24	van der Vleuten et al., 1998	unknown	
distal HMN / Silver syndrome (SPG17)	AD	11q13	Patel et al., 2001	*BSCL2*	Windpassinger et al., 2004
distal HMN X	AR	Xq13.1-q21	Takata et al., 2004	unknown	
Autosomal recessive lower motor neuron disease with childhood onset	AR	1p36	Maystadt et al., 2006	*PLEKHG5*	Maystadt et al., 2007

HS(A)N

Form	Inheritance	Locus	Reference	Gene	Reference
HS(A)N I	AD	9q22	Nicholson et al., 1996	*SPTLC1*	Bejaoui et al., 2001 Dawkins et al., 2001
HS(A)N II	AR	12p13.33	Lafrenière et al., 2004	*HSN2*	Lafrenière et al., 2004
HS(A)N III	AR	9q31-q33	Blumenfeld et al., 1993	*IKBKAP*	Slaugenhaupt et al., 2001
HS(A)N IV / V	AR	1q21-q22		*NTRK1 (TRKA)*	Indo et al., 1996 Houlden et al., 2001
HSAN V	AR	1p13.1	Einarsdottir et al., 2004	*NGFB*	Einarsdottir et al., 2004
HSN I + cough + gastroesophageal reflux	AD	3p22-p24	Kok et al., 2003	unknown	
DI-CMTB	AD	19p12-p13.2	Kennerson et al., 2001	*DNM2*	Züchner et al., 2005

Hereditary recurrent focal neuropathies

Form	Inheritance	Locus	Reference	Gene	Reference
HNPP	AD	17p11.2	Mariman et al., 1993	*PMP22*	Chance et al., 1993
HNA	AD	17q25	Pellegrino et al., 1996	*SEPT9*	Kuhlenbäumer et al., 2005

Other forms

Form	Inheritance	Locus	Reference	Gene	Reference
GAN	AR	16q24.1	Ben Hamida et al., 1997	*GAN*	Bomont et al., 2000
ACCPN (Andermann syndrome)	AR	15q	Casaubon et al., 1996	*SLC12A6 (KCC3)*	Howard et al., 2002
CH + Waardenburg-Hirschsprung	AD	22q13.1		*SOX10*	Pingault et al., 2000

ANNEXE 2 : Liste des gènes de Surdité

Surdité Non Syndromique Autosomique Récessive

Locus (OMIM)	Gene (OMIM)	Reference (OMIM)
DFNB1A	*GJB2*	Kelsell et al., 1997
DFNB1B	*GJB6*	Del Castillo et al., 2002
DFNB2	*MYO7A*	Liu et al., 1997 ; Weil et al., 1997
DFNB3	*MYO15A*	Wang et al., 1998
DFNB4	*SLC26A4*	Li et al., 1998
DFNB6	*TMIE*	Naz et al., 2002
DFNB7/11	*TMC1*	Kurima et al., 2002
DFNB8/ 10	*TMPRSS3*	Scott et al., 2001
DFNB9	*OTOF*	Yasunaga et al., 1999
DFNB12	*CDH23*	Bork et al., 2001
DFNB15/72/95	*GIPC3* *(see note 1)*	Ain et al., 2007 ; Rehman et al., 2011 ; Charizopoulou et al., 2011
DFNB16	*STRC* *(see note 2)*	Verpy et al., 2001
DFNB18	*USH1C*	Ouyang et al., 2002 ; Ahmed et al., 2002
DFNB18B	*OTOG*	Schraders et al., 2012
DFNB21	*TECTA*	Mustapha et al., 1999
DFNB22	*OTOA*	Zwaenepoel et al., 2002
DFNB23	*PCDH15*	Ahmed et al., 2003
DFNB24	*RDX*	Khan et al., 2007
DFNB25	*GRXCR1*	Schraders et al., 2010
DFNB28	*TRIOBP*	Shahin et al., 2006 ; Riazuddin et al., 2006
DFNB29	*CLDN14*	Wilcox et al., 2001
DFNB30	*MYO3A*	Walsh et al., 2002
DFNB31	*WHRN*	Mburu et al., 2003
DFNB32/105	*CDC14A* *(see note 3)*	Delmaghani et al., 2016 ; Imtiaz et al., 2017
DFNB35	*ESRRB*	Collin et al., 2008
DFNB36	*ESPN*	Naz et al., 2004
DFNB37	*MYO6*	Ahmed et al., 2003
DFNB39	*HGF*	Schultz et al., 2009
DFNB42	*ILDR1*	Borck et al., 2011
DFNB44	*ADCY1*	Santos-Cortez et al., 2014
DFNB48	*CIB2*	Riazuddin et al., 2012
DFNB49	*MARVELD2*	Riazuddin et al., 2006
DFNB49	*BDP1*	Girotto et al., 2013
DFNB53	*COL11A2*	Chen et al., 2005
DFNB57	*PDZD7*	Booth et al, 2015
DFNB59	*PJVK*	Delmaghani et al., 2006
DFNB60	*SLC22A4*	Ben Said et al., 2016
DFNB61	*SLC26A5*	Liu et al., 2003
DFNB63	*LRTOMT* / *COMT2*	Ahmed et al., 2008 ; Du et al., 2008
DFNB66	*DCDC2*	Grati et al., 2015
DFNB66/67	*LHFPL5*	Tlili et al., 2005 ; Shabbir et al., 2006 ; Kalay et al., 2006
DFNB68	*S1PR2*	Santos-Cortez et al., 2016
DFNB70	*PNPT1*	von Ameln et al., 2012
DFNB73	*BSND*	Riazuddin et al., 2009
DFNB74	*MSRB3*	Waryah et al., 2009 ; Ahmed et al., 2011
DFNB76	*SYNE4*	Horn et al., 2013
DFNB77	*LOXHD1*	Grillet et al., 2009
DFNB79	*TPRN*	Rehman et al., 2010 ; Li et al., 2010
DFNB82	*GPSM2* *(see note 4)*	Walsh et al., 2010
DFNB84	*PTPRQ*	Schraders et al., 2010
DFNB84	*OTOGL*	Yariz et al., 2012
DFNB86	*TBC1D24*	Rehman et al., 2014
DFNB88	*ELMOD3*	Jaworek et al., 2013
DFNB89	*KARS*	Santos-Cortez et al., 2013
DFNB91	*SERPINB6*	Sirmaci et al., 2010
DFNB93	*CABP2*	Schrauwen et al., 2012
DFNB94	*NARS2*	Simon et al., 2015
DFNB97	*MET*	Mujtaba et al., 2015
DFNB98	*TSPEAR*	Delmaghani et al., 2012

DFNB99	*TMEM132E*	Li et al., 2015
DFNB100	*PPIP5K2*	Yousaf et al., 2018
DFNB101	*GRXCR2*	Imtiaz et al., 2014
DFNB102	*EPS8*	Behlouli et al., 2014
DFNB103	*CLIC5*	Seco et al., 2014
DFNB104	*FAM65B*	Diaz-Horta et al., 2014
DFNB105	*see DFNB32*	
	EPS8L2	Dahmani et al., 2015
	WBP2	Buniello et al., 2016
	ROR1 (see note 5)	Diaz-Horta et al., 2016
	ESRP1	Rohacek et al., 2017

Surdité Non Syndromique Autosomique Dominante

Locus (OMIM)	Gene (OMIM)	Reference
	CRYM	Abe et al., 2003
DFNA1	*DIAPH1*	Lynch et al., 1997
DFNA2A	*KCNQ4*	Kubisch et al., 1999
DFNA2B	*GJB3*	Xia et al., 1998
DFNA2C	*IFNLR1*	Gao et al., 2017
DFNA3A	*GJB2*	Kelsell et al., 1997
DFNA3B	*GJB6*	Grifa et al., 1999
DFNA4	*MYH14*	Donaudy et al., 2004
	CEACAM16	Zheng et al., 2011
DFNA5	*GSDME*	Van Laer et al., 1998
DFNA6/14/38	*WFS1*	Bespalova et al., 2001 ; Young et al., 2001
DFNA8/12	*TECTA*	Verhoeven et al., 1998
DFNA9	*COCH*	Robertson et al., 1998
DFNA10	*EYA4*	Wayne et al., 2001
DFNA11	*MYO7A*	Liu et al., 1997
DFNA13	*COL11A2*	McGuirt et al., 1999
DFNA15	*POU4F3*	Vahava et al., 1998
DFNA17	*MYH9*	Lalwani et al., 2000
DFNA20/26	*ACTG1*	Zhu et al., 2003 ; van Wijk et al., 2003
DFNA22	*MYO6*	Melchionda et al., 2001
DFNA23	*SIX1*	Mosrati et al., 2011
DFNA25	*SLC17A8*	Ruel et al., 2008
DFNA28	*GRHL2*	Peters et al., 2002
DFNA34	*NLRP3*	Nakanishi et al., 2017
DFNA36	*TMC1*	Kurima et al., 2002
DFNA41	*P2RX2*	Yan et al., 2013
DFNA44	*CCDC50*	Modamio-Hoybjor et al., 2007
DFNA50	*MIRN96*	Mencia et al., 2009
DFNA51	*TJP2*	Walsh et al., 2010
DFNA56	*TNC*	Zhao et al., 2013
DFNA64	*SMAC/DIABLO*	Cheng et al., 2011
DFNA65	*TBC1D24*	Azaiez et al., 2014 ; Zhang et al., 2014
DFNA66	*CD164*	Nyegaard et al., 2015
DFNA67	*OSBPL2*	Xing et al.,2014 ; Thoenes et al., 2015
DFNA68	*HOMER2*	Azaiez et al., 2015
DFNA70	*MCM2*	Gao et al., 2015
	KITLG	Zazo Seco et al., 2015
	DMXL2	Chen et al., 2016

Surdité liée à X

Locus (OMIM)	Gene (OMIM)	Reference
DFNX1 (DFN2)	*PRPS1*	Liu et al., 2010
DFNX2 (DFN3)	*POU3F4*	De Kok et al., 1995
DFNX4 (DFN6)	*SMPX*	Schraders et al., 2011 ; Huebner et al., 2011
DFNX5	*AIFM1*	Zong et al., 2015
DFNX6	*COL4A6*	Rost et al., 2014

Neuropathie Auditive AUNA

Locus (OMIM)	Gene (OMIM)	Reference
AUNA1	*DIAPH3*	Kim et al., 2004 ; Schoen et al., 2010

Autosomal dominant

Locus (OMIM)	Location	Gene (OMIM)	Important reference
DFNA1	5q31	*DIAPH1*	Léon et al., 1992, Lynch et al., 1997
DFNA2A	1p34	*KCNQ4*	Coucke et al., 1994, Kubisch et al., 1999
DFNA2B	1p35.1	*GJB3*	Xia et al., 1999
DFNA2C	1p34.1–1p36.12	*IFNLR1*	Gao et al., 2017
DFNA3A	13q11-q12	*GJB2*	Chaib et al., 1994, Denoyelle et al., 1998, Kelsell et al., 1997
DFNA3B	13q12	*GJB6*	Grifa et al., 1999
DFNA4	19q13	*MYH14*	Chen et al., 1995, Donaudy et al., 2004
DFNA4B	19q13.32	*CEACAM16*	Zheng et al., 2011
DFNA5	7p15	*GSDME*	Van Camp et al., 1995, Van Laer et al., 1998
DFNA6	4p16.3	*WFS1*	Lesperance et al., 1995, Van Camp et al., 1999, Bespalova et al., 2001, Young et al., 2001
DFNA7	1q21-q23	*unknown*	Fagerheim et al., 1996
DFNA8	see DFNA12		
DFNA9	14q12-q13	*COCH*	Manolis et al., 1996, Robertson et al., 1998
DFNA10	6q22-q23	*EYA4*	O'Neill et al., 1996, Wayne et al., 2001
DFNA11	11q12.3-q21	*MYO7A*	Tamagawa et al., 1996, Liu et al., 1997
DFNA12	11q22-24	*TECTA*	Verhoeven et al., 1997, Verhoeven et al., 1998
DFNA13	6p21	*COL11A2*	Brown et al., 1997, McGuirt et al., 1999
DFNA14	see DFNA6		
DFNA15	5q31	*POU4F3*	Vahava et al., 1998
DFNA16	2q24	*unknown*	Fukushima et al., 1999
DFNA17	22q	*MYH9*	Lalwani et al., 1999, Lalwani et al., 2000
DFNA18	3q22	*unknown*	Bonsch et al., 2001
DFNA19	10 (pericentr.)	*unknown*	The Molecular Biology of Hearing and Deafness, Bethesda,October 8-11, 1998 (Green et al., abstract 107)
DFNA20	17q25	*ACTG1*	Morell et al., 2000, Yang et al., 2000, Zhu et al., 2003, van Wijk et al., 2003, Kemperman et al., 2004
DFNA21	6p21	*unknown*	Kunst et al., 2000
DFNA22	6q13	*MYO6*	Melchionda et al., 2001
DFNA23	14q21-q22	*SIX1*	Salam et al., 2000 , Mosrati et al., 2011
DFNA24	4q	*unknown*	Hafner et al., 2000
DFNA25	12q21-24	*SLC17A8*	Greene et al., 1999, Ruel et al., 2008
DFNA26	see DFNA20		
DFNA27	4q12	*unknown*	Fridell et al., 1999, Peters et al., 2008
DFNA28	8q22	*GRHL2*	Anderson et al., 1999, Peters et al., 2002
DFNA30	15q25-26	*unknown*	Mangino et al., 2001
DFNA31	6p21.3	*unknown*	Snoeckx et al., 2004
DFNA32	11p15	*unknown*	Li et al., 2000
DFNA33	13q34-qter	*unknown*	Bonsch et al., 2009
DFNA34	1q44	*NLRP3*	Nakanishi et al., 2017
DFNA36	9q13-q21	*TMC1*	Kurima et al., 2002
DFNA38	see DFNA6		
DFNA39 (see note 1)	4q21.3	*DSPP*	Xiao et al., 2001
DFNA41	12q24-qter	*P2RX2*	Blanton et al., 2002 , Yan et al., 2013
DFNA42	5q31.1-q32	*unknown*	Xia et al., 2002
DFNA43	2p12	*unknown*	Flex et al., 2003
DFNA44	3q28-29	*CCDC50*	Modamio-Hoybjor et al., 2003, Modamio-Hoybjor et al., 2007
DFNA47	9p21-22	*unknown*	D'Adamo et al., 2003
DFNA48	12q13-q14	*MYO1A*	D'Adamo et al., 2003, Donaudy et al., 2003
DFNA49	1q21-q23	*unknown*	Moreno-Pelayo et al., 2003
DFNA50	7q32.2	*MIRN96*	Modamio-Hoybjor et al., 2004, Mencia et al., 2009
DFNA51	9q21	*TJP2*	Walsh et al., 2010
DFNA52	4q28	*unknown*	Xia et al., 2002
DFNA53	14q11.2-q12	*unknown*	Yan et al., 2005
DFNA54	5q31	*unknown*	Gurtler et al., 2004
DFNA56	9q31.3-q34.3	*TNC*	Zhao et al., 2013

DFNA57	19p13.2	unknown	Bonsch et al., 2008
DFNA58	2p12-p21	unknown	Lezirovitz et al., 2009
DFNA59	11p14.2-q12.3	unknown	Chatterjee et al., 2009
DFNA60	2q21.3-q24.1		Liu XZ et al. ARO meeting. Denver, February 2007.
DFNA64	12q24.31-q24.32	*SMAC/DIABLO*	Cheng et al., 2011
DFNA65	16p13.3	*TBC1D24*	Azaiez et al., 2014; Zhang et al., 2014
DFNA66	6q15-21	*CD164*	Nyegaard et al., 2015
DFNA67	20q13.33	*OSBPL2*	Xing et al., 2015; Thoenes et al., 2015
DFNA68	15q25.2	*HOMER2*	Azaiez et al., 2015
DFNA70	3q21.3	*MCM2*	Gao et al., 2015
	12q21.32-q23.1	*KITLG*	Zazo Seco et al., 2015

Autosomal recessive

Locus (OMIM)	Location	Gene (OMIM)	Important reference
DFNB1	13q12	*GJB2*	Guilford et al., 1994 ; Kelsell et al., 1997
DFNB2	11q13.5	*MYO7A*	Guilford et al., 1994 ; Liu et al., 1997 ; Weil et al., 1997
DFNB3	17p11.2	*MYO15A*	Friedman et al., 1995 ; Wang et al., 1998
DFNB4	7q31	*SLC26A4*	Baldwin et al., 1995 ; Li et al., 1998
DFNB5 (see note 1)	14q12	*unknown*	Fukushima et al., 1995
DFNB6	3p14-p21	*TMIE*	Fukushima et al., 1995 ; Naz et al, 2002
DFNB7/11	9q13-q21	*TMC1*	Jain et al., 1995 ; Scott et al., 1996 ; Kurima et al., 2002
DFNB8/10	21q22	*TMPRSS3*	Veske et al., 1996 ; Bonné-Tamir et al., 1996 ; Scott et al., 2001
DFNB9 (see note 2)	2p22-p23	*OTOF*	Chaib et al., 1996 ; Yasunaga et al., 1999
DFNB10	see DFNB8		
DFNB11	see DFNB7		
DFNB12	10q21-q22	*CDH23*	Chaib et al., 1996 ; Bork et al., 2001
DFNB13	7q34-36	*unknown*	Mustapha et al., 1998
DFNB14	7q31	*unknown*	Mustapha et al., 1998
DFNB15	3q21-q25 19p13	*GIPC3*	Chen et al., 1997 Charizopoulou et al., 2011
DFNB16	15q21-q22	*STRC*	Campbell et al., 1997 ; Verpy et al., 2001
DFNB17	7q31	*unknown*	Greinwald et al., 1998
DFNB18	11p14-15.1	*USH1C*	Jain et al., 1998 ; Ouyang et al., 2002 ; Ahmed et al., 2002
DFNB18B	11p15.1	*OTOG*	Scharders et al., 2012
DFNB19	18p11	*unknown*	The Molecular Biology of Hearing and Deafness meeting Bethesda, October 8-11, 1998 (Green et al., abstract 108)
DFNB20	11q25-qter	*unknown*	Moynihan et al., 1999
DFNB21	11q	*TECTA*	Mustapha et al., 1999
DFNB22	16p12.2	*OTOA*	Zwaenepoel et al ., 2002
DFNB23	10p11.2-q21	*PCDH15*	Ahmed et al, 2003
DFNB24	11q23	*RDX*	Khan et al., 2007
DFNB25	4p13	*GRXCR1*	Schraders et al., 2010
DFNB26 (see note 3)	4q31	*unknown*	Riazuddin et al., 2000
DFNB27	2q23-q31	*unknown*	Pulleyn et al., 2000
DFNB28	22q13	*TRIOBP*	Walsh et al., 2000 ; Shahin et al, 2006 ; Riazuddin et al, 2006
DFNB29	21q22	*CLDN14*	Wilcox et al., 2001
DFNB30	10p11.1	*MYO3A*	Walsh et al., 2002
DFNB31	9q32-q34	*WHRN*	Mustapha et al., 2002 ; Mburu et al., 2003
DFNB32/105	1p13.3-22.1	*CDC14A*	Masmoudi et al., 2003; Imtiaz et al., 2017
DFNB33	9q34.3	*unknown*	Medlej-Hashim et al., 2002
DFNB35	14q24.1-24.3	*ESRRB*	Ansar et al., 2003 ; Collin et al., 2008
DFNB36	1p36.3	*ESPN*	Naz et al., 2004
DFNB37	6q13	*MYO6*	Ahmed et al., 2003
DFNB38	6q26-q27	*unknown*	Ansar et al., 2003
DFNB39	7q21.1	*HGF*	Schultz et al., 2009
DFNB40	22q	*unknown*	Delmaghani et al., 2003
DFNB42	3q13.31-q22.3	*ILDR1*	Aslam et al., 2005 ; Borck et al., 2011

DFNB44	7p14.1-q11.22	*ADCY1*	Ansar et al., 2004 ; Santos-Cortez et al., 2014
DFNB45	1q43-q44	*unknown*	Bhatti et al., 2008
DFNB46	18p11.32-p11.31	*unknown*	Mir et al., 2005
DFNB47	2p25.1-p24.3	*unknown*	Hassan et al., 2005
DFNB48	15q23-q25.1	*CIB2*	Ahmad et al., 2005
DFNB49	5q12.3-q14.1.	*MARVELD2 / BDP1*	Ramzan et al., 2004 ; Riazuddin et al., 2006 ; Girotto et al., 2013
DFNB51	11p13-p12	*unknown*	Shaikh et al., 2005
DFNB53	6p21.3	*COL11A2*	Chen et al., 2005
DFNB55	4q12-q13.2	*unknown*	Irshad et al., 2005
DFNB59	2q31.1-q31.3	*PJVK*	Delmaghani et al., 2006
DFNB60	5q23.2-q31.1	*SLC22A4*	Ben Said et al., 2016
DFNB61	7q22.1	*SLC26A5*	Liu et al., 2003
DFNB62	12p13.2-p11.23	*unknown*	Ali et al., 2006
DFNB63	11q13.2-q13.4	*LRTOMT/COMT2*	Du et al., 2008 ; Ahmed et al., 2008
DFNB65	20q13.2-q13.32	*unknown*	Tariq et al., 2006
DFNB66	6p21.2-22.3	*DCDC2*	Grati et al., 2015
DFNB66/67	6p21.31	*LHFPL5*	Tlili et al., 2005 ; Shabbir et al., 2006 ; Kalay et al., 2006
DFNB68	19p13.2	*S1PR2*	Santos et al., 2006 ; Santos-Cortez et al., 2016
DFNB71	8p22-21.3	*unknown*	Chishti et al., 2009
DFNB72	19p13.3	*GIPC3*	Ain et al., 2007 ; Rehman et al., 2011
DFNB73	1p32.3	*BSND*	Riazuddin et al., 2009
DFNB74	12q14.2-q15	*MSRB3*	Waryah et al., 2009 ; Ahmed et al., 2011
DFNB76	19q13.12	*SYNE4*	Horn et al., 2013
DFNB77	18q12-q21	*LOXHD1*	Grillet et al., 2009
DFNB79	9q34.3	*TPRN*	Rehman et al., 2010
DFNB80	2p16.1-p21	*unknown*	Mosrati et al., 2013
DFNB81	19p	*unknown*	Rehman et al., 2011
DFNB82	1p13.1	*(see note 4)*	Shahin et al., 2010
DFNB83	see DFNA47		
DFNB84	12q21.2	*PTPRQ / OTOGL*	Schraders et al., 2010 ; Yariz et al., 2012
DFNB85	17p12-q11.2	*unknown*	Shahin et al., 2010
DFNB86	16p13.3	*TBC1D24*	Ali et al., 2012, Rehman et al., 2014
DFNB88	2p12-p11.2	*ELMOD3*	Jaworek et al., 2013
DFNB89	16q21-q23.2	*KARS*	Basit et al., 2011
DFNB90	7p22.1-p15.3	*unknown*	Ghazanfar et al., 2011
DFNB91	6p25	*SERPINB6*	Sirmaci et al., 2010
DFNB93	11q12.3-11q13.2	*CABP2*	Tabatabaiefar et al., 2011
DFNB94		*NARS2*	Simon et al., 2015
DFNB95	19p13	*GIPC3*	Charizopoulou et al., 2011
DFNB96	1p36.31-p36.13	*unknown*	Ansar et al., 2011
DFNB97	7q31.2-q31.31	*MET*	Mujtaba et al., 2015
DFNB98	21q22.3-qter	*TSPEAR*	Delmaghani et al., 2012
DFNB99	17q12	*TMEM132E*	Li et al., 2015
DFNB100	5q13.2-q23.2	*PPIP5K2*	Yousaf et al., 2018
DFNB101	5q32	*GRXCR2*	Imtiaz et al., 2014
DFNB102	12p12.3	*EPS8*	Behlouli et al., 2014
DFNB103	6p21.1	*CLIC5*	Seco et al., 2015
DFNB104	6p22.3	*FAM65B*	Diaz-Horta et al., 2014
DFNB105	see DFNB32		Delmaghani et al., 2016

X-linked

Locus (OMIM)	Location	Gene (OMIM)	Important reference	
DFNX1 (DFN2)	Xq22	*PRPS1*	Liu et al., 2010	
DFNX2 (DFN3)	Xq21.1	*POU3F4*	De Kok et al., 1995	
DFNX3 (DFN4)	Xp21.2	*unknown*	Lalwani et al., 1994	
DFNX4 (DFN6)	Xp22	*SMPX*	del Castillo et al., 1996	
DFNX5 (AUNX)	Xq26.1	*AIFM1*	Wang et al., 2006 ; Zong et al., 2015	
DFNX6	Xp22.3	*COL4A6*	Rost et al., 2014	

Modifier

Locus (OMIM)	Location	Gene (OMIM)	Important reference

DFNM1	1q24	unknown	Riazuddin et al., 2000
DFNM2	8p23	unknown	Bykhovskaya et al., 2000

Y-linked

Locus (OMIM)	Location	Gene (OMIM)	Important reference
DFNY1	Y	unknown	Wang et al., 2004

Auditory neuropathy (AD)

Locus (OMIM)	Location	Gene (OMIM)	Important reference
AUNA1	13q14-21	*DIAPH3*	Kim et al., 2004 ; Schoen et al., 2010

Mitochondrial mutations associated with syndromic hearing impairment

Gene	Mutation	Phenotype	References	Omim entree
MTTL1	3243A->G	*MELAS and MIDD*	Goto et al., 1990 van den Ouweland et al., 1992	540000 (MELAS) 590050 (MTTL1)
MTTK	8344A->G 8356T->C 8296A->G	*MERRF* *MERRF* *MIDD*	Shoffner et al., 1990 Zeviani et al., 1993 Kameoka et al., 1998	545000 (MERFF) 590060 (MTTK) 590060 (MTTK)
MTTS1	7512T->C	progressive myoclonic epilepsy, ataxia and hearing impairment	Jaksch et al., 1998b	590080 (MTTS1)
Several	Large deletions	*KSS*	Moraes et al., 1989	530000 (KSS)
Several	Large deletion/duplication	*MIDD*	Ballinger et al., 1992	520000 (MIDD)
MTTE	14709T->C	*MIDD*	Hao et al., 1995	590025 (MTTE)

Mitochondrial mutations associated with nonsyndromic hearing impairment

Gene	Mutation	Possible additional symptoms	References
MTRNR1	1555A->G	Aminoglycoside induced/worsened	Prezant et al., 1993 ; Usami et al., 1997 ; Estivill et al., 1998
MTRNR1	1494C->T	Aminoglycoside induced/worsened	Zhao et al., 2004
MTRNR1	961 (different mutations)	Aminoglycoside induced/worsened	Bacino et al., 1995 ; Casano et al., 1999
MTTS1	7445A->G	Palmoplantar keratoderma	Reid et al., 1994 ; Fischel-Ghodsian et al., 1995 ; Sevior et al., 1998
MTTS1	7472insC	Neurological dysfunction, including ataxia, dysarthria and myoclonus	Tiranti et al., 1995 ; Jaksch et al., 1998a ; Jaksch et al., 1998b ; Schuelke et al.,1998 ; Verhoeven et al., 1999
MTTS1	7510T->C	no additional symptoms reported	Hutchin et al., 2000
MTTS1	7511T->C	no additional symptoms reported	Friedman et al., 1999 ; Sue et al., 1999

Alport Syndrome

Location	Gene	References	OMIM entry
Xq22	*COL4A5*	Barker et al., 1990	301050
2q36-q37	*COL4A3* *COL4A4*	Mochizuki et al., 1994	203780

Branchio-oto-renal Syndrome

Locus	Location	Gene	References	OMIM entry
BOR1	8q13.3	*EYA1*	Abdelhak et al., 1997	113650
BOR2	19q13.3	*SIX5*	Hoskins et al., 2007	610896
	1q31	*unknown*	Kumar et al., 2000	
BOS3	14q21.3-q24.3	*SIX1*	Ruf et al., 2003 Ruf et al., 2004	608389

CHARGE Syndrome

Locus	Location	Gene	References	OMIM entry

	7q21.11	*SEMA3E*	Lalani et al., 2004	214800
	19q13.3	*CHD7*	Vissers et al., 2004	214800

Jervell & Lange-Nielsen Syndrome

Locus	Location	Gene	References	OMIM entry
JLNS1	11p15.5	*KCNQ1*	Neyroud et al., 1997	192500
JLNS2	21q22.1-q22.2	*KCNE1*	Tyson et al., 1997 ; Schulze-Bahr et al., 1997	176261

Norrie Disease

Locus	Location	Gene	References	OMIM entry
NDP	Xp11.3	*NDP*	Berger et al., 1992 ; Chen et al., 1992	310600

Pendred Syndrome

Locus	Location	Gene	References
PDS	7q21-34	*SLC26A4*	Everett et al., 1997
PDS	5q35.1	*FOXI1*	Yang et al., 2007
PDS	1q23.2	*KCNJ10*	Yang et al., 2009

Stickler Syndrome

Locus	Location	Gene	References	OMIM entry
STL1	12q13.11-q13.2	*COL2A1*	Ahmad et al., 1991	108300
STL2	1p21	*COL11A1*	Richards et al., 1996	604841
STL3	6p21.3	*COL11A2*	Vikkula et al., 1995	184840
	6q13	*COL9A1*	Van Camp et al., 2006	
	1p34.2	*COL9A2*	Baker et al., 2011	
		COL9A3	Faletra et al., 2014	

Treacher Collins Syndrome

Locus	Location	Gene	References	OMIM entry
TCOF1	5q32-q33.1	*TCOF1*	Dixon et al., 1996	154500
POLR1D	13q12.2	*POLR1D*	Dauwerse et al., 2010	613717
POLR1C	6p21.1	*POLR1C*	Dauwerse et al., 2010	248390

Usher Syndrome

Usher syndrome is characterised by hearing impairment and retinitis pigmentosa. Usher syndrome can be classified into 3 different types on the basis of clinical findings.

Clinical classification

Type	Hearing impairment	Vestibular responses	Onset of retinitis pigmentosa
Type I	Profound hearing loss Congenital	Absent	Onset in first decade
Type II	Sloping audiogram Congenital	Normal	Onset in first or second decade
Type III	Progressive hearing loss	Variable	Variable

Molecular classification

Locus	Location	Gene	References	OMIM entry
USH1A	(14q32)	non existent	Kaplan et al., 1992 ; Gerber et al., 2006	276900
USH1B	11q13.5	*MYO7A*	Weil et al.,1995	276903
USH1C	11p15.1	*USH1C*	Smith et al., 1992 ; Verpy et al., 2000 ; Bitner-Glindzicz et al., 2000	276904
USH1D	10q22.1	*CDH23*	Wayne et al., 1996 ; Bork et al., 2001 ; Bolz et al., 2001	601067

USH1E	21q21	unknown	Chaib et al., 1997	602097
USH1F	10q21-22	*PCDH15*	Ahmed et al., 2001 ; Alagramam et al., 2001	602083
USH1G	17q24-25	*SANS*	Mustapha et al., 2002 ; Weil et al., 2003	606943
USH1H	15q22-23	*unknown*	Ahmed et al., 2009	612632
USH1J (see note A)	15q23-q25.1	*CIB2 (refuted, see note A)*	Riazuddin et al., 2012; Booth et al., 2017	614869
USH1K	10p11.21-q21.1	*unknown*	Jaworek et al., 2012	614990
USH2A	1q41	*USH2A*	Kimberling et al., 1990 ; Eudy et al., 1998	276901
USH2B	3p23-24.2.	*unknown*	Hmani et al., 1999	
USH2C	5q14.3-q21.3	*VLGR1*	Pieke-Dahl et al., 2000 ; Weston et al., 2004	605472
USH2D	9q32	*WHRN*	Ebermann et al., 2007	611383
USH3	3q21-q25	*CLRN1*	Sankila et al., 1995 ; Joensuu et al., 2001	276902 606397
USH3B	5q31.3	*HARS*	Puffenberger et al., 2012	614504
Modifier Gene (see note B)	10q24.31	*PDZD7*	Ebermann et al., 2010	

Waardenburg Syndrome

The clinical symptoms of Waardenburg Syndrome (WS) include:

- Dystopia canthorum (lateral displacement of the inner canthus of each eye)
- Pigmentary abnormalities of hair, iris, and skin (often white forelock and heterochromia iridis)
- Sensorineural deafness

Some symptoms may be absent.
WS is subdivided in two types (I and II) on the basis of dystopia canthorum.
The combination of WS type I characteristics with upper limb abnormalities has been called Klein-Waardenburg syndrome or WS type III.
The combination of recessively inherited WS type II characteristics with Hirschsprung disease has been called Waardenburg-Shah syndrome or WS type IV.

Clinical classification

Type I	Dystopia canthorum
Type II	No dystopia canthorum
Klein-Waardenburg syndrome (type III)	Type I and upper limb abnormalities
Waardenburg-Shah syndrome (type IV)	Type II and Hirschsprung disease (autosomal dominant and recessive inheritance)

Molecular classification

Type	Locus	Location	Gene	References	OMIM entry
type I	WS1	2q35	*PAX3*	Tassabehji et al., 1992	193500
type IIA	WS2A	3p14.1-p12.3	*MITF*	Tassabehji et al., 1994	193510
type IIB	WS2B	1p21-p13.3	*unknown*	Am J Hum Genet 55 (suppl): A14, 1994	600193
type IIC	WS2C	8p23	*unknown*	Selicorni et al., 2002	606662
type IID	WS2D	8q11	*SNAI2*	Sanchez-Martin et al., 2002	608890
type III	WS3	2q35	*PAX3*	Hoth et al., 1993	148820
type IV	WS4	13q22	*EDNRB*	Attie et al., 1995	131244
type IV	WS4	20q13.2-q13.3	*EDN3*	Edery et al., 1996	131242
type IV	WS4	22q13	*SOX10*	Pingault et al., 1998	602229

Perrault syndrome

Locus	Location	Gene	References	OMIM entry
	5q23.1	*HSD17B4*	Pierce et al., 2011	233400
	5q31.3	*HARS2*	Pierce et al., 2011	614926
DFNB81	19p13.3	*CLPP**	Jenkinson et al., 2013	614926
	3p21.31	*LARS2*	Pierce et al., 2013	614926
		ERAL1	Chatzispyrou et al., 2017	617565

Clinical otosclerosis

Locus (OMIM)	Location	Gene (OMIM)	Important reference
OTSC1	15q26.1-qter	unknown	Tomek et al., 1998
OTSC2	7q34-q36	unknown	Van den Bogaert et al., 2001
OTSC3	6p21.3-22.3	unknown	Chen et al., 2002
OTSC4	16q21-23.2	unknown	Brownstein et al., 2006
OTSC5	3q22-q24	unknown	Van den Bogaert et al., 2004
OTSC6	reserved		
OTSC7	6q13-16.1	unknown	Thys et al., 2007
OTSC8	9p13.1-9q21.11	unknown	Bel Hadj Ali et al., 2008
OTSC9	reserved		
OTSC10	1q41-44	unknown	Schrauwen et al., 2011

Meniere disease

Locus	Location	Gene	References	OMIM entry
	12p12.3	unknown	Klar et al., 2006	156000

Hereditary Hearing Loss Home page

Annexe 3 : Panel NGS des 126 gènes CMT du CHU de Limoges

GENE	CMT1D	CMT2D	CMT1R	CMT2R	HMND	HMNR	HSND	HSNR	Autres
AARS		X							
ABHD12									R
AIFM1				X					
ARHGEF10									D
ATL1							X		
ATL3							X		
ATP7A						X			
BICD2					X				
BSCL2					X				
CCT5								X	
CTDP1								X	
C12ORF65									R
DCAF8									D
DCTN1					X				
DHTKD1		X							
DNAJB2				X					
DNM2	X	X							
DNMT1							X		
DST								X	
DYNC1H1		X							
EGR2	X		X						
FAM134B								X	
FBLN5									D/R
FBXO38					X				
FGD4			X						
FIG4			X		X				
GAN									R
GARS		X			X				
GDAP1		X	X	X					
GJB1	X	X							
GJB3									D/R
GNB4	X	X							
HARS		X							
HINT1									R
HK1			X						
HSPB1		X			X				
HSPB3					X				
HSPB8		X			X				
IFRD1									X
IGHMBP2				X		X			
IKBKAP								X	
INF2	X	X							
KARS			X	X					
KIF1A								X	
KIF1B		X							
KIF5A									D
LITAF	X								
LMNA				X					
LRSAM1		X							
MARS		X							
MED25				X					
MFN2		X							
MPV17									R
MPZ	X	X	X						
MTMR2			X						
NDRG1			X						
NEFL	X	X							
NGF								X	
NTRK1								X	
PDK3		X							
PLEKHG5			X	X		X			
PMP22	X								
POLG									D/R
PRPS1				X					
PRX			X						
RAB7A		X							
REEP1					X				
SBF1			X						
SBF2			X						
SCN9A								X	
SCN10A							X		
SCN11A							X		
SEPT9									*D*

SETX					X				
SH3TC2			X						
SLC12A6									R
SLC5A7					X				
SMAD3									D
SOX10									D
SPTLC1							X		
SPTLC2							X		
SURF1			X						
TFG									D
TRIM2				X					
TRPV4		X			X				
TTR									D
TUBB3									D
UBQLN2					X				
VAPB									D
VCP									D
WNK1								X	
YARS	X	X							

Annexe 4 : Panel NGS des 63 gènes Surdité du CHU de Montpellier

ROUX AF, LGM, CHU Montpellier

Annexe : Liste des gènes inclus dans le design « DFN 63 gènes » : 390 kb 1029 exons

Gène	nbre_exons	Accession Number	acc_Ref seq
ACTG1	6	NM_001614.3	NG_011433.1
ADCY1	20	NM_021116.2	NG_034198.1
CABP2	7	NM_016366.2	NG_032982.1
CCDC50	12	NM_178335.2	NG_008994.1
CEACAM16	7	NM_001039213.3	NG_032692.2
CLIC5	6	NM_001114086.1	NG_031965.1
CLDN14	3	NM_001146077.1	NG_011777.1
COCH	12	NM_004086.2	NG_008211.2
CRYM	10	NM_001888.3	NG_011610.1
DFNA5	10	NM_004403.2	NG_011593.1
DIABLO	7	NM_019887.5	NG_029459.1
DIAPH1	28	NM_005219.4	NG_011594.1
DIAPH3	28	NM_001042517.1	NG_032693.1
DFNB59	7	NM_001042702.3	NG_012186.1
EPS8	21	NM_004447.5	NG_041808.1
ESRRB	11	NM_004452.3	NG_012278.1
EYA4	20	NM_004100.4	NG_011596.1
FOXI1	2	NM_012188.4	NG_012068.1
GIPC3	6	NM_133261.2	NG_031943.1
GJB3	2	NM_024009.2	NG_008309.1
GJB2	2	NM_004004.5	NG_008358.1
GJB6	3	NM_006783.4	NG_008323.1
GPSM2	15	NM_013296.4	NG_028108.1
GRHL2	16	NM_024915.3	NG_011971.1
GRXCR1	4	NM_001080476.2	NG_027718.1
GRXCR2	3	NM_001080516.1	NG_034161.1
HGF	18	NM_000601.4	NG_016274.1
ILDR1	8	NM_001199799.1	NG_031870.1
KCNJ10	2	NM_002241.4	NG_016411.1
KCNQ4	14	NM_004700.3	NG_008139.1
LHFPL5	4	NM_182548.3	NG_012184.1
LOXHD1	40	NM_144612.6	NG_016646.1
LRTOMT	7	NM_001145308.4	NG_021423.1
MARVELD2	7	NM_001038603.2	NG_017201.1
MSRB3	6	NM_198080.3	NG_023441.1
MIR96	1	NR_029512.1	NG_023385.1
MYH9	41	NM_002473.4	NG_011884.1
MYH14	43	NM_001145809.1	NG_011645.1
MYO15A	66	NM_016239.3	NG_011634.1
MYO3A	35	NM_017433.4	NG_011635.1
MYO6	35	NM_004999.3	NG_009934.1
OTOA	28	NM_144672.3	NG_012973.1
OTOG	55	NM_001277269.1	NG_033191.1

OTOGL	58	NM_173591.3	NG_033008.1
OTOF	47	NM_194248.2	NG_009937.1
POU3F4	1	NM_000307.4	NG_009936.2
POU4F3	2	NM_002700.2	NG_011885.1
PRPS1	7	NM_002764.3	NG_008407.1
PTPRQ	50	NM_001145026.1	NG_034052.1
RDX	14	NM_002906.3	NG_023044.1
SERPINB6	7	NM_001195291.2	NG_027692.1
SLC17A8	12	NM_139319.2	NG_021175.1
SLC26A4	21	NM_000441.1	NG_008489.1
SLC26A5	20	NM_198999.2	NG_023055.1
SMPX	5	NM_014332.2	NG_031916.1
TBC1D24	8	NM_001199107.1	NG_028170.1
TJP2	23	NM_004817.3	NG_016342.1
TECTA	23	NM_005422.2	NG_011633.1
TMC1	24	NM_138691.2	NG_008213.1
TMIE	4	NM_147196.2	NG_011628.1
TMPRSS3	13	NM_024022.2	NG_011629.1
TPRN	4	NM_001128228.2	NG_027801.1
WFS1	8	NM_006005.3	NG_011700.1

Exons non couverts par l'approche :

E1-CLDN14	E2-TMC1	E20-E28-OTOA	E1-RDX	
E1-TBC1D24	E1-SCL26A5	E1-TPRN	E1-KCNQ4	
E1-ACTG1	E18-DIAPH1	E1-CRYM	E1-DFNA5	E1-MYH14

17/12/2015 mis à jour le 14/02/2017

Neuropathies Périphériques Génétiques et Surdité : Etude des Relations Génétiques et Mécanistiques

Les neuropathies périphériques héréditaires (NP) sont caractérisées par des phénotypes très divers et une hétérogénéité génétique importante. La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) représente la majeure partie des neuropathies périphériques sensitivo-motrices. D'autres symptômes peuvent être associés, telle que la surdité. A l'heure actuelle, aucune estimation précise de la surdité n'existe dans cette population et la pathogénicité est incertaine. L'objectif de cette thèse était de mieux comprendre la physiopathologie de la surdité chez les patients atteints de neuropathies périphériques. Pour cela plusieurs approches complémentaires ont été mises en œuvre : 1) Approche clinique sur une cohorte française de patients atteints à la fois de neuropathie périphérique et de surdité et tests de génétique moléculaire avec séquençage NGS (Panels NP, surdités et/ou exomes) ; 2) Approche biochimique sur des prélèvements de nerfs cochléaires murins et humains ; 3) Approche bioinformatique afin d'identifier des réseaux de protéines impliquées dans l'apparition de surdité liée à une neuropathie périphérique.
Grâce à ce travail, nous avons pu caractériser les phénotypes variés des patients atteints de NP génétique et surdité, et ainsi constater que la surdité peut être endo, rétro ou endo et rétrocochléaire. Trente-six gènes ont été rapportés comme associées à NP et surdité. Le génotype de nos patients NP+Surdité a pu être établi dans 60% des cas, avec la découverte de sept nouveaux variants pathogènes dans cinq gènes différents. Nos travaux suggèrent également que *PMP22*, le gène le plus retrouvé dans les CMT, n'est probablement pas ou peu impliqué dans l'apparition de la surdité des patients NP. Chez deux de nos patients présentant un variant pathogène de *PMP22*, un deuxième gène impliqué a été trouvé avec respectivement *COCH* et *MYH14*. Des corrélations génotypes-phénotypes ont pu être mises en évidence avec les gènes *ABHD12, SH3TC2, NEFL* et *PRPS1*. Deuxièmement, l'étude préliminaire immunohistochimique sur des nerfs auditifs de rats sauvages a permis de mettre en évidence l'expression de pmp22, mpz, nefl et trpv4 au niveau du nerf cochléaire et de pister une différence d'expression chez les rats $CMT^{pmp22/+}$. L'étude chez l'humain n'a pas été concluante. Dernièrement, la recherche *in silico* de voies communes aux différents gènes décrits comme impliqués dans NP+surdité a permis de confirmer le lien direct entre PMP22 et MPZ. Des liens indirects entre plusieurs autres protéines ont été pistés.
Cette thèse montre également que la surdité est très certainement sous-diagnostiquée dans cette population de NP génétique. Nous proposons donc un suivi audiométrique systématique des patients atteints de NP héréditaire, et une évaluation neurologique pour les enfants diagnostiqués pour surdité.

Mots-clés : *Neuropathie périphérique héréditaire ; Charcot-Marie-Tooth ; Surdité ; NGS ; Immunohistochimie ; Réseau Protéique*

Genetic Peripheral Neuropathies and Deafness: Study of Genetic and Mechanistic Connections

Hereditary Peripheral Neuropathies (PN) are characterized by various phenotypes and great genetic heterogeneity. Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) accounts for most sensori-motor peripheral neuropathies. Besides, other symptoms can be associated, such as deafness. No precise estimation of deafness within this population exist and its pathogenicity is uncertain. The aim of this PhD was to better understand the physiopathology of deafness in patients suffering from PN. Various complementary approaches were used; 1) a clinical approach on a French cohort of patients suffering from both PN and hearing loss and molecular genetic tests with NGS sequencing (PN, deafness panels, and/or exomes), 2) a biochemical approach on murine and human cochlear nerve samples and 3) a bioinformatic approach to identify protein hubs implicated in the onset of PN-associated deafness.
This has enabled us to characterize the various phenotypes of patients suffering from both hereditary PN and deafness, and then notice that deafness can be endo-, retro- or endo- and retrocochlear. Thirty-six genes were reported to be associated with both PN and hearing impairment. Sixty percent of our patients were genotyped, highlighting seven novel pathogenic variants in five different genes. Our research also suggests that *PMP22*, the most frequent gene in CMT, is probably not or poorly implicated in deafness onset in PN patients. In two of our patients with *PMP22* pathogenic variants, a second involved gene was found with *COCH* and *MYH14* respectively. Genotype-phenotype correlations were found out with the *ABHD12, SH3TC2, NEFL* and *PRPS1* genes. Secondly, the preliminary immunohistochemical study on wild-type rats auditory nerves highlighted the expression of pmp22, mpz, nefl and trpv4 on the cochlear nerve and tracked a different expression in $CMT^{pmp22/+}$ rats. However, the study on humans was not conclusive. Recently, *in silico* research of pathways common to the different genes described to be involved in both PN and deafness, has found the direct link between PMP22 and MPZ. Indirect links between several other proteins have been tracked.
This thesis also shows that hearing impairment is most probably under-diagnosed in this population of genetic PN sufferers. We suggest regular audiologic follow-up for PN patients and neurological assessment for deaf children.

Keywords: *Hereditary Peripheral Neuropathy; Charcot-Marie-Tooth; Deafness; NGS; Immunohistochemistry ; Protein Hub*