



**HAL**  
open science

# Identification des causes génétiques manquantes de syndromes dystoniques par séquençage de l'exome

Thomas Wirth

► **To cite this version:**

Thomas Wirth. Identification des causes génétiques manquantes de syndromes dystoniques par séquençage de l'exome. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAJ114 . tel-04079757

**HAL Id: tel-04079757**

**<https://theses.hal.science/tel-04079757>**

Submitted on 24 Apr 2023

**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.

# UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

## ÉCOLE DOCTORALE DE STRASBOURG

IGBMC - CNRS UMR 7104 - INSERM U 964

### THÈSE présentée par :

Thomas WIRTH

Soutenue le 7 décembre 2022

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences médicales - Médecine

**Identification des causes génétiques  
manquantes de syndromes dystoniques par  
séquençage de l'exome**

**THÈSE dirigée par :**

**Monsieur Mathieu Anheim**

Professeur des Universités, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

**Madame Christel Thauvin-Robinet**

Professeur des Universités, université de Bourgogne

**Monsieur Christophe Verny**

Professeur des Universités, université d'Angers

AUTRE MEMBRE :

**Madame Caroline Schluth-Bolard**

Professeur des Universités, université de Strasbourg

*A Camille...*

## **Remerciements**

**A mon directeur de thèse,**

**A Monsieur le professeur Mathieu Anheim,**

Merci de m'avoir proposé ce travail, de m'avoir fait confiance pour ces travaux de recherche ainsi que pour m'avoir dirigé au cours de cette thèse. Je suis heureux de pouvoir continuer à travailler à vos côtés. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

**Aux membres du jury,**

**A Madame le professeur Caroline Schluth-Bolard,**

**A Madame le professeur Christel Thauvin-Robinet,**

**A Monsieur le professeur Christophe Verny,**

Vous me faites l'honneur de faire partie de ce jury de thèse. Merci d'avoir accepté d'être juge de ce travail. Recevez ici tout le témoignage de mon respect.

**Merci à l'ensemble des acteurs de ce travail,  
et plus particulièrement,**

Merci à **Nathalie Drouot, Emmanuelle Olivier, Patrick Nitschke**, ainsi qu'aux docteurs **Gabrielle Rudolf, Diane Doummar, Aurélie Méneret, Laura Cif, Louise Laure Mariani, Amélie Piton** et aux professeurs **Jamel Chelly et Emmanuel Roze** sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour.

**Aux autres membres de l'équipe "Génétique et Physiopathologie de maladies**

**Neurodéveloppementales"**, en particulier Jérémie, Pauline, Oktay, Hervé, merci pour votre accueil au laboratoire et pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci également aux collaborateurs internationaux, **Manju Kurian, Jean-Pierre Lin, Giacomo Garone, Christine Kim et Wendy Chung** sans qui rien de tout cela n'aurait été possible.

Merci à **madame le professeur Christine Tranchant** pour votre support tout au long de ma formation aux hôpitaux universitaires de Strasbourg ainsi que pour votre aide et vos conseils avisés. J'estime être chanceux d'avoir pu bénéficier de votre enseignement.

**Merci aux amis de l'Unité de neurochirurgie fonctionnelle du National Hospital for Neurology and Neurosurgery** à Londres : Nirosen Vijiaratnam, Alexis de Roquemaurel, Christine Girges, Eoin Mulroy, et aux professeurs Patricia Limousin, Tom Foltynie, Harith Akram et Ludvic Zrinzo. Merci de m'avoir respectivement accompagné et encadré durant une année rendue difficile par la pandémie.

#### **A ma famille et mes amis**

**A mes amis** : Romain, Mathieu et Camille, **à mes parents**, Sylvie et Patrick, **à mes grands-parents**, Armand, et Madeleine, **à mon frère**, Vincent, merci pour votre présence tout au long de ces années.

**A Camille**, merci pour ta patience dans la préparation de ce travail, pour ton soutien de chaque instant, pour chaque moment passé avec toi, et enfin pour tous ceux à venir.

# Table des matières

<i>Abréviations</i> .....	6
<i>Liste des figures</i> .....	8
<i>Liste des tableaux</i> .....	9
<b>1. Introduction</b> .....	<b>10</b>
1.1 Généralités concernant la dystonie .....	11
1.2 Physiopathologie et causes des syndromes dystoniques .....	16
1.3 Les dystonies d'origine génétique .....	21
1.4 Le séquençage à haut débit de l'ADN .....	23
1.5 Le traitement bio-informatique des données de séquençage haut débit .....	26
1.6 La détermination de la pathogénicité des variants .....	28
1.7 Les causes génétiques manquantes de syndromes dystoniques .....	30
1.8 Objectifs .....	32
<b>2. Résultats</b> .....	<b>33</b>
2.1 Rendement diagnostique du séquençage de l'exome dans les syndromes dystoniques .....	34
2.1.1 Le résultat du séquençage d'un panel de gènes de mouvements anormaux dans la dystonie .....	34
2.1.2 Article 1 .....	35
2.2 Expansion du spectre phénotypiques des dystonies associées à <i>GNAO1</i> .....	56
2.2.1 Encéphalopathie liée aux variants pathogènes dans <i>GNAO1</i> .....	56
2.2.2 Article 2 .....	59
2.3 Dystonie combinée : les syndromes dystonie-parkinsonisme liés aux mutations dans <i>NR4A2</i> et <i>PPP2R5D</i> .....	86
2.3.1 Génétique des syndromes dystonie-parkinsonisme .....	86
2.3.2 Article 3 .....	89
2.3.3 Article 4 .....	114
2.4 Dystonie paroxystique : variants pathogènes dans <i>TMEM151A</i> et dyskinesies paroxystiques kinésigéniques .....	129
2.4.1 Phénoménologie et génétique des dystonies paroxystiques .....	129
2.4.2 Article 5 .....	131
2.5 Syndrome dystonie et troubles oculomoteurs .....	137
2.5.1 Présentation du phénotype .....	137
2.5.2 Gènes candidats identifiés .....	138
<b>3. Discussion, perspectives et conclusion</b> .....	<b>140</b>
3.1 Une architecture génétique commune entre dystonie et pathologies neurodéveloppementales .....	141
3.2 Le large spectre phénotypique associé aux variants pathogènes dans <i>GNAO1</i> .....	143
3.3 Les variants pathogènes dans <i>NR4A2</i> et <i>PPP2R5D</i> , deux causes génétiques de syndrome dystonie-parkinsonisme .....	145
3.4 Les variants pathogènes dans <i>TMEM151A</i> sont associés aux dyskinesies paroxystiques kinésigéniques .....	147

<b>3.5 Perspectives pour le groupe de patients présentant une dystonie généralisée associée à des troubles oculomoteurs.....</b>	<b>148</b>
<b>3.6 Conclusion .....</b>	<b>151</b>
<b>Références.....</b>	<b>152</b>
<b><i>Annexe 1.....</i></b>	<b><i>166</i></b>
<b><i>Annexe 2.....</i></b>	<b><i>171</i></b>

# Abréviations

1000G : 1000 génomes

Ach-IN: Interneurone cholinergique

ACMG : American College of Medical Genetics and Genomics

AD : Autosomique dominant

ADN : Acide désoxyribonucléique

AR : Autosomique récessif

Cadd : Combined Annotation Depletion Dependent

CM : Noyau centromédian du thalamus

Exac : Exome aggregation consortium

GABA-IN : Interneurone Gabaergique

Gnomad : Genome aggregation database

GPe : Globus Pallidus externe

GPi : Globus Pallidus interne

HGMD : Human Gene Mutation Database

IRM : Imagerie par résonance magnétique nucléaire

LTD : Dépression à long terme

LTP : Potentialisation à long terme

MDS : Movement Disorders Society

NBIA : Neurodégénérescence par accumulation cérébrale de fer

PF : Noyau parafasciculaire du thalamus

Polyphen-2 : Polymorphism Phenotyping 2

SBS : Séquençage par synthèse chimique

SIFT : Sorting Intolerant From Tolerant

SNc : Substantia Nigra pars compacta



SNr : Substantia Nigra pars reticulata

SPN : Neurone épineux moyen du striatum

STN : Noyau sous-thalamique

TS : Séquençage par capture ciblée d'un panel de gènes

VA : Noyau ventral antérieur du thalamus

VIM : Noyau ventral intermédiaire du thalamus

VL : Noyau ventral latéral du thalamus

WES : Séquençage de l'exome

WGS : Séquençage du génome

# Liste des figures

Figure 1 : Axe 1 du consensus de 2013 concernant la classification de la dystonie (d'après Albanese et al.) (1,11).....	12
Figure 2 : Illustrations de la variabilité topographique des syndromes dystoniques .....	14
Figure 3 : Réseaux des ganglions de la base d'après Ribot et al. (45) .....	17
Figure 4 : Illustration d'anomalies à l'IRM cérébrale associées à des syndromes dystoniques d'origine génétique .....	20
Figure 5 : Préparation des librairies d'ADN pour le séquençage d'exome (82) .	25
Figure 6 : Séquençage haut débit selon la technologie Illumina (d'après Lu et al.) (82,83) .....	25
Figure 7 : Traitement bio-informatique des données de séquençage haut débit, (adapté de Pan et al.) (49,95).....	27
Figure 8 : Résultats de l'analyse du séquençage ciblé d'un panel de 127 gènes de mouvements anormaux (adapté de Montaut et al. )(99).....	31
Figure 9 : Voie moléculaire impliquant GNAO1 (d'après Feng et al.) (11,103)..	57

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Description des catégories de l’Axe 1 du consensus de 2013 concernant la classification de la dystonie (1,11).....	12
Tableau 2 : Anomalies IRM retrouvées dans les dystonies pédiatriques, (d’après Meijer et al.) (11,57).....	19
Tableau 3 : Marqueurs biologiques retrouvées dans les dystonies pédiatriques (d’après Meijer et al.) (11,57).....	19
Tableau 4 : Description des catégories de dystonie définie par la Task force de la Parkinson and Movement Disorders Society accompagnée d’exemples (11,76) .....	22
Tableau 5 : Variants délétères dans les gènes candidats identifiés au sein de la cohorte de patients présentant une dystonie associée à une paralysie de la verticalité du regard .....	139

# 1. Introduction

## 1.1 Généralités concernant la dystonie

La dystonie se définit comme une pathologie de la motricité caractérisée par des mouvements anormaux, et/ou des prises de postures anormales (1). La dystonie est liée à des contractions musculaires involontaires, intermittentes ou soutenues. Les mouvements dystoniques suivent un pattern spécifique correspondant à des mouvements de torsion, parfois à des tremblements (2). La dystonie est aggravée par le mouvement volontaire et associée à un phénomène d'overflow, défini comme une contraction musculaire involontaire qui accompagne, mais est anatomiquement distincte, du mouvement dystonique primaire (1,3). La dystonie est le troisième mouvement anormal le plus fréquent après le tremblement et le syndrome parkinsonien (4). Elle affecte environ 20% des patients consultant dans un service spécialisé en mouvement anormaux (5,6). Sa prévalence a été estimée à 16 pour 100.000 pour les formes tardives de l'adulte contre 7.6 pour 100.000 pour les formes plus précoces (5,6).

La dystonie peut potentiellement affecter l'ensemble des segments du corps, et s'associe à un handicap variable. Elle peut par exemple concerner la sphère oro-mandibulaire et compliquer la prise alimentaire ou hydrique (7). Elle peut affecter la partie supérieure du visage et les paupières, on parle alors de blépharospasme, ce qui peut gêner des activités comme la lecture ou la conduite d'un véhicule (8). Plus handicapante est la dystonie des membres ou du tronc qui va impacter la marche ainsi qu'un nombre important d'activités de la vie quotidienne, telle que l'alimentation, l'habillement ou l'écriture, altérant in fine l'indépendance fonctionnelle du patient souffrant de cette pathologie (9). Enfin, les dystonies laryngées peuvent s'accompagner d'une dysphonie et de troubles de la parole, ainsi que d'une dysphagie qui peut alors faire le lit de pneumopathies d'inhalation et menacer à terme le pronostic vital (10).

Il existe une variabilité importante des présentations cliniques dans la dystonie ainsi qu'une grande hétérogénéité des causes. La récente classification des dystonies distingue ainsi deux axes, un axe clinique (axe 1) caractérisant la dystonie en fonction de son âge de début, de sa topographie, de son évolutivité dans le temps (figure 1 et tableau 1) et un axe étiologique (axe 2) caractérisant la dystonie en fonction de son origine (1,11).

Figure 1 : Axe 1 du consensus de 2013 concernant la classification de la dystonie (d'après Albanese et al.) (1,11)

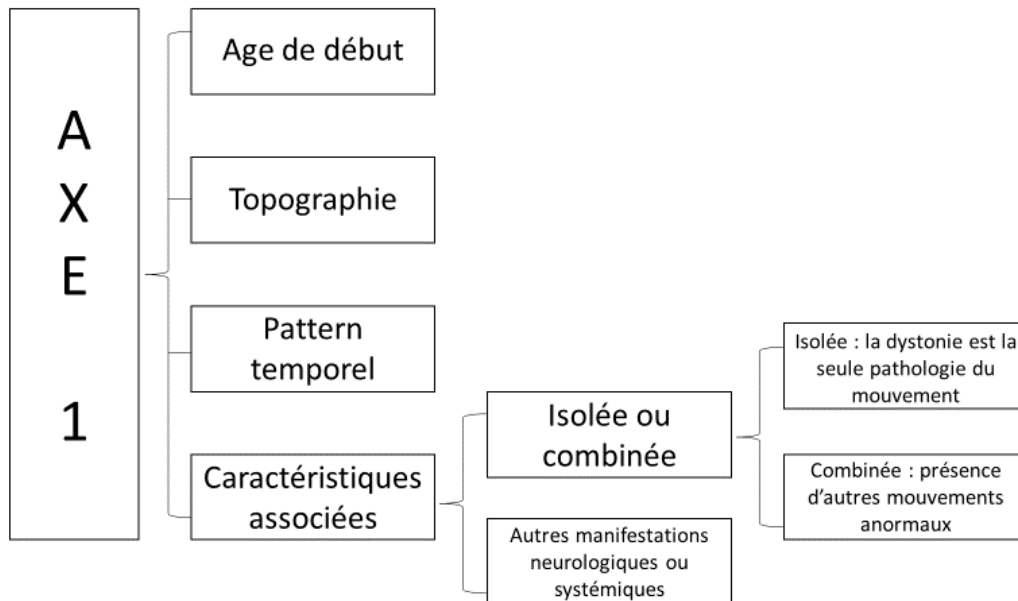


Tableau 1 : Description des catégories de l'Axe 1 du consensus de 2013 concernant la classification de la dystonie (1,11)

Axe 1 Consensus de la Classification des Dystonies		
Caractéristiques clinique	Catégories	Définition
Age de début	Petite enfance	(0-2ans)
	Enfance	(2-12 ans)
	Adolescence	(12-20 ans)
	Adulte jeune	(20-40 ans)
	Adulte âgé	(>40 ans)
Topographie	Focale	1 région du corps atteinte
	Segmentaire	≥ 2 régions contigües atteintes
	Multifocale	≥ 2 régions non contigües atteintes
	Généralisée	Atteinte du tronc et ≥ 2 autres régions
	Hémidystonie	Hémicorps atteint
Pattern temporel	De la maladie	Progressif
		Non progressif
	De la dystonie	Permanente
		Fluctuante
		Paroxystique
Caractéristiques cliniques associées	Mouvements anormaux (dystonie combinée)	
	Autres signes cliniques	

L'âge de début est un facteur important de cette classification dans la mesure où les dystonies débutant précocement sont généralement de moins bon pronostic que celles débutant tardivement (12). En effet, plus une dystonie va débiter tôt au cours de la vie, plus elle va avoir tendance à se généraliser. Inversement, la majorité des dystonies apparaissant à l'âge adulte sont des formes focales, d'extension limitée, et habituellement moins invalidantes (1). Distinguer formes précoces et formes tardives de dystonie fait également sens d'un point de vue diagnostic, puisqu'une cause sous-jacente, notamment génétique, est plus fréquente lorsque la dystonie apparaît dans l'enfance ou la petite enfance. En revanche, l'identification de la cause à l'origine de la dystonie est plus rare dans les dystonies tardives, qui correspondent le plus fréquemment à des pathologies acquises (13).

La topographie correspond à l'étendue et la répartition au niveau du corps de la dystonie. La figure 2 illustre la variabilité de cette caractéristique. On distingue des dystonies focales, qui ne vont toucher qu'un unique segment du corps, à l'image du blépharospasme qui n'affecte que les paupières ou du torticolis spasmodique touchant seulement le cou. Il existe également des dystonies segmentaires, qui vont toucher deux segments contigus du corps, par exemple les paupières et la mâchoire dans le syndrome de Meige. Les dystonies multifocales vont affecter au moins deux segments non contigus du corps, alors qu'une dystonie hémicorporelle ne touchera qu'un seul côté du corps. Enfin, les dystonies généralisées se définissent par l'atteinte du tronc et de deux autres régions (1).

Les dystonies généralisées sont plus fréquemment associées à une origine spécifique, notamment génétique (14). Par opposition, la cause d'une dystonie focale restera indéterminée la plupart du temps (15,16). Les modalités thérapeutiques diffèrent également en fonction de l'étendue de la dystonie. Ainsi, on privilégiera les injections de toxine botulique dans les groupements musculaires impliqués pour la dystonie focale (17). Les formes généralisées seront à l'inverse traitées pharmacologiquement par des médicaments tels que les traitements anticholinergiques ou la tétrabénazine (18,19) ou par chirurgie de stimulation cérébrale profonde du globus pallidus interne (20), du thalamus (21) ou du noyau sous-thalamique (22).

Figure 2 : Illustrations de la variabilité topographique des syndromes dystoniques

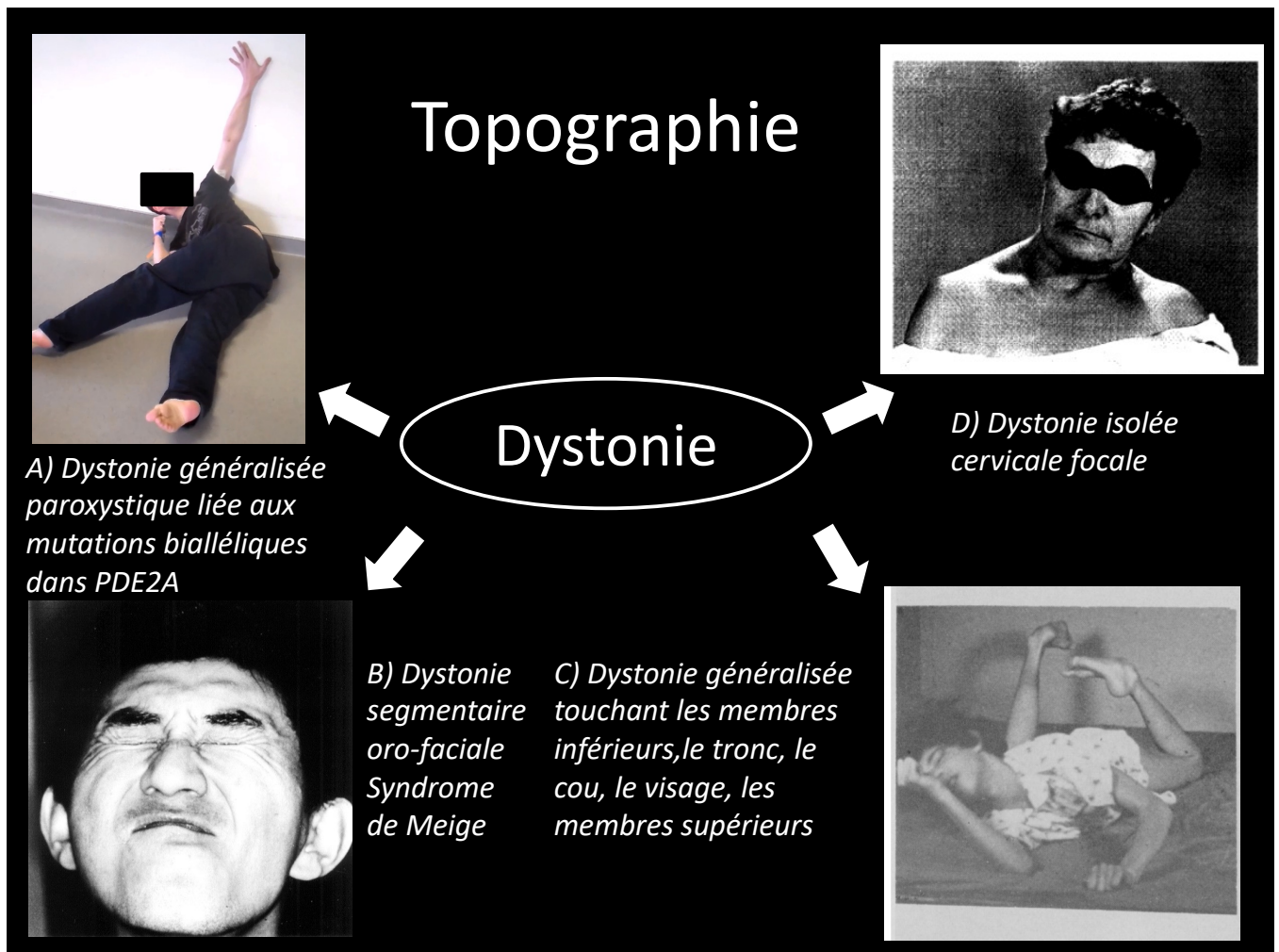


Illustration de la variabilité phénotypique des syndromes dystoniques en termes de topographie

- A) Accès de dystonie généralisée paroxystique chez un patient porteur de mutations bialléliques dans *PDE2A* (issu de Doummar et al.) (23).
- B) Dystonie segmentaire touchant 2 segments contigus : paupières (blépharospasmes) et sphère oro-mandibulaire caractéristique d'un syndrome de Meige (issu de Tsubota et al.) (24)
- C) Dystonie généralisée touchant les 4 membres, le tronc, le cou, la face, pouvant s'observer dans les dystonies associées à *TOR1A* (issu de Cooper et al.) (25).
- D) Dystonie cervicale focale isolée caractéristique d'un torticolis spasmodique (issu de Hains et al.) (26).



L'évolutivité dans le temps de la dystonie peut se diviser en deux points : évolutivité de la maladie d'une part et évolutivité des symptômes d'autre part (1).

L'évolutivité de la maladie concerne le caractère progressif, représentant les cas où la dystonie va avoir tendance à s'aggraver, et les formes non progressives de dystonie où celle-ci va rester stable (14).

Concernant l'évolutivité du symptôme, on distingue 4 profils différents : les dystonies persistantes, les dystonies paroxystiques, les dystonies fluctuantes et les dystonies tâches spécifiques.

Les dystonies paroxystiques sont caractérisées par l'apparition brutale des symptômes dystoniques pendant un laps de temps bref. C'est dans cette catégorie que l'on inclut les dyskinésies paroxystiques kinésigéniques (27), qui feront l'objet d'un chapitre spécifique de cette thèse. Ces dernières correspondent à l'apparition d'accès de mouvements anormaux dystoniques ou choréiques à la suite d'une activité motrice volontaire. Parmi ces dystonies paroxystiques se classent également les dyskinésies paroxystiques non-kinésigéniques et les dyskinésies induites par l'effort soutenu (28).

On individualise également les dystonies fluctuantes, caractérisées par une variabilité de la sévérité de la symptomatologie sur la journée qui s'opposent aux dystonies persistantes, où la symptomatologie va rester stable au cours du temps. Le caractère fluctuant est ainsi en faveur de formes particulières de dystonies génétiques dénommées dystonies dopa-sensibles qui sont liés à des variants pathogènes localisés au sein des gènes *GCH1* (29), *SEPR* (30) ou *TH* (31) et qui vont avoir pour caractéristique principale de très bien répondre à de faibles doses de lévodopa (32).

Enfin on distingue des dystonies dites tâches spécifiques, où la dystonie se manifeste seulement lors d'actions particulières telles que l'écriture (crampe des écrivains) (33), lors de l'utilisation d'un instrument de musique (crampes des musiciens) (34) ou lors de la pratique du golf (yip) par exemple (35).

La nosographie actuelle de la dystonie propose également de caractériser la dystonie en fonction de la présence ou de l'absence de mouvements anormaux associés en dystonie isolée, où la dystonie est le seul symptôme, et en dystonie combinée, où la dystonie s'associe à d'autres mouvements anormaux (1,36).

Les dystonies combinées sont ainsi associées à des variants pathogènes dans des gènes spécifiques, à l'image des dystonies myocloniques liées aux mutations dans *SGCE* (37) caractérisées par la présence d'un myoclonus ou du syndrome dystonie-parkinsonisme lié aux variants pathogènes bialléliques dans le gène *PRKN* (38) combinant dystonie et syndrome extrapyramidal. Ce tableau clinique particulier fera également l'objet d'un chapitre dédié dans ce travail.

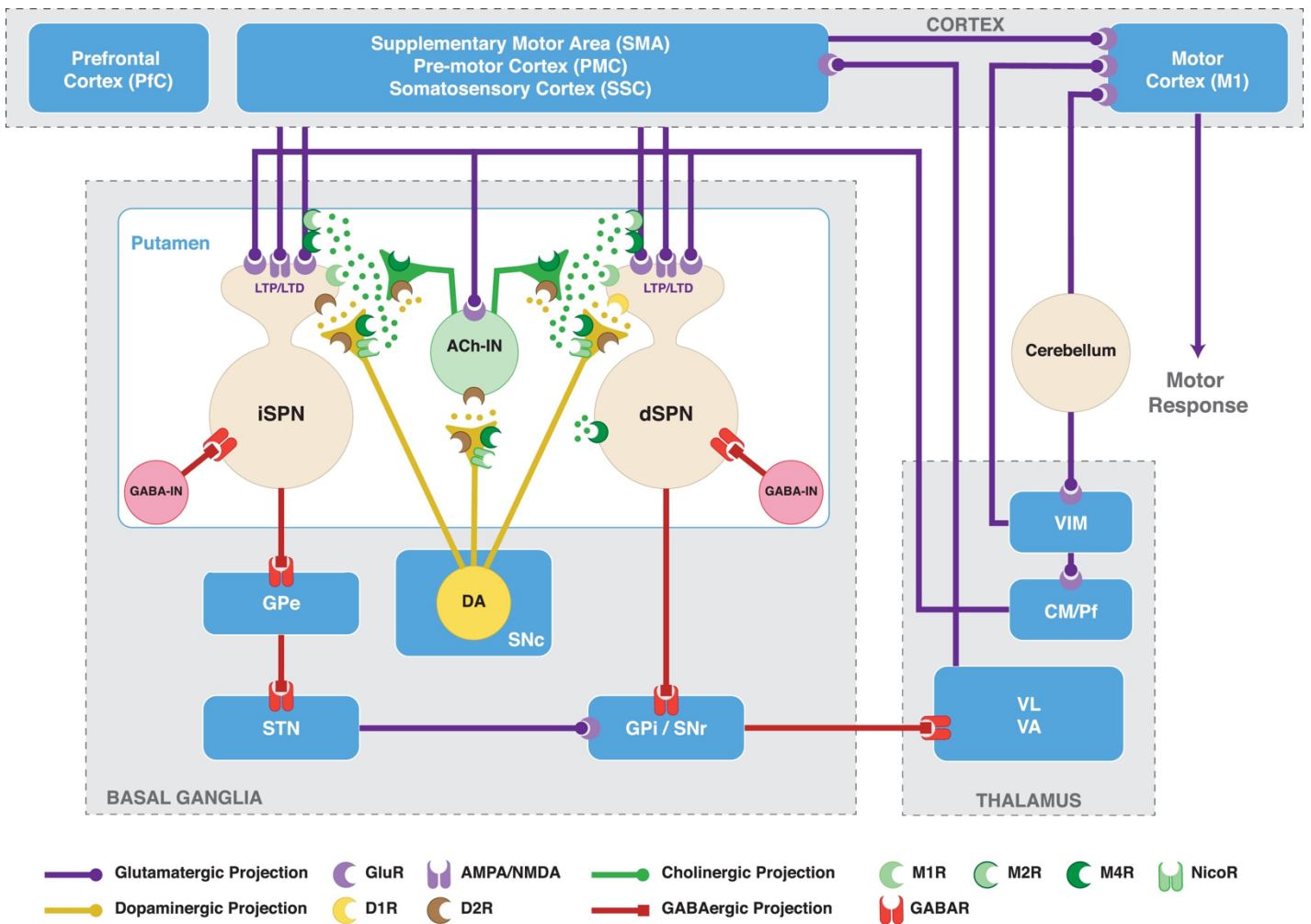
Enfin, la classification actuelle de la dystonie individualise les dystonies s'intégrant dans un tableau clinique riche, où la dystonie va s'associer à d'autres symptômes qui peuvent être neurologiques à l'image de la déficience intellectuelle, de l'épilepsie, d'un déclin cognitif, ou extra-neurologiques, par l'atteinte d'autres organes (1,11,36).

## **1.2 Physiopathologie et causes des syndromes dystoniques**

Les déterminants anatomiques de la dystonie concernent le réseau des ganglions de la base, décrit sur la figure 3. Les premières études anatomopathologiques de patients souffrant de dystonie isolée d'origine indéterminée ou de formes génétiques n'avaient pas mise en évidence d'anomalies particulières au niveau du cerveau dans la majorité des cas (5,39). Dans certaines études néanmoins, de discrètes lésions avaient été mises en évidence notamment au niveau du putamen, suggérant très tôt une implication des ganglions de la base dans la physiopathologie de la dystonie (5,40).

Les études plus récentes d'imagerie structurelle et fonctionnelle ont amené à considérer la physiopathologie de la dystonie comme la résultante de la dysfonction d'un réseau impliquant non seulement les ganglions de la base, mais également le cervelet et le cortex (5,41–43). Il a également été suggéré que des anomalies dans le système sensoriel puisse contribuer à l'apparition de la dystonie (44).

Figure 3 : Réseaux des ganglions de la base d'après Ribot et al. (45)



Les neurones épineux moyens du putamen (dSPN et iSPN) projettent sur le globus pallidus interne (GPe) et la substantia nigra pars reticulata (SNr) via une voie directe (D1) et une voie indirecte (D2) passant par le globus pallidus externe (GPe) et le noyaux sous-thalamique (STN). Ces voies sont modulées par les neurones dopaminergiques (DA) de la substantia nigra pars compacta (SNc). Les neurones épineux moyens sont également modulés par les interneurons cholinergiques (ACh-IN) et gabaergiques (GABA-IN) influant sur la potentialisation (LTP) et la dépression (LTD) synaptique à long terme. Ils reçoivent des afférences en provenance du cortex frontal, lui-même recevant des afférences des noyaux Ventro Latéral (VL) et Ventral Antérieur (VA) du thalamus. Ce réseau va être sous l'influence du cervelet au travers du noyau Ventral InterMédiaire (VIM) du thalamus et des noyaux ParaFasciculaires (PF) et CentroMédian (CM) du thalamus).

Des altérations de la plasticité synaptique et de la potentialisation à long terme pourraient également jouer un rôle dans la pathogenèse de la dystonie (46).

Il a enfin été démontré que la neurotransmission dopaminergique joue un rôle important dans la survenue de cette pathologie. En effet, plusieurs gènes au sein desquels des variants pathogènes ont été associés à des phénotypes dystoniques codent pour des protéines impliquées dans les voies de signalisation dopaminergiques (30,31,47–51). Les voies dopaminergiques semblent également contribuer à la physiopathologie des formes sporadiques tardives de dystonie (5,11,52–54).

Concernant la conduite diagnostique devant un syndrome dystonique, celle-ci va être influencée de façon majeure par la phénoménologie clinique présentée par le patient et surtout par l'âge de début des symptômes (11).

Dans le cadre d'une forme focale de dystonie débutant après 40 ans, la prise en charge habituelle comprend un interrogatoire visant à identifier une origine pharmaco-induite de la dystonie à la suite de l'exposition à un neuroleptique (55) ou des antécédents de souffrance néonatale, qui peuvent provoquer un syndrome dystonique des années plus tard (56). Un examen physique attentif permettra secondairement de caractériser cliniquement la dystonie. Enfin le bilan étiologique comprendra la réalisation d'une IRM cérébrale afin de ne pas méconnaître une cause structurelle au syndrome dystonique (Figure 4).

Dans le cadre d'une dystonie généralisée de début précoce, l'évaluation comprendra également une imagerie cérébrale, mais également des analyses plus larges, biochimiques et génétiques (57).

Le tableau 2 et la figure 3 présentent des anomalies IRM évocatrices de causes spécifiques de dystonie de début précoce.

Le tableau 3 donne des exemples d'anomalies biologiques pouvant être observées dans les dystonies pédiatriques.

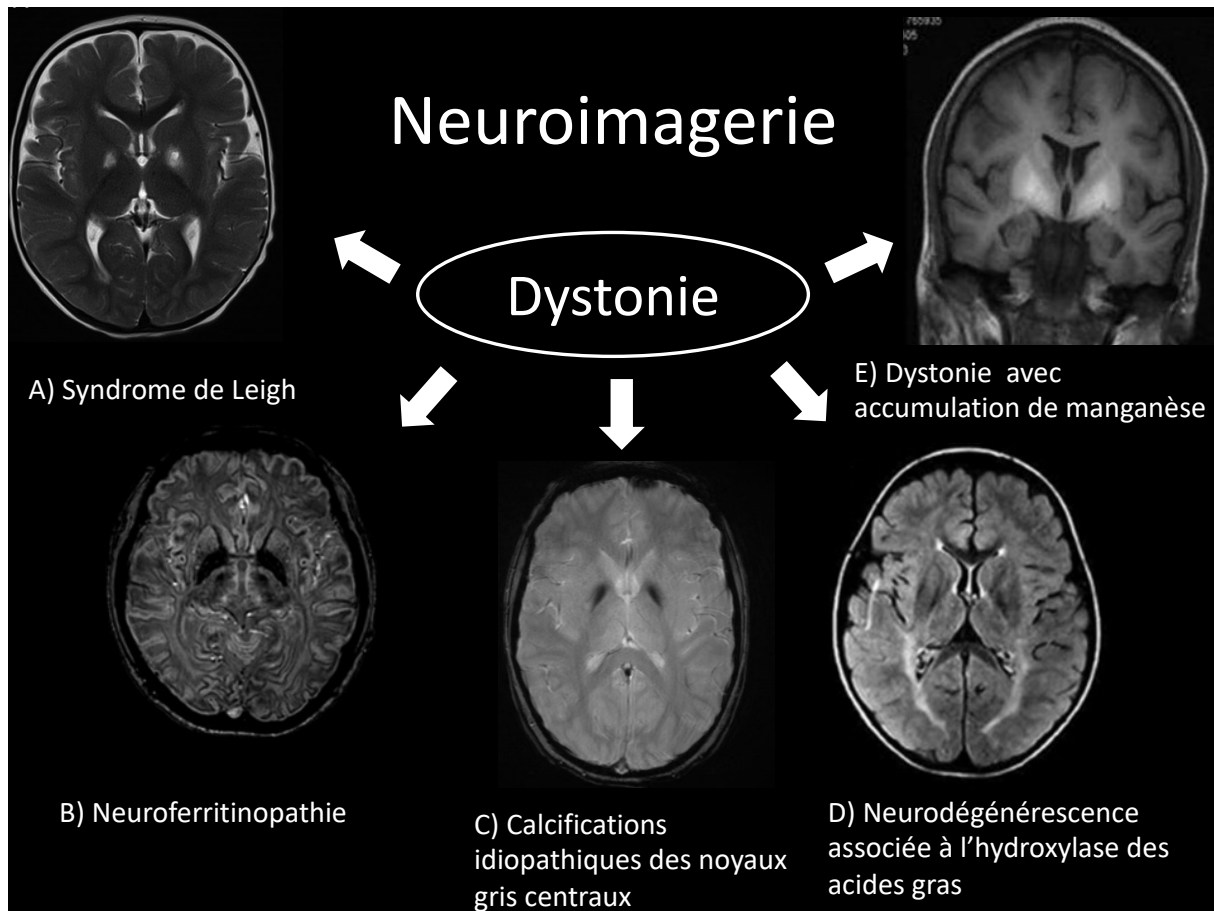
**Tableau 2 : Anomalies IRM retrouvées dans les dystonies pédiatriques, (d'après Meijer et al.) (11,57)**

Anomalie à l'imagerie	Maladie
<b>Lésion des ganglions de la base</b>	
Hypersignaux T2 (Syndrome de Leigh)	Maladie de Wilson
	Mitochondriopathie
	Déficience en transporteur de la thiamine
	Déficience en pyruvate déshydrogénase
	Acidurie organiques
Hyposignaux T2	NBIA
	Fucosidose
Hypersignaux T1	Accumulation cérébrale de Manganèse
Calcifications	Syndrome d'Aircardi-Goutières
	Calcifications cérébrales primitives
Atrophie du noyau caudé	Maladie de Huntington
	Choreo-acanthocytose
<b>Lésion de la substance blanche</b>	
Hypomyélinisation	Syndrome H-ABC
	Syndrome d'Aircardi-Goutières
	Syndrome surdité-dystonie
	Syndrome de Pelizaeus-Merzbacher
	Gangliosidose à GM1
	Mitochondriopathie

**Tableau 3 : Marqueurs biologiques retrouvées dans les dystonies pédiatriques (d'après Meijer et al.) (11,57)**

Test	Prélèvement	Trouble
Neurotransmetteurs monoaminergiques, métabolites, ptéridines	LCR	Déficience dans le métabolisme de la BH4, déficit en TH, AADC, DNAJC12
5-méthyltétrahydrofolate	LCR	Déficit cérébral en folate
Glucose	LCR, plasma	Déficit en GLUT1
Lactate	LCR, plasma	Acidurie propionique, méthylmalonique
Pyruvate	LCR, plasma	Déficit en pyruvate déshydrogénase
Amino-acides	Plasma	Maladie du sirop d'érable
Acylcarnitines	Plasma	Aciduries organiques
Biotinidase	Plasma	Déficit en biotinidase
Vitamine E	Plasma	Ataxie par déficit en vitamine E
AFP	Plasma	Ataxie télangiectasie
TSH	Plasma	Syndrome cerveau-thyroïde-poumon
Acide urique	Plasma	Syndrome de Lesch-Nyhan
Oxystérols	Plasma	Niemann-Pick C
Cholestanol	Plasma	Xanthomatose cérébro tendineuse
Manganèse	Sang total	Accumulation cérébrale de manganèse
Cuivre, céruléoplasmine	Plasma	Acéruléoplasminémie, maladie de Wilson
Creatine et guanidinoacetate	Plasma	Déficit en créatine
Acides organiques	Urine	Aciduries organiques

Figure 4 : Illustration d'anomalies à l'IRM cérébrale associées à des syndromes dystoniques d'origine génétique



- A) Hypersignal en séquence T2 au niveau pallidal bilatéral dans le cadre d'un syndrome de Leigh (issu de Baertling et al.) (58).
- B) Hyposignal en séquence de susceptibilité ferro-magnétique au niveau pallidal bilatéral dans le cadre d'une neuroferritinopathie liée à un variant pathogène hétérozygote dans le gène *FTL* (issu de Park et al.) (59).
- C) Hyposignal bipallidal témoignant de calcifications cérébrales idiopathiques des noyaux gris centraux liées à une délétion des gènes *SLC20A2* et *THAP1* (issu de Mu et al.) (60).
- D) Hypersignaux de la substance blanche en séquence Flair associés à des variants pathogènes bi-alléliques dans *FAHN* (issu de Edvardson et al.) (61).
- E) Hypersignal pallidal bilatéral en séquence T1. Dystonie associée à des dépôts de manganèse liés à un variant pathogène dans *SLC30A10* (issu de Stamelou et al.) (62).

### 1.3 Les dystonies d'origine génétique

Le caractère familial de certaines dystonies généralisées avait été identifié dès les années 1947 (63). Le premier locus associé à une forme génétique de dystonie fut identifié en 1990 (64), et cinq années supplémentaires furent nécessaires pour associer pour la première fois une dystonie généralisée de transmission autosomique dominante à pénétrance incomplète avec un gène spécifique, *TOR1A* (65).

Le développement des techniques de séquençage haut débit de l'ADN et leur disponibilité croissante depuis le début des années 2010 se sont accompagnés d'une augmentation exponentielle de la découverte de nouveaux gènes associés à des phénotypes neurologiques incluant la dystonie comme manifestation principale ou comme symptôme accompagnant un tableau clinique plus large (66). Désormais l'ensemble des modes de transmission ont été rapportés dans la dystonie. On distingue ainsi des formes autosomiques dominantes de dystonies généralisées isolées ou combinées, dont *TOR1A* (65,67) et *KMT2B* (68–70) sont les principaux gènes. On dénombre désormais également un grand nombre de dystonies de transmission autosomique récessive, s'intégrant souvent dans des tableaux plus complexes (71). Il existe également des formes génétiques de dystonies liées à l'X, dominantes par exemple les dystonies associées aux variants pathogènes dans *WDR45* (72), ou récessives, telles que les dystonies associées aux variants pathogènes dans *TAF1* (73). Une hérédité mitochondriale a également été rapportée dans la dystonie (74). Au total, plus de 70 gènes au sein desquels des variants pathogènes ont été associés à des phénotypes dystoniques sont désormais connus, soulignant l'importante hétérogénéité génétique associée à ce phénotype (11,75).

En 2015, la Movement Disorders Society (MDS) a constitué une task force pour établir une nouvelle nomenclature concernant la caractérisation clinique des mouvements anormaux d'origine génétique, incluant notamment la dystonie (76). Cette classification, accompagnée d'illustrations pour chaque catégorie est visible sur le tableau 4. Celle-ci reprenait en partie le consensus de 2013 décrit précédemment, isolant des dystonies isolées, combinées, ainsi qu'un troisième groupe comprenant les dystonies associées à d'autres manifestation, neurologiques (ataxie cérébelleuse, syndrome pyramidal, déficience Intellectuelle) ou systémique (cardiopathie, surdité de perception, etc...) (1,11,76)

Tableau 4 : Description des catégories de dystonie définie par la Task force de la Parkinson and Movement Disorders Society accompagnée d'exemples (11,76)

Phénotype	Caractéristiques cliniques	Nombre MIM	Mode de transmission	Nom du locus
<b>Dystonie isolée : absence d'autres symptômes que la dystonie</b>				
<b>DYT-TOR1A</b>	Dystonie généralisée de début précoce	128100	AD	DYT1
<b>DYT-THAP1</b>	Dystonie de sévérité variable débutant à l'adolescence	602629	AD	DYT6
<b>DYT-GNAL</b>	Dystonie cranio cervicale prédominante débutant au début de l'âge adulte	615073	AD	DYT25
<b>Dystonie combinée : présence d'autres mouvements anormaux</b>				
<b>DYT/PARK-ATP1A3</b>	Dystonie parkinsonisme de début précoce, hémiplégie alternante de l'enfant, chorée en fin de vie, syndrome CAPOS (ataxie cérébelleuse, pes cavus, atrophie optique, surdité)	128235	AD	DYT12
<b>CHOR/DYT-ADCY5</b>	Dyskinésies faciales, dystonie généralisée, myoclonies, chorée, caractère paroxystique	600293	AD	/
<b>DYT/PARK-TAF1</b>	Dystonie parkinsonisme	314250	Lié à l'X	DYT3
<b>Dystonie complexe : présence d'autres signes cliniques neurologiques ou extra neurologiques</b>				
<b>HSP/NBIA-C19orf12</b>	Mitochondrial Protein Associated Neurodegeneration (MPAN) : dystonie, parkinsonisme, syndrome pyramidal, détérioration cognitive, neuropathie, atrophie optique, troubles psychiatriques, accumulation de fer dans les noyaux gris centraux, hypersignal de la lame médullaire interne à IRM	6142988	AR	NBIA4
<b>NBIA/CHOR-FTL</b>	Neuroferritinopathie : dystonie, chorée, parkinsonisme, dépôt de fer dans les noyaux gris centraux, dyskinésie oro-mandibulaire, dysphagie, troubles cognitifs, taux de ferritine dans le sang basse	606159	AR	NBIA3
<b>DYT-TUBB4A</b>	Dysphonie spasmodique, leucodystrophie	128101	AD	TUBB4A



## 1.4 Le séquençage à haut débit de l'ADN

Pendant de nombreuses années la stratégie diagnostique face à une dystonie débutant précocement ou bien associée à une histoire familiale, se basait sur un séquençage utilisant la technique de Sanger (77). Cette technique historique permettait d'analyser des séquences limitées à quelques centaines de paires de bases, ne permettant pas de couvrir au cours d'une seule analyse l'ensemble des gènes impliqués dans un phénotype donné. Les gènes associés à des formes génétiques de dystonie étaient ainsi analysés les uns après les autres en priorisant les gènes paraissant être les plus compatibles avec le tableau clinique présenté par le patient. Cette stratégie souffrait de plusieurs limites : elle était chronophage, puisqu'il pouvait s'écouler plusieurs mois avant qu'un résultat ne soit rendu et qu'un nouveau test ne pouvait être initié qu'après le retour négatif du précédent (71). Elle restait par ailleurs relativement onéreuse (11,66).

Depuis la fin des années 2010, la disponibilité de plus en plus large des techniques de séquençage haut débit permet de séquencer pour un coût de plus en plus faible une quantité de plus en plus importante de paires de bases. La disponibilité croissante de ces nouvelles technologies s'est accompagnée de l'identification d'un nombre important de gènes associés à des phénotypes divers incluant notamment les maladies neurologiques (78).

En fonction de la région d'intérêt à amplifier, on distingue le séquençage du génome entier (Whole Genome Sequencing, WGS), le séquençage de l'exome (Whole Exome Sequencing, WES) qui n'intéresse que les régions codantes du génome ainsi que le séquençage ciblé d'un panel de gènes (Targeted Sequencing, TS) conçus au préalable pour le diagnostic moléculaire d'un type de pathologie correspondant au phénotype d'intérêt (79). Dans les deux dernières situations, une étape préalable de capture des séquences d'intérêt est requise avant la phase d'amplification et de séquençage à proprement parler.

Le processus de réalisation du séquençage haut débit de l'ADN va débiter par la préparation de bibliothèques d'ADN.

A partir d'ADN extrait du patient, un processus chimique ou physique (sonication par ultrasons) va permettre de fragmenter l'ADN en morceaux de tailles aléatoires, qui vont dans

un second temps être réparés, polyadénylés et liés à des adaptateurs indexés. Après une première amplification par PCR, les fragments sont dénaturés et hybridés à des sondes biotinylées spécifiques des régions à amplifier (gènes d'intérêt dans le séquençage ciblé et exons dans l'exome) qui vont être capturées dans un second temps via des billes métalliques recouvertes de streptavidine. Cette interaction permet de récupérer les séquences d'intérêt qui vont constituer la librairie d'ADN et être à nouveau amplifiées avant de pouvoir être séquencées (80). Pour le séquençage du génome, l'ensemble des régions codantes et non codantes étant analysées, cette étape de capture n'est pas nécessaire. Une description des modalités de préparation des librairies pour le séquençage de l'exome est détaillée sur la figure 5.

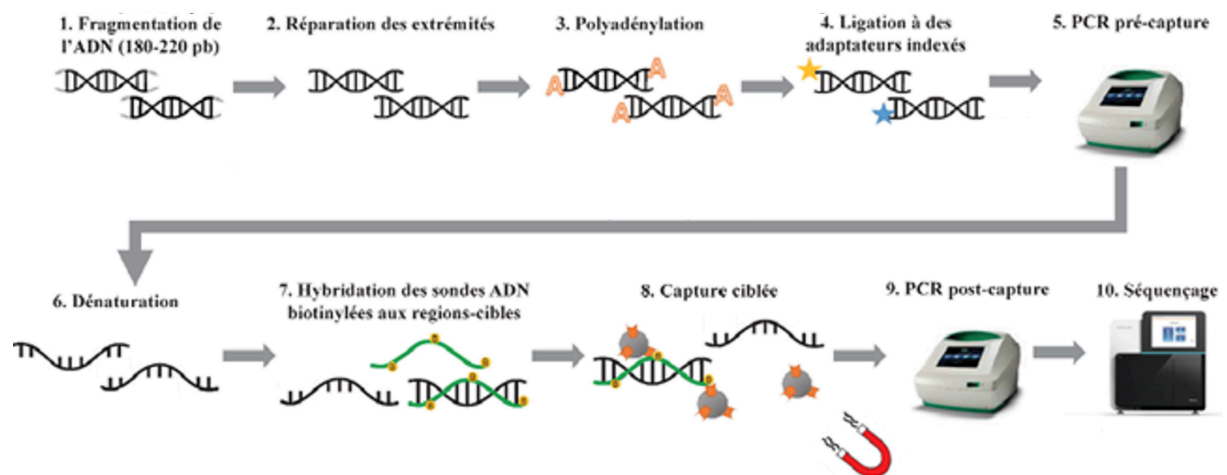
Une fois les librairies produites, le séquençage haut débit à proprement parler va pouvoir débuter. La principale technique de séquençage haut débit est la technique d'amplification par Bridge PCR proposé par la firme Illumina. Les principales étapes de cette technique sont détaillées sur la figure 6.

Chaque pool de librairies est tout d'abord dénaturé puis une dilution est effectuée et le pool est déposé sur un support solide (le Flowcell) qui est introduit dans le séquenceur. Après dénaturation, les fragments d'ADN simples brins des librairies peuvent se fixer via les adaptateurs à des oligonucléotides complémentaires ancrés au Flowcell.

Une amplification par formation de ponts entre les amorces (Bridge PCR) est alors réalisée. Le procédé est répété au cours du temps afin de générer des milliers de copies identiques de chaque fragment initial dans un diamètre inférieur à 1µm, constituant des clusters qui vont être utilisés pour le séquençage.

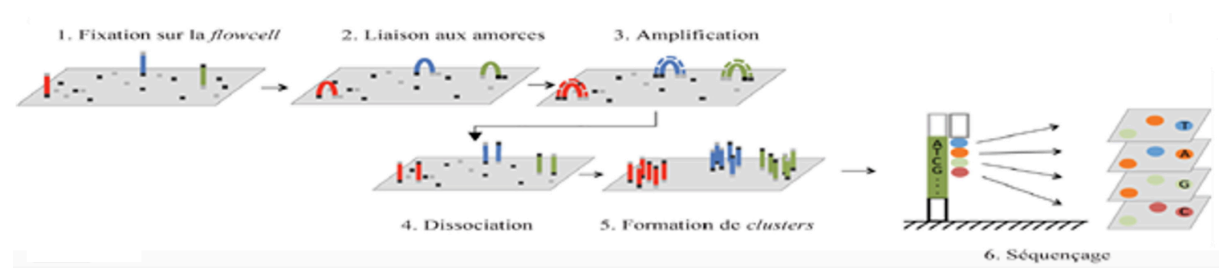
Le séquençage en lui-même est réalisé par synthèse chimique (SBS) qui utilise quatre nucléotides marqués d'un fluorophore différent pour séquencer en parallèle les clusters : à chaque cycle de séquençage, un désoxyribonucléotide (dNTP) marqué est ajouté à la chaîne d'acides nucléiques, émet après stimulation lumineuse une fluorescence spécifique qui sera enregistrée et permettra in fine de l'identifier (11,81,82).

Figure 5 : Préparation des bibliothèques d'ADN pour le séquençage d'exome (82)



L'ADN génomique est successivement fragmenté par sonication (1), réparé (2), polyadénylé (3), et lié à des adaptateurs indexés (4). Une première amplification par PCR est réalisée (5), puis après dénaturation (6), les fragments d'ADN sont hybridés à des sondes biotinylées spécifiques des exons (7) puis ces fragments hybridés aux sondes sont récupérés via l'interaction streptavidine-biotine (8). Après lavage, une nouvelle amplification par PCR est réalisée (9) et le séquençage peut alors débuter (10).

Figure 6 : Séquençage haut débit selon la technologie Illumina (d'après Lu et al.) (82,83)



Après dénaturation et dilution, les fragments d'ADN sont déposés sur la Flowcell et vont s'hybrider aux oligonucléotides fixés au support via les adaptateurs (1), les fragments d'ADN vont alors former des ponts (2) et s'hybrider aux amorces voisines, ce qui va permettre une amplification par "bridge PCR" (3) suivie d'une dissociation du brin matriciel (4). La répétition de ces cycles va permettre de générer des clusters formés de copies du fragment initial (5) qui pourront être ensuite séquencés selon la technique de séquençage par synthèse (6).

## 1.5 Le traitement bio-informatique des données de séquençage haut débit

A la suite de la phase de séquençage à proprement parler aura lieu l'analyse bio-informatique des données brutes (84). La figure 7 présente les différentes étapes du traitement bio-informatique des données de séquençage.

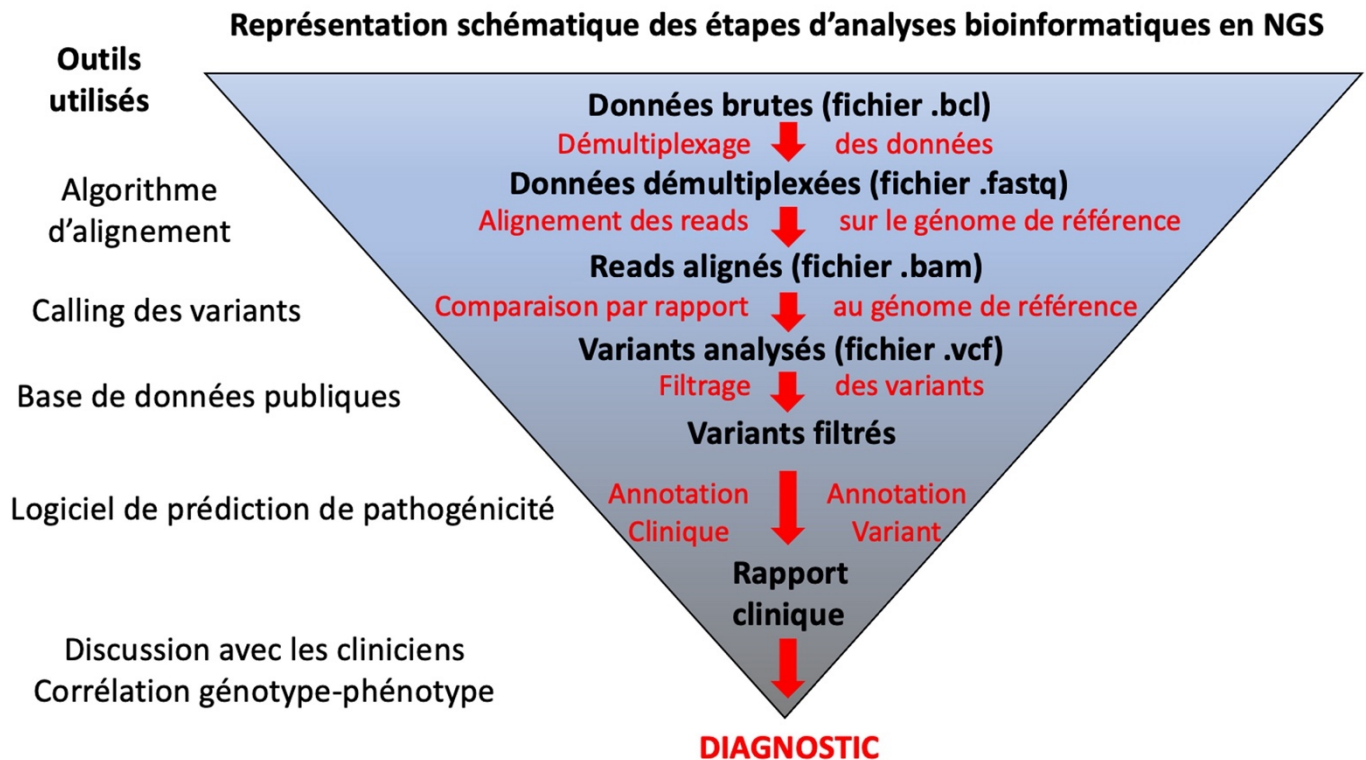
Les acquisitions numérisées des images générées correspondant à chaque cluster regroupé dans des fichiers .bcl sont traitées et démultiplexées, générant des fichiers .fastq regroupant l'ensemble des reads d'un patient donné.

Chaque read représente ainsi une séquence nucléotidique de 75 ou 150pb obtenue à partir d'un fragment initial d'ADN. L'étape suivante correspond à l'alignement des reads sur le génome de référence en utilisant un algorithme d'alignement, constituant des fichiers .bam. Les reads alignés seront, dans un second temps, comparés à cette référence afin d'obtenir une liste de variations génomiques (variant calling). Enfin, tous les variants identifiés vont être annotés (nom du gène, conséquences attendues au niveau protéique de la variation, fréquence du variant dans des bases de données) et filtrés.

La pathogénicité présumée du variant est alors déterminée en fonction de la fréquence du variant dans les bases de données publiques (Exac (85), 1000G (86), GnomAD (87)), ou de variants pathogènes (par exemple les bases de données HGMD (88) ou Clinvar (89)) du mode de transmission considéré, des conséquences attendues au niveau de la protéine, du degré de conservation du résidu considéré et des résultats obtenus au travers de l'analyse d'outils in silico de prédiction de pathogénicité tels que Mutation taster (90), SIFT (91), Polyphen (92) ou le score CADD (93), qui combinent plusieurs des paramètres cités précédemment.

L'ensemble de ces facteurs vont être utilisés par le généticien pendant l'analyse des données de séquençage haut débit. L'analyse peut être effectuée via une interface dédiée, à l'image de Polyweb®, interface hébergée par L'Université Paris Descartes, ou via l'utilisation d'un outil spécifique tel que Varank (11,94).

Figure 7 : Traitement bio-informatique des données de séquençage haut débit, (adapté de Pan et al.) (49,95)



Les données de séquençage haut débit sous forme de fichier .bcl vont tout d'abord être transformée en fichiers texte dit .fastq.

Ces données vont ensuite être alignées sur le génome de référence pour former un fichier .bam à partir duquel les variants vont pouvoir être identifiés par comparaison au génome de référence aboutissant au fichier .vcf.

Les variants sont ensuite filtrés et annotés permettant leur analyse sur une interface dédiée. La corrélation génotype-phénotype réalisée par l'interaction entre cliniciens et généticiens moléculaires permet d'affiner le diagnostic moléculaire en cas de difficultés.

## 1.6 La détermination de la pathogénicité des variants

Concernant les variants identifiés dans des gènes préalablement rapportés dans des pathologie mendéliennes, l'analyse des données du séquençage haut débit va s'appuyer sur les critères de l'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (96). Ces critères ont été introduits en 2015 afin d'harmoniser les pratiques des généticiens concernant l'interprétation des données de séquençage haut débit. L'analyse se base sur une liste de critères ayant chacun une pondération spécifique. Cela va permettre de catégoriser les variants identifiés par séquençage haut débit dans cinq classes différentes : bénin (classe 1), probablement bénin (classe 2), variant de signification inconnue (VUS) (classe 3), probablement pathogène (classe 4) et pathogène (classe 5). Bien que ces critères permettent de standardiser l'interprétation des données de séquençage haut débit, un certain nombre d'entre eux restent subjectifs.

Au décours de l'analyse, l'interaction entre le clinicien prescripteur et le généticien, idéalement formalisée au travers de réunions de concertation, permet de discuter de la cohérence du phénotype et éventuellement de réaliser un « reverse phenotyping » visant à conforter ou infirmer la pathogénicité du variant en retournant au phénotype clinique ou en dosant des biomarqueurs spécifiques (97).

Les critères de l'ACMG peuvent être regroupés en cinq catégories en fonction de la nature des données utilisées pour caractériser le variant identifié :

- La fréquence allélique : la fréquence du variant dans les bases de données publiques
- Les données prédictives et computationnelles : elles se basent sur les résultats obtenus au travers des algorithmes de prédiction de pathogénicité, sur la position du variant par rapport aux variants pathogènes déjà rapportés dans le gène incriminé, éventuellement sur la nature du variant (perte de fonction).
- Le phénotype clinique : prise en compte de la cohérence du phénotype du patient avec celui des patients porteurs de variants pathogènes dans le gène incriminé.
- La ségrégation du variant : elle est basée sur la présence ou l'absence du variant chez d'autres individus atteints ou sains dans la famille du patient.
- Les données fonctionnelles : elles témoignent in vivo (biomarqueur) ou sur des modèles in vitro de l'impact délétère du variant sur la fonction de la protéine.

Lorsque qu'un variant d'allure délétère est identifié dans un gène non rapporté préalablement dans une pathologie mendélienne, la stratégie de validation va différer légèrement, dans la mesure où les critères de l'ACMG ont été développés spécifiquement pour les variants localisés dans des gènes associés à une pathologie spécifique (96). Il conviendra alors pour valider le gène candidat de recherche de la récurrence, c'est-à-dire d'identifier d'autres patients présentant un phénotype compatible avec le patient initial et porteurs par ailleurs de variants pathogènes similaires dans le même gène.

Afin d'identifier d'autres patients, il est possible de s'appuyer sur des cohortes de patients existantes, présentant un phénotype homogène similaire à celui du patient porteur du gène candidat. En l'absence de ces dernières, des plateformes collaboratives, à l'image du site Genematcher (98), visant à mettre en contact généticiens et cliniciens travaillant sur les mêmes gènes d'intérêts dans les maladies rares peuvent permettre d'identifier des patients présentant des phénotypes similaires et porteurs de variants pathogènes de même nature.

## 1.7 Les causes génétiques manquantes de syndromes dystoniques

Les causes génétiques manquantes de syndromes dystoniques correspondent aux variants pathogènes, responsables de ces pathologies, localisés dans des gènes non rapportés dans la littérature comme étant associés à ce phénotype.

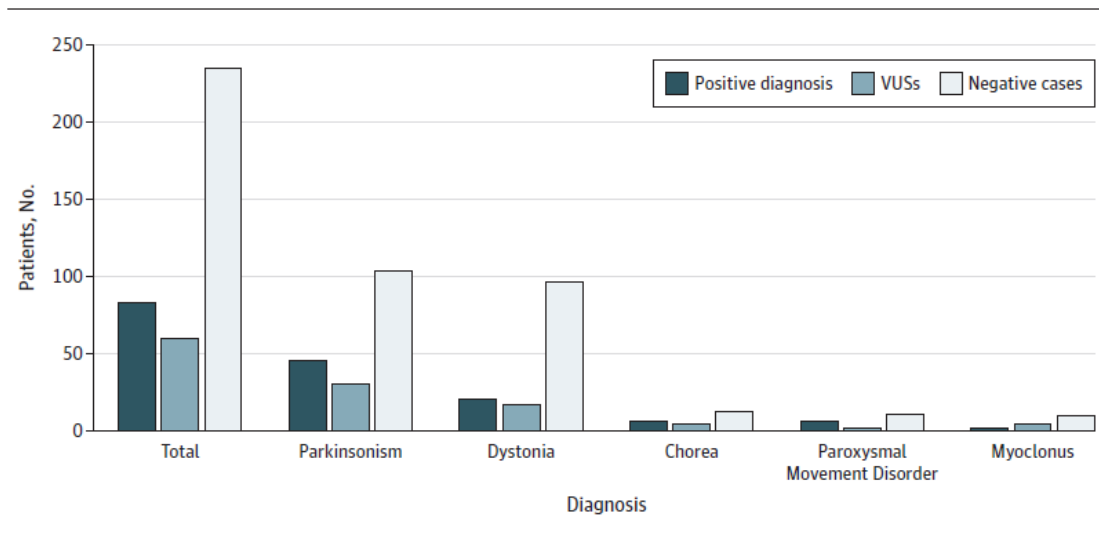
Notre équipe avait préalablement étudié le rendement diagnostique de l'analyse d'un panel de 127 gènes de mouvements anormaux chez des patients présentant des mouvements anormaux de début précoce (avant 40 ans) ou s'intégrant dans une histoire familiale (99). Parmi eux, 135 patients présentaient une dystonie comme mouvement anormal prédominant. Le panel incluait 69 gènes associés à des formes génétiques de dystonie. De façon intéressante le rendement obtenu par cette stratégie, bien que comparable aux rendements rapportés dans la littérature pour la dystonie (100,101), était statistiquement plus faible dans le groupe de patients présentant une dystonie précoce ou familiale, en comparaison aux rendements obtenus dans le reste de la cohorte. La figure 8 illustre cette différence de rendement diagnostique entre les différents phénotypes.

Plusieurs hypothèses pour expliquer ce résultat pouvaient être formulées. Il était possible que les patients inclus dans notre étude aient pu présenter des causes non génétiques de dystonie de début précoce, avec par exemple des souffrances néonatales ou une exposition aux neuroleptiques méconnue. Néanmoins, nombre d'entre eux présentaient également une histoire familiale, rendant cette hypothèse de phénocopie peu probable. Il était également possible que les symptômes présentés par les sujets inclus aient bien été d'origine génétique mais dus à des variants pathogènes localisés dans des gènes non étudiés par le panel de 127 gènes.

Comme nous l'avons vu précédemment, le séquençage de l'exome couvre l'ensemble des régions codantes du génome et pas seulement certains gènes spécifiques. Cet outil apparaissait donc comme une stratégie intéressante pour explorer les causes génétiques non couvertes par le panel et localisées en séquence codante (79).



Figure 8 : Résultats de l'analyse du séquençage ciblé d'un panel de 127 gènes de mouvements anormaux (adapté de Montaut et al. )(99)



Résultat de l'analyse d'un panel de 127 gènes de mouvements anormaux par capture ciblée (dont 69 gènes de dystonie) pour 387 patients (135 présentaient une dystonie comme mouvement anormal principal).

Le panel a permis l'identification pour 21 patients dystoniques de variants responsables de la pathologie initiale, correspondant à un rendement de 15.6 %.

Ce rendement était significativement plus faible que le rendement obtenu pour les patients parkinsoniens (25.4%) ou choréiques (28%) ( $p=0.03$ ).

## 1.8 Objectifs

L'objectif de ce travail de thèse était d'identifier les causes génétiques manquantes de syndromes dystoniques en utilisant le séquençage de l'exome sur une cohorte de patients dystoniques sans cause génétique identifiée.

Pour cela nous nous sommes appuyés sur cinq cohortes de patients présentant des syndromes dystoniques différents, préalablement explorés selon différentes stratégies :

- Une cohorte de 32 patients présentant un syndrome dystonique de début précoce (<40 ans) ou une dystonie familiale sans diagnostic moléculaire après analyse par capture ciblée d'un panel de 127 gènes de mouvements anormaux.
- Une cohorte de 24 patients porteurs de variants délétères dans *GNAO1* et présentant un phénotype dystonique léger.
- Une cohorte de 10 patients présentant un syndrome dystonie-parkinsonisme de début précoce (<40 ans) sans diagnostic moléculaire après analyse par capture ciblée d'un panel de 127 gènes de mouvements anormaux.
- Une cohorte de 35 patients présentant des dystonies paroxystiques de type dyskinesies paroxystiques kinésigéniques sporadiques ou familiales non porteurs de variants pathogènes dans *PRRT2*, principale cause génétique de ce phénotype.
- Une cohorte de 10 patients présentant un phénotype caractérisé par l'association d'une dystonie généralisée ou multifocale et de troubles oculomoteurs à type de paralysie de la verticalité sans diagnostic moléculaire après analyse par capture ciblée d'un panel de 127 gènes de mouvements anormaux.

Nous avons fait l'hypothèse que le séquençage de l'exome permettrait d'identifier des variants pathogènes ou probablement pathogènes localisés en séquence codante dans des gènes non rapportés comme étant responsables de syndromes dystoniques chez ces patients sans diagnostic moléculaire après des explorations considérées comme exhaustives. L'utilisation du séquençage de l'exome devait ainsi permettre d'identifier de nouvelles causes moléculaires de syndromes dystoniques.

## 2. Résultats

## 2.1 Rendement diagnostique du séquençage de l'exome dans les syndromes dystoniques

### 2.1.1 Le résultat du séquençage d'un panel de gènes de mouvements anormaux dans la dystonie

Comme nous l'avons souligné dans notre introduction, notre équipe avait pu au cours d'un précédent travail démontrer que les syndromes dystoniques étaient associés à un rendement diagnostique moindre après analyse par séquençage ciblé d'un panel de 127 gènes de mouvements anormaux en comparaison à d'autres mouvements anormaux (99).

Il a été démontré dans d'autres phénotypes neurologiques à l'image des encéphalopathies épileptiques que l'utilisation du séquençage de l'exome permettait d'augmenter le rendement diagnostique à la suite de l'analyse d'un panel de gènes par séquençage ciblé en identifiant des causes génétiques non couvertes par le panel et localisées en séquence codante (102).

Nous avons fait l'hypothèse que cette stratégie pourrait également être valide et s'appliquer dans la dystonie, permettant d'aboutir à l'identification de variants pathogènes non capturés par le séquençage d'un panel de gènes de mouvements anormaux

Nous avons donc utilisé la stratégie exome sur une cohorte de 32 patients issus de 24 familles sans diagnostic moléculaire établi à la suite de l'analyse d'un panel de 127 gènes de mouvements anormaux.

L'ADN des patients ainsi que de leurs deux parents dans les formes sporadiques ou de transmission autosomique récessive, ou de plusieurs membres symptomatiques de la famille dans les formes dominantes étaient disponibles. Ceci devait permettre d'effectuer un séquençage de l'exome en trio (parents et enfant) dans les formes sporadiques ou associées à un mode de transmission autosomique récessif et un séquençage de l'exome du plus grand nombre de membres de la famille symptomatiques dans les formes suivant un mode de transmission autosomique dominant.

## 2.1.2 Article 1

# Increased diagnostic yield in complex dystonia through exome sequencing

Thomas Wirth, Christine Tranchant, Nathalie Drouot, Boris Keren, Cyril Mignot, Laura Cif, Romain Lefaucheur, Laurence Lion-François, Aurélie Méneret, Domitille Gras, Emmanuel Roze, Cécile Laroche, Pierre Burbaud, Stéphanie Bannier, Ouhaïd Lagha-Boukbiza, Marie-Aude Spitz, Vincent Laugel, Matthieu Bereau, Emmanuelle Ollivier, Patrick Nitschke, Diane Doummar, Gabrielle Rudolf, Mathieu Anheim\*, Jamel Chelly\*

\* These authors contributed equally to this work and should be considered as co-last authors

**Publié dans Parkinsonism and related disorders, 2020**

## **Increased diagnostic yield in complex dystonia through exome sequencing**

Thomas Wirth (MD,Msc)<sup>1, 2, 3, 4</sup>; Christine Tranchant (MD,PhD)<sup>1, 3, 4</sup>; Nathalie Drouot (Msc)<sup>4</sup>; Boris Keren (MD,PhD)<sup>5</sup>; Cyril Mignot (MD,PhD)<sup>5, 6</sup>; Laura Cif (MD,PhD)<sup>7</sup>; Romain Lefaucheur (MD)<sup>8</sup>; Laurence Lion-François (MD)<sup>9</sup>; Aurélie Méneret (MD,PhD)<sup>6, 10</sup>; Domitille Gras (MD,PhD)<sup>11</sup>; Emmanuel Roze (MD,PhD)<sup>6, 10</sup>; Cécile Laroche (MD)<sup>12</sup>; Pierre Burbaud (MD,PhD)<sup>13</sup>; Stéphanie Bannier (MD)<sup>14</sup>; Ouhaïd Lagha-Boukbiza (MD)<sup>1</sup>; Marie-Aude Spitz (MD)<sup>15</sup>; Vincent Laugel (MD,PhD)<sup>15</sup>; Matthieu Bereau (MD)<sup>16</sup>; Emmanuelle Ollivier (MSc)<sup>18</sup>; Patrick Nitschke (MSc)<sup>18</sup>; Diane Doummar (MD)<sup>17</sup>; Gabrielle Rudolf (PhD)<sup>1, 3, 4</sup>; Mathieu Anheim\* (MD,PhD)<sup>1, 3, 4</sup>; Jamel Chelly\* (MD,PhD)<sup>3, 4, 19</sup>

1 Département de Neurologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

2 Unit of functional neurosurgery, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London, United Kingdom

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

4 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France.

5 APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Département de Génétique et de Cytogénétique; Centre de Référence Déficience Intellectuelle de Causes Rares; GRC UPMC «Déficience Intellectuelle et Autisme», Paris, France.

6 Faculté de Médecine de Sorbonne Université, INSERM, U 1127, CNRS UMR 7225, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, Paris, France.

7 Département de Neurochirurgie, Centre Hospitalier Régional Montpellier, Montpellier, France

8 Département de neurologie, Hôpitaux Universitaires de Rouen, Rouen, France

9 Service de Neuropédiatrie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

10 AP-HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Département de Neurologie, Paris, France.

11 Service de Neuropédiatrie, Hôpital Robert Debré, AP-HP, Paris, France

12 Département de pédiatrie, hôpital mère enfant, Limoges, France

13 CHU de Bordeaux, Service d'explorations fonctionnelles du système nerveux, Bordeaux, France.

14 Service de neurologie, Centre hospitalier de la Côte Basque, Bayonne, France

15 Service de pédiatrie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

16 Service de Neurologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Besançon, Besançon, France.

17 Service de Neuropédiatrie, CHU Paris Est-Hôpital Armand-Trousseau, Paris, France

18 Institut IMAGINE, IMAGINE Bioinformatics Platform, Université Paris Descartes, Paris, France

19 Laboratoire de Diagnostic Génétique, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

\*These authors contributed equally to this work and should be considered as co last-authors.

**Corresponding author information:**

**Dr Thomas WIRTH**

Present address:

Service de Neurologie

Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

1, avenue Molière

67098 Strasbourg

France

Phone : +33 (0)3 88 12 87 11

Fax : +33 (0)3 88 12 85 33

Email: [thomas.wirth@etu.unistra.fr](mailto:thomas.wirth@etu.unistra.fr)

- **Manuscript words count: 1722 words**
- **Number of figure : 0**
- **Number of tables : 2**
- **Number of references : 12**
- **Supplemental data: yes (4 tables, 1 figure)**

**Keywords:**

- 1) Dystonia
- 2) Next Generation Sequencing
- 3) Genetic diagnosis
- 4) Phenotype
- 5) Exome

## ABSTRACT

**Introduction:** A strategy based on targeted gene panel sequencing identifies possibly pathogenic variants in fewer than 20% of cases in early-onset and familial form of dystonia. By using Whole Exome Sequencing (WES), we aimed to identify the missing genetic causes in dystonic patients without diagnosis despite gene panel sequencing.

**Material and methods:** WES was applied to DNA samples from 32 patients with early-onset or familial dystonia investigated by sequencing of a 127 movement disorders-associated gene panel. Dystonia was described according to the familial history, body distribution, evolution pattern, age of onset, associated symptoms and associated movement disorders. Rate of diagnoses was evaluated for each clinical feature.

**Results:** We identified causative variants for 11 patients from 9 families in *CTNNA1*, *SUCLG1*, *NUS1*, *CNTNAP1*, *KCNB1*, *RELN*, *GNAO1*, *HIBCH*, *ADCK3* genes, yielding an overall diagnostic rate of 34.4%. Diagnostic yield was higher in complex dystonia compared to non-complex dystonia (66.7%-5.9%;  $p < 0.002$ ), especially in patients showing intellectual disability compared to the patients without intellectual disability (87.5%-16.7%;  $p < 0.002$ ).

**Conclusion:** Our approach suggests WES as an efficient tool to improve the diagnostic yield after gene panel sequencing in dystonia. Larger studies are warranted to confirm a potential genetic overlap between neurodevelopmental diseases and dystonia.



## **INTRODUCTION**

Dystonia displays a high level of clinical heterogeneity and can be associated with other clinical features to form complex phenotypes [1]. Due to the many genes reported in genetic forms of dystonia, molecular diagnosis is most of the time challenging. By assessing a 127 movement disorders (MDs) gene panel including 69 genes responsible for dystonia on a cohort of patients with early-onset or familial movement disorders, we showed that the diagnostic rate was significantly lower in patients experiencing dystonia as prominent symptom than in other movement disorders [2]. Since Whole Exome Sequencing (WES) was shown to improve the diagnostic yield following targeted gene panel sequencing in epileptic encephalopathy [3], we aimed to apply this strategy to identify the missing genetic causes in patients showing familial and/or early-onset dystonia without diagnosis following previous analysis with our 127 MDs gene panel.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Subjects**

The inclusion criteria were the following: i. patients with a phenotype characterized by prominent dystonia with an early-onset (defined as dystonia occurring before the age of 40) or with a family history (at least one first degree relative also affected with dystonia); ii. the lack of clinical findings or laboratory and imaging investigations suggestive of an acquired cause of dystonia. The same criteria were previously used to select the dystonic patients included in our gene panel study [2]. Additionally, we required for WES analysis: iii. the lack of genetic diagnosis following a 127 movement disorders gene panel analysis iv. availability of DNA samples from the patient and his two parents in sporadic and familial cases consistent with de novo event or autosomal recessive inheritance, or from at least two related patients coming

from two different generations in familial cases consistent with autosomal dominant inheritance.

All patients and asymptomatic family members were previously examined by a neurologist or a pediatrician experienced in movement disorders. Dystonia was subsequently characterized according to the axis I of the latest consensus for dystonia classification [4]. Dystonia could be classified as isolated or combined with another movement disorder (such as myoclonus, chorea or tic). In addition, following the recent recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force on the nomenclature of genetically determined dystonia [1], dystonia could be classified as complex when associated with relevant symptoms other than movement disorders (such as intellectual disability, epilepsy, ataxia, deafness) in opposition to non-complex dystonia. The study protocol was approved by the University Hospital of Strasbourg, France institutional review board. For all patients and unaffected parents, a written informed consent for genetic testing was obtained prior to WES analysis.

### **Exome sequencing, targeted gene sequencing and variation analysis**

Genomic DNA from peripheral blood samples was extracted according to standard procedures. An exome capture kit (SeqCap EZ Exome probes; Roche-NimbleGen) was used to target all exons. Exons capture was followed by massive parallel 150pb paired-end sequencing (Illumina, San Diego, CA, USA). Read mapping and variant calling were performed following standard bioinformatics procedures [5]. Filtering and prioritization of the variants were conducted using an in-house interactive Paris Descartes bioinformatics platform pipeline based on the Ensembl database (release 67). Variants were filtered according to their frequency (1%) against the dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), 1000 Genome Project (<http://www.internationalgenome.org/>), ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>) and GnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org/about>) databases. In silico prediction of variants

pathogenicity was performed using SIFT, PolyPhen and Mutation Taster. Cadd score was also integrated to the prioritization criteria, and a cutoff of 20 was used to determine deleteriousness. Variants were considered as causative if they fulfilled the following criteria: convincing sequencing quality (high number of reads) occurring in genes which are consistent with the phenotype and (1) known disease mutation reported in ClinVar and/or HGMD or (2) loss of function (Lof) variant occurring in genes intolerant to Lof according to the Exac database, or (3) missense variant predicted to be deleterious by at least 2 algorithms, very rare or absent in population databases. Fitting with the model of inheritance was also required to confirm pathogenicity. Variants were also classified according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) standards and guidelines [6]. Causative variants were confirmed by Sanger sequencing. All molecular diagnoses were discussed and validated by referring clinicians.

### **Statistical analysis**

Diagnostic yields were calculated for all clinical characteristics as the ratio of the number of patients presenting the clinical features and diagnosis of interest on the number of all patients presenting the characteristic. Comparisons between two groups were tested for statistical significance using a Fisher's exact for qualitative variable in small groups. Bonferroni correction for multiple comparison test was realized. Given an alpha risk of 0.05, *P*-values < 0.002 were considered statistically significant.

## **RESULTS**

### **Cohort description**

Between September 2014 and July 2018, DNA samples from 241 dystonic patients were obtained to perform Targeted Gene Panel analysis [2]. Causative variants were identified in 37 cases (Supplemental Table-1). In the group of 204 dystonic patients without a definite

molecular diagnosis, 32 patients from 24 families fulfilled study inclusion criteria. There was a male predominance in this cohort (sex-ratio 62.5%). Dystonia mean age of onset was 11.9 years, mean age at inclusion was 29 years. Fifteen patients from 7 families had a family history of dystonia and a single patient was born from a consanguineous union (See Supplemental Figure-1 for pedigrees of these families). Detailed phenotypes of these patients are available on Supplemental Table-2.

### **WES findings and rate of diagnosis**

Overall quality of generated sequencing data is illustrated by the average depth of sequencing of 104.16X and the mean coverage of 90.6% (>30X). We identified 11 causative variants in 9 genes, namely *CTNNB1*, *SUCLG1*, *NUS1*, *CNTNAP1*, *KCNB1*, *RELN*, *GNAO1*, *HIBCH*, and *ADCK3*, meeting the pathogenicity criteria in 11 patients from 9 families, establishing a molecular diagnosis for 34.4% of the patients. Pathogenic and likely pathogenic variants identified by WES are provided on Table-1.

We identified a statistically significant higher diagnostic yield in patients presenting with complex dystonia compared to patients with non-complex dystonia (66.7% vs 5.9%;  $p < 0.002$ ), especially in patients with intellectual disability compared to patients without intellectual disability (87.50% vs 12.5%;  $p < 0.002$ ).

We also observed a trend towards higher diagnostic yield in patients with pyramidal syndrome (75%) infancy-onset dystonia (60%), as compared to patients with a childhood (40%), adolescence (0%), or early-adulthood onset (12.5%). There was also a trend towards higher diagnostic yield in patients with generalized dystonia (66.67%) than in patients with focal (12.5%), multifocal (25%) or segmental dystonia (22.2%). Unlike complex dystonia, familial form of dystonia, combination with movement disorders or progressive course of the disease

were not associated with a higher rate of success. Details about diagnostic yields are provided on Table-2.

Additionally, we identified in the PMD70 family 3 segregating heterozygous missense variants in 3 different candidate genes (*SIP1L1*, *N4BP2*, and *VAMP8*) and a de novo missense variant in *ZNF594* in the PMD570 family, all meeting our pathogenicity criteria. We identified a *GNAOI* variant in the PMD409 family leading to a substitution of a highly conserved amino acid within the adenylate cyclase binding domain, but which was carried by an asymptomatic individual. We also isolated two compound heterozygous missense variants in *FMN2*, but which did not meet our pathogenicity criteria (see Supplemental Table-3).

For 14 patients from 11 families, no relevant variants were found.

## **DISCUSSION**

By using WES, we identified causative variants in known disease-causing genes in 10 out of 24 families included in our study, achieving a molecular diagnosis in 34.4% of patients. This result is close to diagnostic rates provided by WES in dystonia (Supplementary Table-4). Though the growing number of dystonia-related genes might have led to an early obsolescence of the panel which could explain the low diagnostic yield, it is important to mention that most pathogenic variants were identified in cases with complex dystonia especially when dystonia was associated with intellectual disability. No other clinical characteristics were significantly associated with a higher rate of success. Coherently, most of these causative variants were localized in genes previously associated with intellectual disability like *CTNNB1* [7] or *HIBCH* [8], or epileptic encephalopathy such as *KCNBI* [9]. While this statistical result is preliminary and require confirmation in a larger cohort, it suggests a potential genetic and pathophysiological overlap between dystonia and other neurodevelopmental diseases. These genes should be therefore carefully considered during future dystonia gene panels design, in order to adapt the

panels to complex dystonia and improve the rate of diagnosis. This finding also highlights the importance of a careful and comprehensive neurological examination of patients with dystonia selected for WES, so intellectual disability, or other neurological signs could be identified in order to facilitate the interpretation of genetic data.

Our study also has contributed to better delineate the phenotypic spectrum of several dystonia-related genes. De novo mutations in *GNAOI* had previously been isolated in patients showing childhood-onset epileptic encephalopathy or generalized dystonia with developmental delay [10]. Herein we identified a likely pathogenic *GNAOI* missense variants (C215Y) in a family showing milder phenotype consistent with autosomal dominant inherited dystonia. The variation led to highly conserved amino acid substitution considered to be damaging by all in silico pathogenicity prediction tools. This new mutation is located near previously reported mutations in patients showing prominent hyperkinetic movement disorders such as R209H or R209L. This result suggests that *GNAOI* mutations should be also searched for in autosomal dominant inherited dystonia. Additionally, we identified a de novo missense variant in *RELN* in a patient showing myoclonic dystonia. While few families showing autosomal dominant myoclonus-dystonia have been reported [11], the association between rare heterozygous *RELN* variant and dystonia remains currently controversial. This finding supports a potential implication of mutations located in this gene in such a phenotype. We also revisit the phenotype of *NUS1*-related encephalopathy to early-onset myoclonic dystonia with intellectual disability but without parkinsonism, epilepsy or cerebellar ataxia [12] thus expanding the spectrum of this dystonia-related gene. This finding also suggests that the clinical spectra of many neurodevelopmental disorder-associated genes are incompletely understood, and that dystonia may be more common than currently appreciated. Surprisingly, we did not identify patients carrying *KMT2B* variant, though it is recognized as one of the most common genetic causes of early onset generalized dystonia.

To conclude, our work highlights that WES used in an appropriate patient population can increase rate of mutation identification, improve molecular diagnosis of patients with complex dystonia and help to refine the phenotypes related to mutations in genes associated with dystonia or neurodevelopmental diseases.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to thank the patients and their families for participation in this study, Bernard JOST from the IGBMC Microarray and Sequencing Platform, the France Parkinson association and the Revue Neurologique for their support.

## **COMPETING INTERESTS**

T.W. received grants from the Revue Neurologique, the Fondation Planiol and the APTES organizations and travels funding from LVL medical; C.T. received honoraria from Allergan and Merz; A.M. received travel funding from Abbvie; E.R received received research support from Merz-Pharma, Orkyn, Aguetant, Elivie, Ipsen, Fondation Desmarest, AMADYS, Agence Nationale de la Recherche and Fonds de Dotation Brou de Laurière; has served on scientific advisory boards for Orkyn, Aguetant, Merz-Pharma and has received honoraria from Orkyn, Aguetant, Merz-Pharma, and Medday-Pharma; S.B. received honoraria from Aguetant and Orkyn and travel funding from Ellivie, Ipsen and Aguetant; V.L. is member of the scientific board of the AFM-Telethon, and received honoraria from PTC Therapeutics, Sarepta Therapeutics, Biogen France SAS, AveXis Inc; M. A. received honoraria from Teva, Merz, AbbVie, Actelion, Johnson and Johnson, Aguetant, Orkyn, LVL, Elivie. N.D, B.K, C.M., L.C, R.L, L.L-F., A.G., C.L., P.B., O.L-B., M-A.S., M.B., E.O., P.N., D.D., G.R., J.C. declare no conflict of interest.

## FUNDING/SUPPORT

The study has been supported by a grant provided by France Parkinson. Thomas WIRTH was funded by a grant from the Revue Neurologique for this work.

## REFERENCES

- [1] C. Marras, A. Lang, B.P. van de Warrenburg, C.M. Sue, S.J. Tabrizi, L. Bertram, S. Mercimek-Mahmutoglu, D. Ebrahimi-Fakhari, T.T. Warner, A. Durr, B. Assmann, K. Lohmann, V. Kostic, C. Klein, Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force, *Mov. Disord.* 31 (2016) 436–457. <https://doi.org/10.1002/mds.26527>.
- [2] S. Montaut, C. Tranchant, N. Drouot, G. Rudolf, C. Guissart, J. Tarabeux, T. Stemmelen, A. Velt, C. Fourrage, P. Nitschké, B. Gerard, J.-L. Mandel, M. Koenig, J. Chelly, M. Anheim, French Parkinson's and Movement Disorders Consortium, Assessment of a Targeted Gene Panel for Identification of Genes Associated With Movement Disorders, *JAMA Neurol.* (2018). <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.1478>.
- [3] S. Dimassi, A. Labalme, D. Ville, A. Calender, C. Mignot, N. Boutry-Kryza, J. de Bellescize, C. Rivier-Ringenbach, E. Bourel-Ponchel, D. Cheillan, T. Simonet, K. Maincent, M. Rossi, M. Till, S. Mougou-Zerelli, P. Edery, A. Saad, D. Heron, V. des Portes, D. Sanlaville, G. Lesca, Whole-exome sequencing improves the diagnosis yield in sporadic infantile spasm syndrome, *Clin. Genet.* 89 (2016) 198–204. <https://doi.org/10.1111/cge.12636>.
- [4] A. Albanese, K. Bhatia, S.B. Bressman, M.R. DeLong, S. Fahn, V.S.C. Fung, M. Hallett, J. Jankovic, H.A. Jinnah, C. Klein, A.E. Lang, J.W. Mink, J.K. Teller, Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update, *Mov. Disord.* 28 (2013) 863–873. <https://doi.org/10.1002/mds.25475>.
- [5] K. Poirier, N. Lebrun, L. Broix, G. Tian, Y. Saillour, C. Boscheron, E. Parrini, S. Valence, B.S. Pierre, M. Oger, D. Lacombe, D. Geneviève, E. Fontana, F. Darra, C. Cances, M. Barth, D. Bonneau, B.D. Bernadina, S. N'guyen, C. Gitiaux, P. Parent, V. des Portes, J.M. Pedespan, V. Legrez, L. Castelnau-Ptakine, P. Nitschke, T. Hieu, C. Masson, D. Zelenika, A. Andrieux, F. Francis, R. Guerrini, N.J. Cowan, N. Bahi-Buisson, J. Chelly, Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly, *Nat. Genet.* 45 (2013) 639–647. <https://doi.org/10.1038/ng.2613>.
- [6] S. Richards, N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W.W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H.L. Rehm, Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, *Genet Med.* 17 (2015) 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
- [7] D. Grozeva, K. Carss, O. Spasic-Boskovic, M.-I. Tejada, J. Gecz, M. Shaw, M. Corbett, E. Haan, E. Thompson, K. Friend, Z. Hussain, A. Hackett, M. Field, A. Renieri, R. Stevenson, C. Schwartz, J.A.B. Floyd, J. Bentham, C. Cosgrove, B. Keavney, S. Bhattacharya, Italian X-linked Mental Retardation Project, UK10K Consortium, GOLD Consortium, M. Hurles, F.L. Raymond, Targeted Next-Generation Sequencing Analysis of 1,000 Individuals with Intellectual Disability, *Hum. Mutat.* 36 (2015) 1197–1204. <https://doi.org/10.1002/humu.22901>.
- [8] G. Schottmann, A. Sarpong, C. Lorenz, N. Weinhold, E. Gill, L. Teschner, S. Ferdinandusse, R.J.A. Wanders, A. Prigione, M. Schuelke, A movement disorder with dystonia and ataxia caused by a mutation in the HIBCH gene, *Mov. Disord.* 31 (2016) 1733–1739. <https://doi.org/10.1002/mds.26704>.
- [9] C.G.F. de Kovel, S. Syrbe, E.H. Brilstra, N. Verbeek, B. Kerr, H. Dubbs, A. Bayat, S. Desai, S. Naidu, S. Srivastava, H. Cagaylan, U. Yis, C. Saunders, M. Rook, S. Plugge, H. Muhle, Z. Afawi, K.-M. Klein, V. Jayaraman, R. Rajagopalan, E. Goldberg, E. Marsh, S. Kessler, C. Bergqvist, L.K. Conlin, B.L.



Krok, I. Thiffault, M. Pendziwiat, I. Helbig, T. Polster, I. Borggraefe, J.R. Lemke, M.-J. van den Boogaardt, R.S. Møller, B.P.C. Koeleman, Neurodevelopmental Disorders Caused by De Novo Variants in KCNB1 Genotypes and Phenotypes, *JAMA Neurol.* 74 (2017) 1228–1236. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.1714>.

[10] H. Saitsu, R. Fukai, B. Ben-Zeev, Y. Sakai, M. Mimaki, N. Okamoto, Y. Suzuki, Y. Monden, H. Saito, B. Tziperman, M. Torio, S. Akamine, N. Takahashi, H. Osaka, T. Yamagata, K. Nakamura, Y. Tsurusaki, M. Nakashima, N. Miyake, M. Shiina, K. Ogata, N. Matsumoto, Phenotypic spectrum of GNAO1 variants: epileptic encephalopathy to involuntary movements with severe developmental delay, *Eur. J. Hum. Genet.* 24 (2016) 129–134. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.92>.

[11] J.L. Groen, K. Ritz, H. Jalalzadeh, S.M.A. van der Salm, A. Jongejan, O.R. Mook, M.A. Haagmans, A.H. Zwinderman, M.M. Motazacker, R.C. Hennekam, F. Baas, M.A.J. Tijssen, RELN rare variants in myoclonus-dystonia, *Mov. Disord.* 30 (2015) 415–419. <https://doi.org/10.1002/mds.26070>.

[12] F.F. Hamdan, C.T. Myers, P. Cossette, P. Lemay, D. Spiegelman, A.D. Laporte, C. Nassif, O. Diallo, J. Monlong, M. Cadieux-Dion, S. Dobrzyniecka, C. Meloche, K. Retterer, M.T. Cho, J.A. Rosenfeld, W. Bi, C. Massicotte, M. Miguët, L. Brunga, B.M. Regan, K. Mo, C. Tam, A. Schneider, G. Hollingsworth, Deciphering Developmental Disorders Study, D.R. FitzPatrick, A. Donaldson, N. Canham, E. Blair, B. Kerr, A.E. Fry, R.H. Thomas, J. Shelagh, J.A. Hurst, H. Brittain, M. Blyth, R.R. Lebel, E.H. Gerkes, L. Davis-Keppen, Q. Stein, W.K. Chung, S.J. Dorison, P.J. Benke, E. Fassi, N. Corsten-Janssen, E.-J. Kamsteeg, F.T. Mau-Them, A.-L. Bruel, A. Verloes, K. Öunap, M.H. Wojcik, D.V.F. Albert, S. Venkateswaran, T. Ware, D. Jones, Y.-C. Liu, S.S. Mohammad, P. Bizargity, C.A. Bacino, V. Leuzzi, S. Martinelli, B. Dallapiccola, M. Tartaglia, L. Blumkin, K.J. Wierenga, G. Purcarin, J.J. O’Byrne, S. Stockler, A. Lehman, B. Keren, M.-C. Nougues, C. Mignot, S. Auvin, C. Nava, S.M. Hiatt, M. Bebin, Y. Shao, F. Scaglia, S.R. Lalani, R.E. Frye, I.T. Jarjour, S. Jacques, R.-M. Boucher, E. Riou, M. Srour, L. Carmant, A. Lortie, P. Major, P. Diadori, F. Dubeau, G. D’Anjou, G. Bourque, S.F. Berkovic, L.G. Sadleir, P.M. Campeau, Z. Kibar, R.G. Lafrenière, S.L. Girard, S. Mercimek-Mahmutoglu, C. Boelman, G.A. Rouleau, I.E. Scheffer, H.C. Mefford, D.M. Andrade, E. Rossignol, B.A. Minassian, J.L. Michaud, High Rate of Recurrent De Novo Mutations in Developmental and Epileptic Encephalopathies, *Am. J. Hum. Genet.* 101 (2017) 664–685. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.09.008>.

**Table 1: Causative variants identified by whole exome sequencing**

Identity	Gender	Age of onset	Age at inclusion	Familial history	Phenotype	Brain MRI	Inheritance	Gene	Refseq	Variation	POLYPHEN	SIFT	Mutation taster	Cadd score	ACMG criteria	Clinical Significance
PMD50	M	6 months	19 years	No	Multifocal non progressive dystonia, pyramidal syndrome, severe ID	Normal	de novo	CTNNA1	NM_001098209	3_41275708_C_T; c.1603C>T; p.R535* <sub>htz</sub> (#)	Probably Damaging (score: -)	Deleterious (score: -)	Disease causing	40	PVS1, PS2	Pathogenic
PMD72	M	2 years	26 years	Consanguinity	Slowly progressive generalized dystonia, pyramidal syndrome, cerebellar syndrome, deafness	T2 basal ganglia hypersignal	AR	SUCLG1	NM_003849	2_84668200_G_C; c.560C>G; p.P187R <sub>htz</sub>	Probably Damaging (score: 0.981)	Deleterious (score: 0)	Disease causing	27,9	PM1, PM2, PP2, PP3, PP4	Likely pathogenic
PMD97	M	20 months	5 years	No	Segmental non progressive dystonia of lower limbs without epilepsy, moderate ID	Right pallidum T2 hypersignal	de novo	KCNB1	NM_004975	20_47990871_A_G; c.1226T>C; p.L409T <sub>htz</sub>	Probably Damaging (score: 1)	Deleterious (score: 0)	Disease causing	26,5	PS2, PM1, PM2, PP2, PP3	Pathogenic
PMD194	M	7 years	28 years	No	Segmental non progressive dystonia of upper limbs, myoclonus, tremor, mild ID	Normal	de novo	NUS1	NM_138459	6_117997138_G_A; c.305G>A; p.G102D <sub>htz</sub>	Probably Damaging (score: 0.951)	Deleterious (score: 0)	Disease causing	29,0	PS2, PM2, PP3	Likely pathogenic
PMD220	M	Birth	5 years	Brother affected	Non progressive generalized dystonia, pyramidal syndrome, profound ID	White matter rarefaction delayed myelination thin corpus callosum	AR (compound)	CNTNAP1	NM_003632	17_40840944_T_C; c.1507T>C; p.F503L <sub>htz</sub>	Benign (score: 0.046)	Deleterious (score: 0)	Disease causing	32	PM1, PM2, PP1, PP2, PP3, PP4	Likely pathogenic
PMD221	M	Birth	9 months	Brother affected	Non progressive generalized dystonia, profound ID	White matter rarefaction thin corpus callosum	AR (compound)	CNTNAP1	NM_003632	17_40842124_G_A; c.1754G>A; p.C585Y <sub>htz</sub>	Probably Damaging (score: 0.969)	Deleterious (score: 0)	Disease causing	24,1	PM1, PM2, PP1, PP2, PP3, PP4	Likely pathogenic
PMD294	M	26 years	29 years	No	Non progressive right upper limb dystonia, myoclonus, epilepsy, pyramidal syndrome, mild ID	Normal	de novo	RELN	NM_005045	17_40840944_T_C; c.1507T>C; p.F503L <sub>htz</sub>	Benign (score: 0.046)	Deleterious (score: 0)	Disease causing	32	PM1, PM2, PP1, PP2, PP3, PP4	Likely pathogenic
PMD466	F	12 years	33 years	No	Slowly progressive generalized dystonia, cerebellar ataxia	Cerebellar atrophy	AR (compound)	ADCK3	NM_020247	7_103191557_A_G; c.6259T>C; p.W2087R <sub>htz</sub>	Probably Damaging (score: 0.969)	Deleterious (score: 0)	Disease causing	24,1	PM1, PM2, PP1, PP2, PP3, PP4	Likely pathogenic
PMD479	M	3 years	31 years	Mother affected	Non progressive generalized dystonia, myoclonus, mild ID	Normal	AD	GNAO1	NM_020988	1_227152967_AC_A; c.444delC <sub>htz</sub>	Probably Damaging (score: 1)	Deleterious (score: 0)	Disease causing	28,6	PS2, PM2, PP3	Likely pathogenic
PMD479 Mo	F	5 years	66 years	Son affected	Non progressive generalized dystonia, myoclonus, pyramidal syndrome	Not realised	AD	GNAO1	NM_020988	16_56370693_G_A; c.644G>A; p.C215Y <sub>htz</sub>	Probably Damaging (score: 0.998)	Deleterious (score: 0)	Disease causing	25,3	PM1, PM2, PM3, PP3, PP4	Likely pathogenic
PMD495	M	2 years	2 years	No	Paroxysmal right hemidystonia	T2 basal ganglia hypersignal	AR	HIBCH	NM_014362	2_191077780_T_C; c.913A>G; p.T305A <sub>htz</sub> (##)	Benign (score: 0.285)	Benign (score: 0.05)	Disease causing	29,1	PS2, PM1, PM2, PP2, PP3	Pathogenic

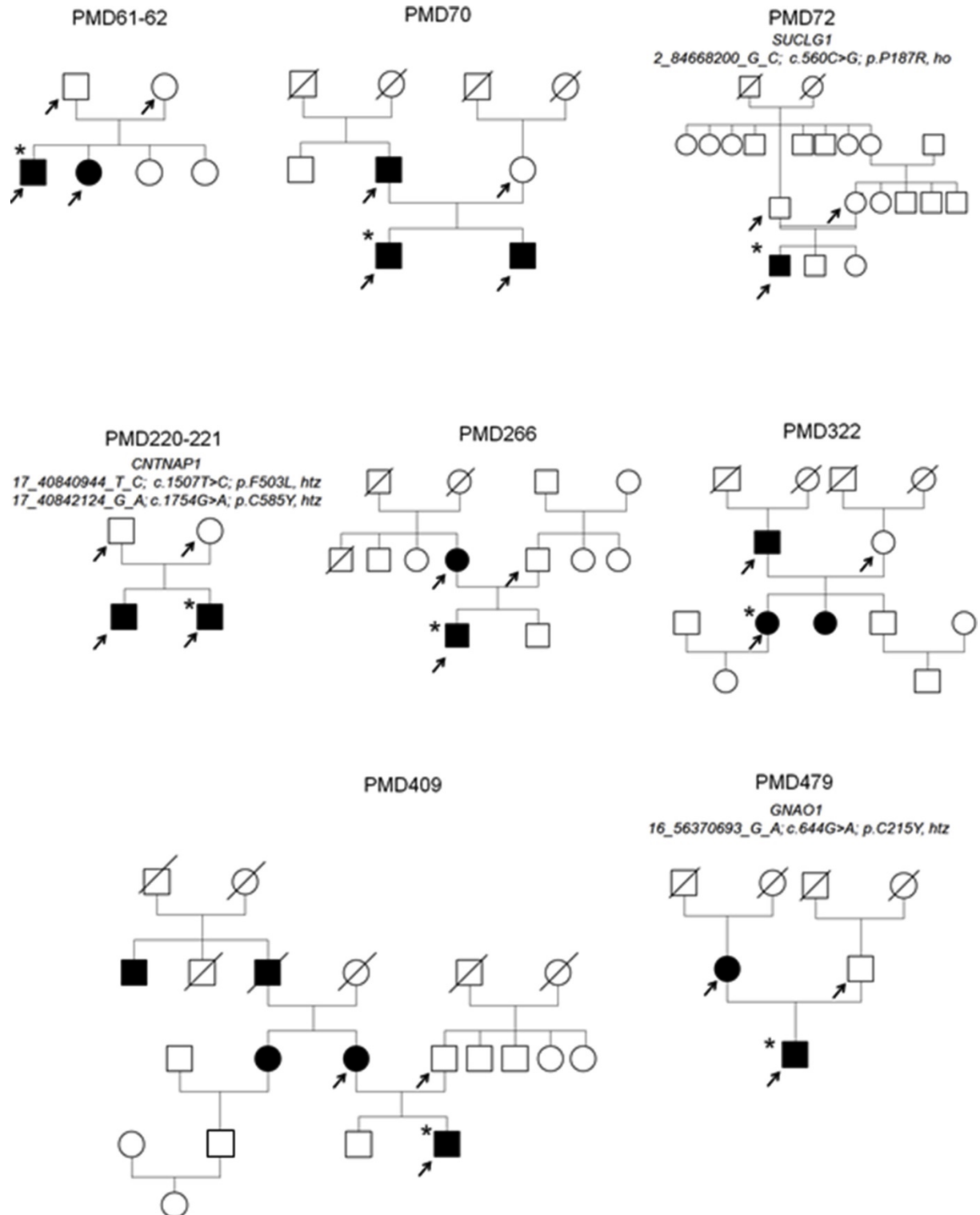
Abbreviations: ho: homozygous, htz: heterozygous, hmvz: hemizygous, AR: autosomal recessive, AD: autosomal dominant, compound: compound heterozygous, ACMG : American College of Medical Genetics and Genomics, MIM mendelian Inheritance in Man, (#) reported likely pathogenic [7]; (##) reported pathogenic [8].

**Table 2: Diagnostic rate of success according to the clinical characteristics of dystonia**

	Characteristics	Number of patients	Patients with a genetic diagnosis	Corresponding diagnostic yields	p value	
Associated movement disorders	Isolated dystonia	22	7	31.8%	0.70	
	Dystonia combined with other movement disorders	10	4	40%		
		Myoclonus	9	4	44.4%	0.68
		Without myoclonus	23	7	30.4%	
		Chorea	1	0	0%	1
		Without chorea	31	11	35.5%	
		Tic	1	1	100%	
	Without tic	31	10	32.2%	0.34	
Associated clinical features	Non complex dystonia	17	1	5.9%	0.0005	
	Complex dystonia associated with other clinical features	15	10	66.7%		
		Intellectual disability	8	7	87.5%	0.0007
		Without intellectual disability	24	4	16.7%	
		Pyramidal syndrome	8	6	75%	0.009
		Without pyramidal syndrome	24	5	20.8%	
		Cerebellar ataxia	2	2	100%	0.11
		Without cerebellar ataxia	30	9	30%	
		Deafness	1	1	100%	0.34
		Without deafness	31	10	32.2%	
		Epilepsy	1	1	100%	0.34
		Without epilepsy	31	10	32.2%	
		Oculomotor impairment	3	0	0%	0.53
		Without oculomotor impairment	29	11	37.9%	
Growth delay	1	0	0%	1		
Without growth delay	31	11	35.5%			
Body distribution	Focal	8	1	12.5%	0.21	
	Non-focal	24	10	41.6%		
	Segmental	9	2	22.2%	0.42	
	Non-segmental	23	9	39.1%		
	Multifocal	4	1	25%	1	
	Non-multifocal	28	10	35.7%		
	Generalized	9	6	66.7%	0.035	
	Non-generalized	23	5	21.7%		
	Hemidystonia	2	1	50%	1	
Non-hemidystonia	30	10	33.3%			
Temporal pattern	Progressive	6	2	33.3%	1	
	Non progressive	26	9	34.6%		
	Paroxysmal	2	1	50%	1	
	Non paroxysmal	30	10	33.3%		
Age of onset	Infancy 0-2	10	6	60%	0.06	
	Onset after 2	22	5	22.7%		
	Childhood 3-12	10	4	40%	0.70	
	Onset before 3 or after 12	22	7	31.8%		
	Adolescence 13-20	3	0	0%	0.53	
	Onset before 13 or after 20	29	11	37.9%		
	Early adulthood 21-40	8	1	12.5%	0.1	
	Onset after 40 or before 21	24	10	41.6%		
	Late adulthood (> 40)	1	0	0%	1	
Onset before 40	31	11	35.5%			
Familial history of dystonia or consanguinity	Absence	16	6	37.5%	1	
	Presence	16	5	31.2%		

**Supplemental Figure-1: Pedigrees of familial dystonia cases.**

Black arrows identify patients and relatives analyzed by WES. Stars identify the probands. Causative variations identified by WES are indicated below the family number. Abbreviations: ho: homozygous, htz: heterozygous



## Supplemental Table-1: Causative variants identified by targeted gene panel sequencing

Identity	Sex	Age of onset	Familial history	Phenotype	Gene	Variation	ClinVar
PMD13	M	7	No	Isolated generalized dystonia	ADCY5	NM_183357; c.2159T>C; p.L720P, htz	Not reported
PMD20	F	22	Yes (father and half-brother)	Dopa responsive dystonia	GCH1	NM_000161; c.671A>G; p.K224R, htz	Reported
PMD53	F	1	No	Myoclonic dystonia with microcephaly and dysmorphic features	MECP2	NM_001110792; c.433C>T; p.R145C, htz	Not reported
PMD73	M	2	Consanguinity	Acute generalized dystonia with status epilepticus and pyramidal syndrome	SUOX	NM_001032387; c.1376G>A; p.R459Q, ho	Not reported
PMD82	F	23	Consanguinity	Isolated task specific dystonia (lower limb)	PARK2	NM_004562; c.101_102delAG; Q34-, ho	Not reported
PMD83	M	14	Consanguinity	Isolated task specific dystonia (lower limb)	PARK2	NM_004562; c.101_102delAG; p.Q34-, ho	Not reported
PMD85	F	?	?	Isolated generalized dystonia	GNAL	NM_182978; c.911-2A>G, htz	Not reported
PMD96	F	9	Father	Isolated and permanent segmental dystonia of the lower limb	TOR1A	NM_000113; c.907_909delGAG, p.E303-, htz	Reported
PMD138	F	7	Yes	Dopa responsive segmental dystonia of the lower limb	GCH1	NM_000161; c.250G>A; p.E84K, htz	Not reported
PMD146	M	20	No	Dystonia parkinsonism	PARK2	Deletion of exons 2, 3, 4 and 5, ho	Not reported
PMD201	F	0	No	Dystonia affecting lower limb, face and neck, epilepsy, pyramidal syndrome and oculomotor impairment	SLC2A1	NM_006516; c.844C>T; p.Q282*, htz	Not reported
PMD202	M	30	No	Dystonia, pyramidal syndrome	ATP13A2	NM_022089; c.2412G>A; p.K804K, htz	Not reported
						NM_022089; c.2494A>G, I832V, htz	Not reported
PMD262	M	24	No	Generalized dystonia, neuropathy, optic atrophy, striatum atrophy on MRI	SERAC1	NM_032861; c.1348_1349insTATC, InsLS450, htz	Not reported
						NM_032861; c.1598C>T, P533L, htz	Not reported
PMD290	M	2	Yes, Brother	Dystonia, chorea, myoclonia, ataxia	NKX2-1	NM_001079668; c.745C>T; Q249X, htz	Reported
PMD298	M	2	No	Dystonia deafness, striatum atrophy	TIMM8A	NM_004085; c.132+1G>C, ho	Not reported
PMD299	M	4	No	Dystonia, epilepsy, ataxia	PRKCG	NM_002739; c.1040A>G; p.H347R, htz	Not reported
PMD303	M	8	No	Isolated segmental and dopa responsive cervical dystonia	GCH1	NM_000161; c.343+1G>A, htz	Not reported
PMD396	F	6	Consanguinity	Generalized dystonia, myoclonia	PRKRA	NM_003690; c.665C>T; p.P222L, ho	Reported
PMD397	F	3	Consanguinity	Dystonia, myoclonia	PRKRA	NM_003690; c.665C>T; p.P222L, ho	Reported
ADN171143	F	2	No	Dystonia	ANO3	NM_001313726.1; c.2977G>A, p.Ala993Th, htz	Not reported
SGT171930	F	1	No	Dystonia, behavioral troubles, cerebellar atrophy on MRI	NOL3	NM_001185058; c.238G>A; p.A80TS, htz	Reported
SGT171933	F	11	No	Dystonia, tic, cognitive impairment, cerebellar atrophy on MRI	SYNJ1	NM_003895.3; c.2307T>G; p.D769E, htz	Not reported
						NM_003895.3; c.2395C>A; p.L799I, htz	Not reported
SGT171951	M	2	Yes, brother	Generalized dystonia	HPRT1	Deletion of exons 7,8,9, hnz	Not reported
SGT172065	M	10	No	Dystonia, myoclonia	ANO3	NM_001313726.1; c.1943A>G; p.N648S, htz	Not reported
SGT173203	F	14	No	Progressive right lateralized dystonia	ATP1A3	NM_152296.4; c.1838C>T; p.T613M, htz	Reported
SGT173288	M	2	No	Multifocal dystonia involving the 4 limb and the face	SYNJ1	NM_003895.3; c.3404A>C; p.Q1135P, ho	Not reported
SGT173350	M	0,5	No	Dystonia, chorea, hypotonia	ADCY5	NM_183357; c.1252C>T; p.R418W, htz	Reported
SGT173613	F	16	Yes	Dystonia, myoclonia, cerebellar syndrome	ANO3	NM_001313726.1; c.1820T>C; p.I607T, htz	Not reported
SGT173690	F	1	?	Generalized dystonia	GCH1	NM_001024024.1; c.509+3A>G, htz	Reported
SGT172547	F	12	Yes	Dystonia, myoclonia, cerebellar syndrome	ANO3	NM_001313726.1; c.1820T>C; p.I607T, htz	Not reported
SGT172706	F	1	No	Dystonia, behavioral troubles	ADCY5	NM_183357; c.2088+2T>G, htz	Not reported
SGT172974	F	15	No	Dopa sensitive dystonia	KCNMA1	NM_001161352.2; c.77G>A; p.S26N, htz	Not reported
SGT173015	F	0,5	No	Progressive dystonia with hypotonia, striatum atrophy on MRI	SLC1A3	NM_004172.4; c.1617A>C; p.E539D, htz	Not reported
ASG173063	M	0	No	Dystonia, tonic spasm	ADCY5	NM_183357.2; c.82C>T; p.H28Y, htz	Not reported
SGT176395	F	17	Yes, mother	Generalized dystonia with prominent cervical and oro-mandibular involvement	GNAL	NM_182978; c.652T>C, p.W218R, htz	Not reported
SGT181024	M	?	?	Dystonia	GNAL	Whole deletion of GNAL, htz	Not reported
SGT182358	M	46	No	Isolated focal cervical dystonia	GCH1	NM_001024024.1; c.671A>G; p.K244R, htz	Reported

Abbreviations: ho: homozygous, htz: heterozygous, hnz: hemizygous

**Supplementary Table-2: Phenotypes of the 32 patients included in the study**

Identity	Sex	Age at dystonia onset	Age at inclusion (years)	Family history	Consanguinity	Dystonia characteristics	Associated movement disorders	Associated clinical features	Peculiar Brain MRI findings
PMD10	F	1 year	15	-	-	Segmental non progressive upper limb dystonia	Myoclonus	No	-
PMD17	F	25 years	34	-	-	Generalized progressive dystonia	No	Oculomotor impairment	-
PMD50	M	6 months	19	-	-	Multifocal non progressive dystonia	No	Pyramidal syndrome, severe intellectual disability	-
PMD61	F	28 years	32	+	-	Focal cervical non progressive dystonia	No	No	-
PMD62	M	22 years	29	+	-	Focal cervical non progressive dystonia	No	No	-
PMD70	M	12 years	51	+	-	Generalized progressive dystonia	Myoclonus	Pyramidal syndrome, oculomotor impairment	Global cortical atrophy
PMD70-Fa	M	11 years	78	+	-	Segmental non progressive dystonia	No	No	Not realized
PMD70-Bro	M	22 years	51	+	-	Segmental non progressive dystonia	No	No	Not realized
PMD72	M	2 years	26	-	+	Generalized progressive dystonia	No	Deafness, pyramidal syndrome, cerebellar ataxia	Basal ganglia T2 hypersignals
PMD97	M	20 months	5	-	-	Segmental non progressive dystonia of lower limbs	No	Moderate intellectual disability	Right pallidum T2 hypersignal
PMD98	F	Neonatal	12	-	-	Generalized non progressive dystonia	Chorea	Mild intellectual disability, oculomotor impairment	-
PMD194	M	7 years	28	-	-	Segmental non progressive dystonia of upper limb	Myoclonus, tic	Mild intellectual disability	-
PMD220	M	Neonatal	5	+	-	Non progressive generalized dystonia	No	Global development delay, Pyramidal syndrome	Cerebral white matter rarefaction, delayed myelination, thin corpus callosum
PMD221	M	Neonatal	0.75	+	-	Non progressive generalized dystonia	No	Global development delay, Pyramidal syndrome	Cerebral white matter rarefaction, thin corpus callosum
PMD252	M	4 years	27	-	-	Progressive segmental dystonia	Myoclonus	No	-
PMD266	M	14 years	29	+	-	Multifocal non progressive dystonia	Myoclonus	No	-
PMD266-Mo	F	4 years	61	+	-	Segmental non progressive dystonia	No	No	-
PMD294	M	26 years	29	-	-	Focal non progressive dystonia	Myoclonus	Pyramidal syndrome, mild intellectual disability, epilepsy	-
PMD305	F	16 years	18	-	-	Focal task specific non progressive dystonia	No	No	-
PMD321	F	25 years	44	-	-	Focal cervical non progressive dystonia	No	No	-
PMD322	F	34 years	37	-	-	Focal cervical non progressive dystonia	No	No	-
PMD358	F	24 years	34	+	-	Non progressive segmental dystonia of lower limbs	No	Pyramidal syndrome	-
PMD358-Fa	M	10 years	68	+	-	Non progressive focal cervical dystonia	No	No	-
PMD388	M	4 years	4	-	-	Multifocal progressive dystonia	Myoclonus	No	-
PMD409	M	15 years	24	+	-	Isolated non progressive segmental dystonia	No	No	-
PMD409-Mo	F	47 years	53	+	-	Isolated non progressive focal cervical dystonia	No	No	Not realized
PMD466	F	12 years	33	-	-	Progressive generalized dystonia	No	Cerebellar ataxia	Cerebellar atrophy
PMD479	M	3 years	31	+	-	Generalized non progressive dystonia	Myoclonus	Intellectual disability	-
PMD479-Mo	F	5 year	66	+	-	Generalized non progressive dystonia	Myoclonus	Pyramidal syndrome	-
PMD495	M	15 months	2	-	-	Paroxysmal non progressive hemidystonia	No	No	Basal ganglia T2 hypersignals
PMD598	M	2 years	10	-	-	Multifocal non progressive dopa responsive dystonia	No	No	-
PMD599	M	2 years	10	-	-	Paroxysmal non progressive hemidystonia	No	Growth delay	Basal ganglia iron deposits and calcifications

Abbreviations: Fa: father, Mo: Mother

**Supplementary Table-3: Variants of unknown significance**

Identity	Inheritance	Gene	Refseq	Variation	Allele frequency in Exac european	ClinVar	HGMD	POLYPHEN	SIFT	Mutation taster	Cadd score	Clinical Significance
PMD70 PMD70Fa PMD70Bro	AD	VAMP8	NM_003761.4	2_85808784_T_C; c.248T>C; p.I83T, htz	0	Not reported	Not reported	Benign (score: 0.057)	Benign (score: 0.15)	Disease causing	20	Unknown signification
	AD	N4BP2	NM_018177.4	4_40115118_G_A; c.1654G>A; p.E552K, htz	0	Not reported	Not reported	Possibly Damaging (score: 0.901)	Deleterious (score: 0)	Disease causing	33	Unknown signification
	AD	SIPA1L1	NM_015556.1	14_72171453_G_A; c.3662G>A; p.G1221E, htz	0	Not reported	Not reported	Benign (score: 0.003)	Benign (score: 0.25)	Disease causing	24.9	Unknown signification
PMD321	AR	FMN2	NM_001305424.2	1_240371558_T_C; c.3446T>C; p.V1149A; htz	0.000841	Not reported	Not reported	/	Benign (score: 0.4)	Polymorphism	0.8	Unknown signification
				1_240371711_C_G; c.3599C>G; p.P1220R; htz	0	Not reported	Not reported	/	Benign (score: 0.14)	Disease causing	11.6	Disease causing
PMD599	de novo	ZNF574	NM_001330519.1	19_42583434_C_G; c.676C>G; p.P226A; htz	0	Not reported	Not reported	Probably Damaging (score: 0.945)	Deleterious (score: 0.04)	Disease causing	24.2	Unknown signification
PMD409 PMD409Mo	AD	GNAO1	NM_020988	16_56370666_G_A; c.617G>A; p.R206Q, htz	0	Not reported	Not reported	Probably Damaging (score: 1)	Deleterious (score: 0)	Disease causing	33	Unknown signification

Abbreviations: htz: heterozygous, AD: autosomal dominant, AR: autosomal recessive

**Supplementary 4: Review of the previous Next Generation Sequencing studies in Dystonia**

	Strategy used	Previous analysis	Inclusion criteria	Other characteristics	Number of patients included	Diagnostic rate
Carecchio et al. (1)	Exome sequencing	Gene panel sequencing including 67 genes associated with dystonia	Childhood-onset dystonia (before 18 years of age)	/	65	24.6%
Kumar et al. (2)	Genome sequencing	None	Dystonia as prominent phenotypic feature	/	111	11.7%
Ma et al. (3)	Gene panel sequencing	None	Dystonia as prominent phenotypic feature	Panel analyzed 148 genes associated with dystonia	65	24.6%
Montaut et al. (4)	Gene panel sequencing	38% of patients had undergone genetic testing before inclusion in the study	Early-onset (before 40 years of age) or familial form of movement disorders (including dystonia)	Panel analyzed 127 Movement Disorders associated genes including 69 genes associated with dystonia	135	15.6%
Powis et al. (5)	Exome sequencing	12.7% of patients had a previous dystonia-related gene testing	Dystonia as part of the phenotype	/	189	20.2%
Reale et al. (6)	Gene panel sequencing	<i>TOR1A</i> GAG deletion, <i>PANK2</i> and <i>PLA2G6</i> sequencing for all patient	Dystonia as part of the phenotype	Panel analyzed 30 genes associated with dystonia among 65 genes associated with Movement disorders	114	8.8%
van Egmond et al. (7)	Gene panel sequencing	None	Onset of dystonia before the age of 40 years or positive family history or dystonia combined with another movement disorder or co-occurrence of other unexplained neurological or systemic manifestations or paroxysmal dystonia or laryngeal dystonia	Panel analyzed 94 dystonia associated genes	61	14.8%
Wirth et al. (present study)	Exome sequencing	Gene panel sequencing including 69 genes associated with dystonia	Early-onset (before 40 years of age) or familial form of dystonia	Family based (required availability of relatives' DNA)	32	34.4%
Zech et al. (8)	Exome sequencing	None	Early-onset generalized dystonia (before 30 years of age)	Family based (required availability of relatives' DNA)	16	37.5%
Zech et al. (9)	Exome sequencing	All cases underwent different gene panel testing before being included in the study	Combined or Complex dystonia	/	13	69.2%



## **References**

- [1] M. Carecchio, F. Invernizzi, P. González-Latapi, C. Panteghini, G. Zorzi, L. Romito, V. Leuzzi, S. Galosi, C. Reale, F. Zibordi, A.P. Joseph, M. Topf, C. Piano, A.R. Bentivoglio, F. Girotti, P. Morana, B. Morana, M.A. Kurian, B. Garavaglia, N.E. Mencacci, S.J. Lubbe, N. Nardocci, Frequency and phenotypic spectrum of KMT2B dystonia in childhood: A single-center cohort study, *Mov. Disord.* 34 (2019) 1516–1527. <https://doi.org/10.1002/mds.27771>.
- [2] K.R. Kumar, R.L. Davis, M.C. Tchan, G.M. Wali, N. Mahant, K. Ng, K. Kotschet, S.-F. Siow, J. Gu, Z. Walls, C. Kang, G. Wali, S. Levy, C.S. Phua, C. Yiannikas, P. Darveniza, F.C.F. Chang, H. Morales-Briceño, D.B. Rowe, A. Drew, V. Gayevskiy, M.J. Cowley, A.E. Minoche, S. Tisch, M. Hayes, S. Kummerfeld, V.S.C. Fung, C.M. Sue, Whole genome sequencing for the genetic diagnosis of heterogenous dystonia phenotypes, *Parkinsonism & Related Disorders.* 69 (2019) 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.11.004>.
- [3] J. Ma, L. Wang, Y.-M. Yang, X.-H. Wan, Targeted gene capture sequencing in diagnosis of dystonia patients, *Journal of the Neurological Sciences.* 390 (2018) 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.04.005>.
- [4] S. Montaut, C. Tranchant, N. Drouot, G. Rudolf, C. Guissart, J. Tarabeux, T. Stemmelen, A. Velt, C. Fourrage, P. Nitschké, B. Gerard, J.-L. Mandel, M. Koenig, J. Chelly, M. Anheim, French Parkinson's and Movement Disorders Consortium, Assessment of a Targeted Gene Panel for Identification of Genes Associated With Movement Disorders, *JAMA Neurol.* (2018). <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.1478>.
- [5] Z. Powis, M.C. Towne, K.D.F. Hagman, K. Blanco, E. Palmaer, A. Castro, S.A. Sajan, K. Radtke, T.J. Feyma, K. Juliette, S. Tang, C. Sidiropoulos, Clinical diagnostic exome sequencing in dystonia: Genetic testing challenges for complex conditions, *Clin. Genet.* (2019). <https://doi.org/10.1111/cge.13657>.
- [6] C. Reale, C. Panteghini, M. Carecchio, B. Garavaglia, The relevance of gene panels in movement disorders diagnosis: A lab perspective, *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 22 (2018) 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2018.01.013>.
- [7] M.E. van Egmond, C.H.A. Lugtenberg, O.F. Brouwer, M.F. Contarino, V.S.C. Fung, M.R. Heiner-Fokkema, J.J. van Hilten, A.H. van der Hout, K.J. Peall, R.J. Sinke, E. Roze, C.C. Verschuuren-Bemelmans, M.A. Willemsen, N.I. Wolf, M.A. Tijssen, T.J. de Koning, A post hoc study on gene panel analysis for the diagnosis of dystonia, *Mov. Disord.* 32 (2017) 569–575. <https://doi.org/10.1002/mds.26937>.
- [8] M. Zech, S. Boesch, A. Jochim, S. Weber, T. Meindl, B. Schormair, T. Wieland, C. Lunetta, V. Sansone, M. Messner, J. Mueller, A. Ceballos-Baumann, T.M. Strom, R. Colombo, W. Poewe, B. Haslinger, J. Winkelmann, Clinical exome sequencing in early-onset generalized dystonia and large-scale resequencing follow-up, *Mov. Disord.* 32 (2017) 549–559. <https://doi.org/10.1002/mds.26808>.
- [9] M. Zech, R. Jech, M. Wagner, T. Mantel, S. Boesch, M. Nocker, A. Jochim, R. Berutti, P. Havránková, A. Fečíková, D. Kemlink, J. Roth, T.M. Strom, W. Poewe, E. Růžička, B. Haslinger, J. Winkelmann, Molecular diversity of combined and complex dystonia: insights from diagnostic exome sequencing, *Neurogenetics.* 18 (2017) 195–205. <https://doi.org/10.1007/s10048-017-0521-9>.

## 2.2 Expansion du spectre phénotypiques des dystonies associées à *GNAO1*

### 2.2.1 Encéphalopathie liée aux variants pathogènes dans *GNAO1*

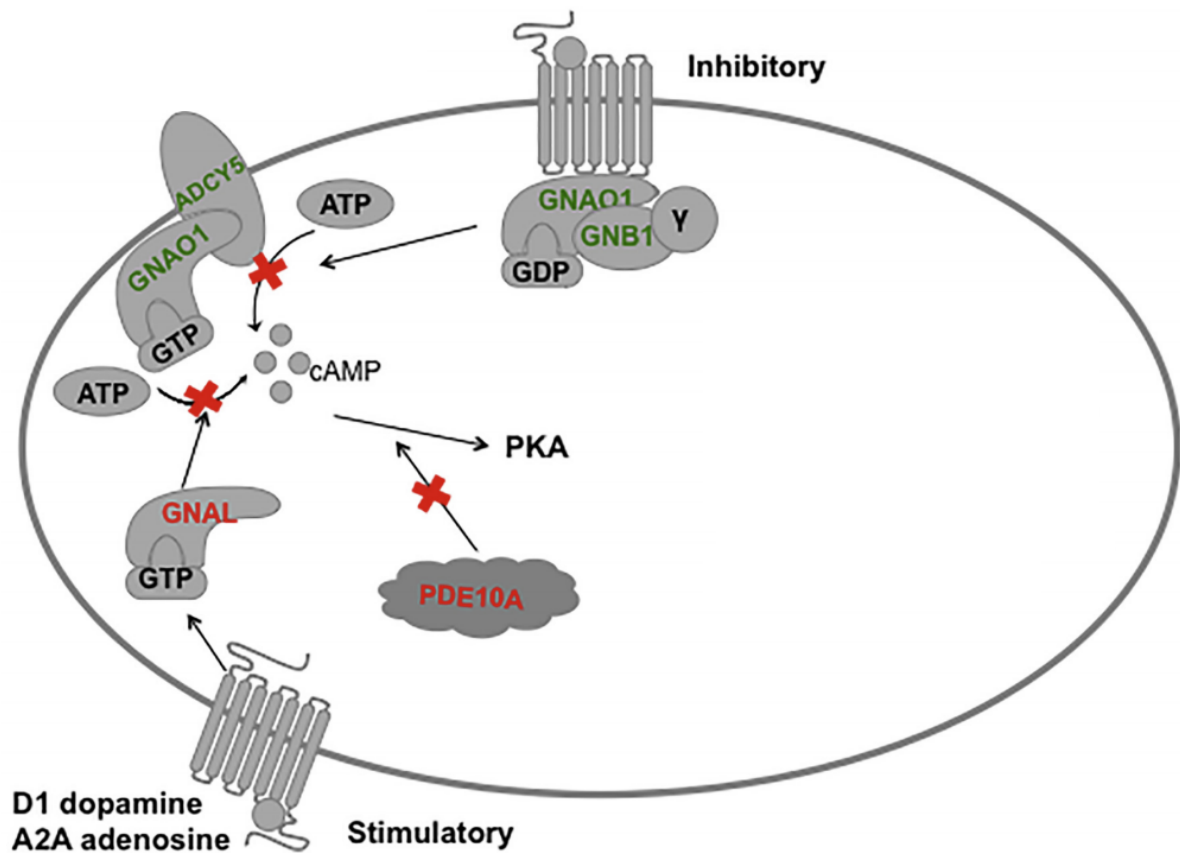
À la suite du premier travail de cette thèse, nous avons pu identifier quatre patients provenant de deux familles différentes présentant une dystonie de transmission autosomique dominante en lien avec des variants délétères hétérozygotes (NM\_020988.3):c.644G>A; p.Cys215Tyr et (NM\_020988.3):c.617G>A; p.Arg206Gln dans le gène *GNAO1*.

*GNAO1* est un gène codant pour la sous unité  $G_{\alpha o}$  d'une protéine G hétérotrimérique impliquée dans la neurotransmission dopaminergique au niveau striatal (103). Le rôle de  $G_{\alpha o}$  dans la transmission dopaminergique est illustré sur la Figure 9. Les variants pathogènes dans *GNAO1* ont été rapportés dans deux phénotypes principaux : des encéphalopathies épileptiques sévères (104) et dans un trouble du neurodéveloppement associé à des mouvements anormaux. Il s'agissait soit de mouvements anormaux choréiques, soit d'une dystonie généralisée sévère apparaissant au cours d'une exacerbation (status dystonicus) (105). Une déficience intellectuelle profonde ou sévère s'associait à ces deux tableaux cliniques. L'ensemble des variants pathogènes identifiés étaient des variants de novo.

Le phénotype présenté par nos patients identifiés dans le premier travail de cette thèse était ainsi surprenant pour plusieurs raisons :

- 1) Il se transmettait selon un mode autosomique dominant alors que l'ensemble des variants pathogènes rapportés jusqu'alors étaient de novo.
- 2) Certains patients présentaient une dystonie apparaissant à l'âge adulte alors que la plupart des patients rapportés jusqu'à présent présentaient une dystonie débutant pendant la petite enfance.
- 3) Certains patients présentaient une dystonie focale ou segmentaire non progressive par opposition au phénotype généralisé rapidement progressif observé chez les sujets rapportés dans la littérature.
- 4) La plupart des patients ne présentaient pas de déficience intellectuelle, même légère, contrairement aux patients rapportés dans la littérature.

Figure 9 : Voie moléculaire impliquant *GNAO1* (d'après Feng et al.) (11,103)



Le récepteur à la dopamine active  $G\alpha$  la protéine codée par *GNAO1*, qui va moduler la production d'AMPc en fonction du type d'adénylate cyclase avec laquelle elle interagit, par exemple celle codée par *ADCY5*, après avoir formé un hétérotrimère avec  $G\gamma$  et  $G\beta 1$  codée par le gène *GNB1*.

L'AMPc est catalysée par des phosphodiesterases codées par les gènes *PDE10A* ou *PDE2A*, au sein desquels des variants pathogènes à l'origine de mouvements anormaux ont également été rapportés (23,106,107).

Nous avons noté que quelques patients présentant un phénotype plus léger avaient néanmoins été rapportés dans la littérature. Parmi eux, un patient porteur du même variant pathogène (NM\_020988.3):c.644G>A; p.Cys215Tyr retrouvé chez deux patients issus d'une de nos familles (108).

Nous avons émis l'hypothèse que de tels variants pathogènes dans *GNAO1* pourraient représenter une cause génétique de syndrome dystonique d'apparition plus tardif ou de sévérité moindre en comparaison aux phénotypes qui avaient jusqu'alors été décrits dans la littérature.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé la plateforme collaborative Genematcher afin d'interagir avec des cliniciens et des généticiens assurant le suivi de patients porteurs de variants pathogènes dans *GNAO1* et présentant un phénotype léger.

Ce phénotype léger était défini par l'apparition de la dystonie après deux ans de vie, l'absence de déficience intellectuelle profonde ou sévère, l'absence d'encéphalopathie épileptique et l'acquisition de la marche.

## **Highlighting the Dystonic Phenotype Related to *GNAO1***

Thomas Wirth\*, Giacomo Garone\*, Manju A Kurian, Amélie Piton, Francisca Millan, Aida Telegrafi, Nathalie Drouot, Gabrielle Rudolf, Jamel Chelly, Warren Marks, Lydie Burglen, Diane Demailly, Phillipe Coubes, Mayte Castro-Jimenez, Sylvie Joriot, Jamal Ghoumid, Jérémie Belin, Jean-Marc Faucheux, Lubov Blumkin, Mariam Hull, Mered Parnes, Claudia Ravelli, Gaëtan Poulen, Nadège Calmels, Andrea H Nemeth, Martin Smith, Angela Barnicoat, Claire Ewencyk, Aurélie Méneret, Emmanuel Roze, Boris Keren, Cyril Mignot, Christophe Beroud, Fernando Acosta Jr, Catherine Nowak, William G Wilson, Dora Steel, Alessandro Capuano, Marie Vidailhet, Jean-Pierre Lin, Christine Tranchant, Laura Cif+, Diane Doummar+, Mathieu Anheim+

\* Thomas Wirth and Giacomo Garone contributed equally to this work and should be considered co-first authors

+ Laura Cif, Diane Doummar and Mathieu Anheim contributed equally to this work and should be considered co-last authors

**Publié dans *Movement Disorders*, 2022**

## Highlighting the dystonic phenotype related to *GNAO1*

Thomas Wirth (MD)<sup>1,2,3\*</sup>, Giacomo Garone (MD)<sup>4,5\*</sup>, Manju A. Kurian (PhD)<sup>6</sup>, Amélie Piton (PhD)<sup>2,3,7</sup>, Francisca Millan (MD)<sup>8</sup>, Aida Telegrafi (MS)<sup>8</sup>, Nathalie Drouot (Msc)<sup>3</sup>, Gabrielle Rudolf (PhD)<sup>1,2,3</sup>, Jamel Chelly (MD)<sup>2,3,7</sup>, Warren Marks (MD)<sup>9</sup>, Lydie Burglen (MD)<sup>10</sup>, Diane Demailly (MD)<sup>11</sup>, Mayte Castro-Jimenez (MD)<sup>12</sup>, Sylvie Joriot (MD)<sup>13</sup>, Jamal Ghoumid (MD)<sup>14</sup>, Jérémie Belin (MD)<sup>15</sup>, Jean-Marc Faucheux (MD)<sup>16</sup>, Lubov Blumkin (MD)<sup>17</sup>, Mariam Hull (MD)<sup>18</sup>, Mered Parnes (MD)<sup>18</sup>, Claudia Ravelli (MD)<sup>19</sup>, Gaëtan Poulen (MD)<sup>11</sup>, Nadège Calmels (PharmD)<sup>2,3,7</sup>, Andrea H. Nemeth (MD)<sup>20</sup>, Martin Smith (MD)<sup>20</sup>, Angela Barnicoat (MD)<sup>21</sup>, Claire Ewencyk (MD)<sup>22,23</sup>, Aurélie Méneret (MD)<sup>22,23</sup>, Emmanuel Roze (MD)<sup>22,23</sup>, Boris Keren (MD)<sup>22,23</sup>, Cyril Mignot (MD)<sup>22,23</sup>, Christophe Beroud (MD)<sup>24</sup>, Fernando Acosta Jr (MD)<sup>9</sup>, Catherine Nowak (MD)<sup>25</sup>, William G. Wilson (MD)<sup>26</sup>, Dora Steel (BMBCh)<sup>6</sup>, Alessandro Capuano (MD)<sup>5</sup>, Marie Vidailhet (MD)<sup>22,23</sup>, Jean-Pierre Lin (MD)<sup>27</sup>, Christine Tranchant (MD)<sup>1,2,3</sup>, Laura Cif (MD)<sup>11#</sup>, Diane Doummar (MD)<sup>19#</sup>, Mathieu Anheim (MD)<sup>1,2,3#</sup>

1 Département de Neurologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

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

3 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France.

4 University Hospital Pediatric Department, IRCCS Bambino Gesù Children's Hospital, University of Rome Tor Vergata, 00165 Rome, Italy

5 Movement Disorders Clinic, Department of Neurosciences, Bambino Gesù Children's Hospital, Rome, Italy.

6 Molecular Neurosciences, Developmental Neurosciences, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, London, United-Kingdom.

7 Laboratoire de diagnostic génétique, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

8 GeneDx, Gaithersburg, Maryland, USA.

9 Cook Children's Medical Centre, Fort Worth, TX 76104, USA.

10 Centre de Référence des Malformations et Maladies Congénitales du Cervelet, Département de Génétique et Embryologie Médicale, APHP, Hôpital Trousseau, 75012, Paris, France.

11 Département de Neurochirurgie, Unité des Pathologies Cérébrales Résistantes, Unité de Recherche sur les Comportements et Mouvements Anormaux, Hôpital Gui de Chauliac, Centre Hospitalier Régional Montpellier, Montpellier, France.

12 Service de Neurologie, Department of clinical neurosciences, Lausanne university hospital (CHUV) and university of Lausanne (UNIL), Lausanne, Switzerland

13 Department of Paediatric Neurology, University Hospital of Lille, Lille, France.

14 Univ. Lille, ULR7364 RADEME, CHU Lille, Clinique de Génétique Guy Fontaine, F-59000 Lille, France

15 Service de neurologie, CHU Tours, France

16 Service de neurologie, Hôpital d'Agen, Agen France

17 Pediatric movement disorders clinic, Pediatric Neurology Unit, Wolfson Medical Center, Holon; Sackler School of Medicine, Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel

18 Pediatric Movement Disorders Clinic, Blue Bird Circle Clinic for Pediatric Neurology, Section of Pediatric Neurology and Developmental Neuroscience, Texas Children's Hospital, Houston, Texas, USA

19 Sorbonne Université, Service de Neuropédiatrie-Pathologie du développement, centre de référence neurogénétique, Hôpital Trousseau AP-HP.SU, FHU I2D2, F-75012, Paris, France

20 Oxford University Hospitals National Health Service Foundation Trust and University of Oxford, Oxford, UK.

21 Department of Clinical Genetics, Great Ormond Street Hospital, London, UK

22 Sorbonne Université/Inserm U1127/CNRS UMR 7225/Institut du Cerveau, Paris, France

23 Service de neurologie, Hôpital la Pitié Salpêtrière, Sorbonne Université, Paris, France

24 Aix Marseille Université, INSERM, MMG, Bioinformatics & Genetics, Marseille, France.

25 The Feingold Center for Children, Division of Genetics and Genomics, Boston Children's Hospital, Boston, MA, USA.

26 Department of Pediatrics, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA.

27 Children's Neurosciences Department, Evelina London Children's Hospital, Guy's and St Thomas NHS Foundation Trust, London SE1 7EH, United Kingdom.

\*These authors contributed equally to this work and should be considered as co-first authors.

#These authors contributed equally to this work and should be considered as co-last authors.

**Corresponding author information :**

**Thomas WIRTH**

Service de Neurologie

Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

1, avenue Molière

67098 Strasbourg

France

Phone : +33 (0)3 88 12 87 11

Fax : +33 (0) 3 88 12 85 33

Email: [thomas.wirth@etu.unistra.fr](mailto:thomas.wirth@etu.unistra.fr)

**Abstract words count: 149 words**

**Manuscript words count: 1694 words**

**Key words:** Dystonia/Genetic diagnosis/*GNAOI*/Phenotypes

**Running title:** Expanding the phenotype related to *GNAOI* mutations

**Relevant conflicts of interest/financial disclosures:** No

**Funding agencies:** T.W. was funded by a grant from the Revue Neurologique for this work.

The study was partly supported by a grant provided by France Parkinson.



## **Abstract**

**Background:** Most reported patients carrying *GNAOI* mutations showed a severe phenotype characterized by early-onset epileptic encephalopathy and/or chorea.

**Objective:** To characterize the clinical and genetic features of patients with mild *GNAOI*-related phenotype with prominent movement disorders.

**Material and methods:** We included patients diagnosed with *GNAOI*-related movement disorders of delayed onset (>2 years). Patients experiencing either severe or profound ID or early onset epileptic encephalopathy, were excluded.

**Results:** 24 patients and one asymptomatic subject were included. All patients showed dystonia as prominent movement disorder. Dystonia was focal in 1, segmental in 6, multifocal in 4 and generalized in 13. Six patients showed adolescence or adulthood-onset dystonia. Seven patients presented with parkinsonism, 3 with myoclonus. Dysarthria was observed in 19 cases. Mild and moderate intellectual disability were present in 10 and 2 cases, respectively.

**Conclusion:** We highlighted a mild *GNAOI*-related phenotype including adolescent-onset dystonia, broadening the clinical spectrum of this condition.

## Introduction

*GNAOI* mutations have been associated with two phenotypes: a severe, early-infantile epileptic encephalopathy with burst-suppression (EIEE17, OMIM# 615473(1)) and a neurodevelopmental disorder with involuntary movements (NEDIM, OMIM# 617493(2–4)), with or without seizures. *GNAOI* encodes the  $\alpha$ -subunit of a heterotrimeric guanine nucleotide-binding protein ( $G_{\alpha o}$ ), which is widely expressed in the central nervous system, playing an important role in signal transduction through AMPc metabolism in the striatum(2,5,6). As the number of reports increased, it became evident that *GNAOI*-related encephalopathies encompass a continuous spectrum of neurological syndromes featuring variable association of movement disorders, psychomotor delay, intellectual disability (ID) and different types of epilepsy(2,7). *GNAOI*-related movement disorder usually starts in infancy. Choreoathetosis is usually described with spontaneous or trigger-induced exacerbations, potentially leading to *status dystonicus*, as a hallmark of the disease(2). Most patients reported so far showed a severe phenotype, with recurrent exacerbations and significant disability. However, few atypical, milder cases, with movement disorder onset in late-childhood or adolescence, no acute exacerbation and less severe disability have been identified using next generation sequencing techniques(8–10). In this study, we characterized the clinical and genetic features of a cohort of patients with mild *GNAOI*-related phenotype characterized by prominent movement disorders, further expanding the spectrum of this condition.

## Material and Methods

### Patients

Patients carrying causative heterozygous variants in *GNAOI* and exhibiting mild phenotypes were included from 18 neurology and neuropsychiatric movement disorders reference centers from the United States of America, France, Israel, Switzerland, the United-Kingdom and Italy. Mild phenotype was defined by i. lack of severe or profound ID; ii. lack of early-onset epileptic encephalopathy; iii. late-onset (i.e. after 2 years of age) appearance of movement disorders; iv acquisition of walk. Patients were recruited through an international collaboration mediated by the online platform Genematcher(11). All patients were assessed by neurologists or neuropsychiatricians with an expertise in movement disorders. Patients' phenotypes from family 6 and family 4, which were previously reported elsewhere, were added in the cohort as further clinical data were obtained.

## **Genetic analysis**

CGH-array, gene panel, exome and genome sequencing were performed as previously reported(9,10,12–15). Detailed procedures of the sequencing including library preparation and bioinformatic analysis are available in Supplementary. Variants were considered as causative if they fulfilled the following criteria: (1) known disease mutation reported in ClinVar or (2) loss-of-function variant including protein truncating variants, frameshift indel, large deletion and splice site changes predicted to cause aberrant splicing, or (3) missense variant with a CADD score>20, absent in GnomAD and predicted to be deleterious by at least two additional algorithms (Polyphen-2, SIFT and Mutation taster). Additionally, variants class of pathogenicity was reported according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines(16).

## **Ethics**

All patients and relatives gave written informed consent before genetic analysis. Strasbourg University Hospital review board gave approval for the exome sequencing of family 4 and 6 which were performed in a research framework. Genetic analysis for other families were performed for diagnostic purposes.

## **Results**

We included 24 patients (15 females) and one asymptomatic carrier from 20 different families. Patients' clinical characteristics are shown on Table-1. Mean age at inclusion was 23.8 years (range: 5-66), mean age at disease-onset was 6.6 years (range: 0.25-47) while mean age of dystonia onset was 10.1 years (range: 2-47). Initial manifestations included dystonia in 10 cases (41%), myoclonus or seizure in one, developmental delay in 13, language delay in 4, motor delay in 9 and hypotonia in 4. Seven patients were from 3 unrelated families showing autosomal dominant inheritance, while all others were sporadic cases due to de novo mutations. Pedigrees of these three families and video of patients are available in Supplementary.

Dystonia was the main movement disorder in all cases, prominently affecting multiple segments of the upper body part for 21 patients or being limited to the cervical segment in a single patient. Dystonia was isolated, namely not associated to any other symptom, in 7 cases (29%), Dystonia was the only movement disorder in 13 cases and was combined with other movement disorders

in 11, namely myoclonus in 3, chorea in 2 and parkinsonism in 7 (with 2 patients combining 3 movement disorders). Only three patients presented an acute exacerbation of dystonia. Dystonia course was non-progressive for 11 patients. Dystonia topography was generalized in 13 cases (54%), multifocal in 4, segmental in 6 and focal in 1. Dystonia was associated with dysarthria/anarthria in 19 cases. Early-onset hypotonia preceded dystonia in 11 cases. Dystonia was associated with ID in 12 cases (mild for 10 and moderate for 2). Seizures occurred in 3 patients between 4 and 19 years of age. MRI imaging was unremarkable for all patients.

Movement disorders response to medication, including anticholinergic drugs, levodopa, tetrabenazine, amantadine, clonazepam or methylphenidate, was variable. Six patients received pallidal deep brain stimulation (DBS) with significant improvement for five of them. Detailed treatment outcomes are available in Supplementary.

Mutations carried by the patients can be seen on Table-1. Details regarding pathogenicity assessment are available in Supplementary. Apart from the p.R206Q, all variants were classified as pathogenic (class V) according to the ACMG criteria. In Family 4, we identified three patients with the R206Q variant, which was classified as a Variant of Uncertain Significance due to the presence of an unaffected carrier, 4-D, son of 4-C despite meeting other criteria of pathogenicity (absent from GnomAD, unanimously predicted damaging by *in silico* tools, affecting a highly conserved residue located in a hot spot without benign variation (criteria PM1, PM2, PP2, PP3). A recurring splicing variant (c.724-8G>A), previously reported in ClinVar, was identified in 8 patients (33%) showing late-onset and/or segmental dystonia. Previous report showed this variant to damage the natural splice acceptor site and create a stronger cryptic splice acceptor site in intron 6, resulting in the insertion of two amino acids leading to protein mislocation(17). Two patients were carrying a nonsense variant (p.N256\*) and one was carrying a large deletion encompassing *GNAOI*. Other mutations (p.L23P; p.K46R; p.R179G; p.R206Q; p.E208N; p.C215Y; p.N242T) were all missense variants absent from GnomAD. The previously reported pathogenic p.C215Y variant(8) was found in three unrelated families. All variants were close to known mutational hot spots (Figure 1).

## Discussion

Herein, we report a large cohort of patients with mild *GNAOI*-related phenotypes, experiencing prominent movement disorders without severe chronic encephalopathy. The typical phenotype was a non-progressive generalized or focal/segmental upper body dystonia appearing beyond

infancy, associated with dysarthria. Acute exacerbation occurred only in three patients and 29% of patients were showing isolated dystonia without additional neurological manifestation. Our inclusion criteria were able to identify these phenotypes that were in contrast with most of the previously reported patients with *GNAOI*-related movement disorders, who showed severe hyperkinetic encephalopathy with recurrent dystonic exacerbations(18,19), and profound developmental delay(3,7) with or without epilepsy in the first year of life(1,7).

Dystonia distribution was segmental or focal in 7 patients and clinical course was non progressive in 11, while most of the previously reported patients with *GNAOI*-related movement disorders had generalized and rapidly progressive dystonia(2). Dystonia topography revealed prominent upper body distribution in most of our patients, reminiscent of the clinical pictures associated with other dystonia-related genes, such as *GNAL*(20,21) or *ANO3*(22,23). Seven patients also exhibited mild parkinsonism which is consistent with the role of  $G_{\alpha o}$  in the signal transduction within the striatal projection neurons downstream of the dopamine receptors(6,24).

We identified three autosomal dominant families where multiple symptomatic relatives carried heterozygous variants, which was in contrast with all the previously reported cases who showed de novo mutations(2). One p.R206Q carrier was not presenting any clinical sign evocative of *GNAOI*-related disorders. The similarities between this family's phenotype and the other cases - all showing upper body distribution - argue for the implication of the variant, while no other class IV-V variant in a dystonia-related gene was identified. Additionally, a family member carrying this variant had disease onset in his forties, meaning the 30-year-old asymptomatic carrier could be potentially pre-symptomatic. Future identification of autosomal dominant family with *GNAOI*-related dystonia and follow-up of this patient might confirm whether incomplete penetrance is possible in *GNAOI*-related disorders.

Response to medication was variable in our cohort. No significant response to levodopa was identified in our cohort, but three patients had partial response to anticholinergic drugs, which was in accordance with previous findings from the literature(2,4,25). Conversely, the outcome was good in five of the six patients who received deep brain stimulation further confirming its efficacy in *GNAOI*-related dystonia(26).

Most of the variants identified in the present work were not reported among previously published cases showing severe phenotype, and two variants recurred in multiple families,

suggesting that mild phenotypes could be related to specific mutations. However, the variants we identified were close to previously reported hot spots (Figure 1), leading to amino-acid substitution in the same functional domains. Further studies are needed to elucidate if these different variants have a milder impact on protein function. Additionally, we identified 2 putative loss-of-function variants (a nonsense variant and a whole-gene deletion), presumably affecting protein expression and possibly causing *GNAOI*-haploinsufficiency. All 3 carriers were presenting late childhood/adolescence onset dystonia without ID. So far, no report described the phenotype of patients harboring *GNAOI*-nonsense variants. Few patients with chromosome 16q deletions encompassing *GNAOI* have been described, all harboring significantly larger deletions compared to our case and showing variable associations of dysmorphisms, microcephaly, seizures and developmental delay(27). Although previous research suggested that loss-of-function variants were mainly responsible of epileptic encephalopathy while gain-of-function mutations were mostly associated with a movement disorders prominent phenotype(5), recent evidence suggests that pathogenic variants exert their effect through a combination of dominant-negative and loss-of-function mechanisms, and each mutation likely produces circuit-selective effects through a peculiar mechanism of signaling disruption(28). The expanding spectrum of associated phenotypes and disease-causing variants provide further evidence that genotype-phenotype correlations are nuanced, and *GNAOI*-related disorders shape a continuous spectrum of overlapping phenotypes, rather than distinct entities(28). Our study carries some limitations, including the retrospective design and the lack of formal assessment in several cases. Herein, we highlighted the milder *GNAOI*-related phenotypes, broadening this condition clinical spectrum. *GNAOI* mutations should be considered as a cause of adolescent or adult-onset non-progressive dystonia, particularly in the presence of a speech involvement even in the absence of seizures or ID.

## **Acknowledgement**

The authors would like to thank the patients and their families for participation in this study, Bernard JOST from the IGBMC Microarray and Sequencing Platform, the France Parkinson organization, and the *Revue Neurologique* for their support.

## **Authors' roles**

Research Project: A. Conception, B. Design, C. Acquisition of Data, D. Analysis and Interpretation of Data; (2) Manuscript: A. Writing of the First Draft, B. Review and Critique; (3) Other: A. Subject Recruitment, B. Clinical Assessment of Patients, C. Study Supervision.

T.W.: 1A, 1B, 1C, 1D, 2A, 3A, 3B, 3C

G.G: 1C, 1D, 2A, 3A, 3B

M.A.K: 1C, 1D, 2A, 3A

A.P.: 1C, 2B, 3A, 3B

F.M.: 1C, 1D, 2B, 3A

A.T.: 1C, 1D, 2B, 3A

N.D.: 1C, 2B, 3A, 3B

G.R.: 1C, 2B, 3A, 3B

J.C.: 1C, 2B, 3A, 3B

W.M.: 1C, 2B, 3A, 3B

L.B.: 1C, 2B, 3A, 3B

D.De: 1C, 2B, 3A, 3B

P.C.: 1C, 2B, 3A, 3B

M.C-J.: 1C, 2B, 3A, 3B

S.J.: 1C, 2B, 3A, 3B

J.G.: 1C, 2B, 3A, 3B

J.B.: 1C, 2B, 3A, 3B

J-M.L.: 1C, 2B, 3A, 3B

Lu.B.: 1C, 2B, 3A, 3B

M.H.: 1C, 2B, 3A, 3B

M.P.: 1C, 2B, 3A, 3B

C.R.: 1C, 2B, 3A, 3B

N.C.: 1C, 2B, 3A, 3B

G.P.: 1C, 2B,

A.H.N.: 1C, 2B, 3A, 3B

Ma.S.: 1C, 2B, 3A, 3B

A.B.: 1C, 2B, 3A, 3B

C.E.: 1C, 2B, 3A, 3B  
A.M.: 1C, 2B, 3A, 3B  
E.R.: 1C, 2B, 3A, 3B  
C.M.: 1C, 2B, 3A, 3B  
C.B.: 1C, 2B, 3A, 3B  
F.A.: 1C, 2B, 3A, 3B  
C.N.: 1C, 2B, 3A, 3B  
W.G.W.: 1C, 2B, 3A, 3B  
D.S.: 1C, 2B, 3A, 3B  
A.C.: 1C, 2B, 3A, 3B  
M.V.: 1C, 2B, 3A, 3B  
J.P.L.: 1C, 2B, 3A, 3B  
C.T.: 1C, 2B, 3A, 3B  
L.C.: 1C, 2B, 3A, 3B  
D.Dou.: 1A, 1B, 1C, 1D, 2B, 3A, 3B, 3C  
M.A.: 1A, 1B, 1C, 1D, 2B, 3A, 3B, 3C

### **Declaration of competing interest**

T.W. received grants from the Revue Neurologique, the Fondation Planiol and the APTES organizations and travels funding from LVL medical. F.M. and A.T. are employees of GeneDx, Inc. D.S. received salary from NIHR, M.K. lab received funding from Jules Thorn Trust and Rosetrees Trust. A.M. received speaker honoraria from Abbvie, E.R. received honorarium for speech from orkyn aguettant, elivie and for participating in an advisory board from allergan, research support from Merz-Pharma, Orkyn, Aguettant, Elivie, Ipsen, Allergan, Everpharma, Fondation Desmarest, AMADYS, ADCY5.org, Agence Nationale de la Recherche, Société Française de Médecine Esthétique, Dystonia Medical Research Foundation. The rest of the authors declare no conflict of interest.



## References

1. Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, et al. De Novo Mutations in GNAO1, Encoding a G $\alpha$  Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy. *Am J Hum Genet.* 5 sept 2013;93(3):496-505.
2. Schirinzi T, Garone G, Travaglini L, Vasco G, Galosi S, Rios L, et al. Phenomenology and clinical course of movement disorder in GNAO1 variants: Results from an analytical review. *Parkinsonism Relat Disord.* 2019;61:19-25.
3. Kulkarni N, Tang S, Bhardwaj R, Bernes S, Grebe TA. Progressive Movement Disorder in Brothers Carrying a GNAO1 Mutation Responsive to Deep Brain Stimulation. *J Child Neurol.* févr 2016;31(2):211-4.
4. Danti FR, Galosi S, Romani M, Montomoli M, Carss KJ, Raymond FL, et al. GNAO1 encephalopathy: Broadening the phenotype and evaluating treatment and outcome. *Neurol Genet.* avr 2017;3(2):e143.
5. Feng H, Khalil S, Neubig RR, Sidiropoulos C. A mechanistic review on GNAO1-associated movement disorder. *Neurobiol Dis.* 2018;116:131-41.
6. Delorme C, Giron C, Bendetowicz D, Méneret A, Mariani L-L, Roze E. Current challenges in the pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal movement disorders. *Expert Rev Neurother.* janv 2021;21(1):81-97.
7. Kelly M, Park M, Mihalek I, Roctus A, Gramm M, Pérez-Palma E, et al. Spectrum of neurodevelopmental disease associated with the GNAO1 guanosine triphosphate-binding region. *Epilepsia.* 2019;60(3):406-18.
8. Carecchio M, Invernizzi F, González-Latapi P, Panteghini C, Zorzi G, Romito L, et al. Frequency and phenotypic spectrum of KMT2B dystonia in childhood: A single-center cohort study. *Mov Disord.* 2019;34(10):1516-27.
9. Graziola F, Garone G, Stregapede F, Bosco L, Vigevano F, Curatolo P, et al. Diagnostic Yield of a Targeted Next-Generation Sequencing Gene Panel for Pediatric-Onset Movement Disorders: A 3-Year Cohort Study. *Front Genet.* 2019;10:1026.
10. Wirth T, Tranchant C, Drouot N, Keren B, Mignot C, Cif L, et al. Increased diagnostic yield in complex dystonia through exome sequencing. *Parkinsonism Relat Disord.* 2020;74:50-6.
11. Sobreira N, Schiettecatte F, Valle D, Hamosh A. GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. *Hum Mutat.* oct 2015;36(10):928-30.
12. Guillen Sacoto MJ, Tchasovnikarova IA, Torti E, Forster C, Andrew EH, Anselm I, et al. De Novo Variants in the ATPase Module of MORC2 Cause a Neurodevelopmental Disorder with Growth Retardation and Variable Craniofacial Dysmorphism. *Am J Hum Genet.* 6 août 2020;107(2):352-63.
13. Valence S, Cochet E, Rougeot C, Garel C, Chantot-Bastaraud S, Lainey E, et al. Exome sequencing in congenital ataxia identifies two new candidate genes and highlights a pathophysiological link between some congenital ataxias and early infantile epileptic encephalopathies. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2019;21(3):553-63.
14. Cif L, Demailly D, Lin J-P, Barwick KE, Sa M, Abela L, et al. KMT2B-related disorders: expansion of the phenotypic spectrum and long-term efficacy of deep brain stimulation. *Brain J Neurol.* 5 déc 2020;143(11):3242-61.

15. Smol T, Thuillier C, Boudry-Labis E, Dieux-Coeslier A, Duban-Bedu B, Caumes R, et al. Neurodevelopmental phenotype associated with CHD8-SUPT16H duplication. *Neurogenetics*. janv 2020;21(1):67-72.
16. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. mai 2015;17(5):405-24.
17. Miyamoto S, Nakashima M, Fukumura S, Kumada S, Saito H. An intronic GNAO1 variant leading to in-frame insertion cause movement disorder controlled by deep brain stimulation. *Neurogenetics*. 11 févr 2022;
18. Ananth AL, Robichaux-Viehoever A, Kim Y-M, Hanson-Kahn A, Cox R, Enns GM, et al. Clinical Course of Six Children With GNAO1 Mutations Causing a Severe and Distinctive Movement Disorder. *Pediatr Neurol*. 1 juin 2016;59:81-4.
19. Honey CM, Malhotra AK, Tarailo-Graovac M, van Karnebeek CDM, Horvath G, Sulistyanto A. GNAO1 Mutation-Induced Pediatric Dystonic Storm Rescue With Pallidal Deep Brain Stimulation. *J Child Neurol*. mai 2018;33(6):413-6.
20. Fuchs T, Saunders-Pullman R, Masuho I, Luciano MS, Raymond D, Factor S, et al. Mutations in GNAL cause primary torsion dystonia. *Nat Genet*. janv 2013;45(1):88-92.
21. Geoghegan AR, Al Hussona M, Beauchamp NJ, Hutchinson M, Sean O'Riordan MB, Lynch T, et al. A novel GNAL mutation in familial dystonia presenting with childhood tremor and myoclonus. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc*. juin 2019;34(6):923-4.
22. Charlesworth G, Plagnol V, Holmström KM, Bras J, Sheerin U-M, Preza E, et al. Mutations in ANO3 Cause Dominant Craniocervical Dystonia: Ion Channel Implicated in Pathogenesis. *Am J Hum Genet*. 7 déc 2012;91(6):1041-50.
23. Lange LM, Junker J, Loens S, Baumann H, Olschewski L, Schaake S, et al. Genotype-Phenotype Relations for Isolated Dystonia Genes: MDSGene Systematic Review. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc*. mai 2021;36(5):1086-103.
24. Corvol J-C, Muriel M-P, Valjent E, Féger J, Hanoun N, Girault J-A, et al. Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 4 août 2004;24(31):7007-14.
25. Yamashita Y, Ogawa T, Ogaki K, Kamo H, Sukigara T, Kitahara E, et al. Neuroimaging evaluation and successful treatment by using directional deep brain stimulation and levodopa in a patient with GNAO1-associated movement disorder: A case report. *J Neurol Sci*. 15 avr 2020;411:116710.
26. Koy A, Cirak S, Gonzalez V, Becker K, Roujeau T, Milesi C, et al. Deep brain stimulation is effective in pediatric patients with GNAO1 associated severe hyperkinesia. *J Neurol Sci*. 15 2018;391:31-9.
27. Apuzzo D, Cappuccio G, Vaisanen T, Alagia M, Pignataro P, Genesio R, et al. Two cases of 16q12.1q21 deletions and refinement of the critical region. *Eur J Med Genet*. juin 2020;63(6):103878.
28. Muntean BS, Masuho I, Dao M, Sutton LP, Zucca S, Iwamoto H, et al. Gαo is a major determinant of cAMP signaling in the pathophysiology of movement disorders. *Cell Rep*. 2 févr 2021;34(5):108718.

**Table 1 Clinical features and genetics features of *GNAO1* mutation carriers**

Patient ID	Ancestry	Gender	Age at last assessment	Age at first symptoms	First symptom	Dystonia age of onset	Dystonia			Parkinsonism	Myoclonus	Chorea	Hypotonia	Intellectual disability	Seizures	Speech	Other	Treatment response	GNAO1 variant
							Topography	Progression	Acute exacerbations										
Family 1 Case A	North African	Female	28 years	4 years	Seizure	12 years	Segmental: face, neck, upper limbs	No	No	Akinetic-rigid syndrome	No	No	Mild	Yes	Normal	None	Mild response to levodopa, moderate improvement with trihexyphenidyl	[NM_020988.3]c.481T>C; p.L23P, <b>UK</b>	
Family 2 Case A	North African	Female	5 years	By 1 year	Developmental Delay (Motor delay)	2 years 4 months	Generalized: 000-mandibular, trunk, dystonic gait.	Yes	No	No	No	Yes	No	No	Dysarthria	None	NA	[NM_020988.3]c.37A>G; p.R46R, <b>UK</b>	
Family 3 Case A	European	Male	19 years	3 months	Developmental delay (Motor delay, Hypotonia)	12 years	Generalized: left upper limb, cervical and axial dystonia. BFMDRS: 16	Yes	No	No	No	Yes	Mild	Yes	Dysarthria	None	No response to levodopa and minimal improvement with gabapentin and trihexyphenidyl	[NM_020988.3]c.535A>G; p.R179G, <b>UK</b>	
Family 4 Case A	European	Male	24 years	15 years	Dystonia	15 years	Segmental: 000-mandibular and cervical dystonia	No	No	No	No	No	No	No	Dysarthria	None	No response to levodopa and tetraabenazine, mild worsening by 500-DBS	[NM_020988.3]c.517G>A; p.R206C, <b>UK</b>	
Family 4 Case B	European	Female	53 years	47 years	Dystonia	47 years	Focal: cervical	No	No	No	No	No	No	No	Normal	None	NA		
Family 4 Case C	European	Female	57 years	30 years	Dystonia	30 years	Multifocal: upper and lower limbs, laryngeal dystonia with dysarthria	No	No	No	No	No	No	No	Dysarthria	None	NA		
Family 5 Case A	European	Female	5 years 11 months	3 months	Developmental delay (Motor delay, Hypotonia)	5 years	Multifocal: four limbs	No	No	No	No	Yes	No	No	Dysarthria language delay	None	NA	[NM_020988.3]c.522G>C; p.E208N, <b>UK</b>	
Family 6 Case A	European	Male	31 years	3 years	Dystonia	3 years	Generalized: left lower limb dystonia, bilateral upper limbs dystonia, laryngeal dystonia, abnormal axial posture. BFMDRS: 24.5	Yes	No	No	No	Yes	Mild	No	Dysarthria	None	Mild response to levodopa, mild response to trihexyphenidyl		
Family 6 Case B	European	Female	66 years	5 years	Dystonia	5 years	Generalized: laryngeal dystonia, facial dystonia, axial dystonia, abnormal posture of the left hand and bilateral pes valgus. BFMDRS: 23.5	Yes	No	No	Yes	No	No	No	Dysarthria	Pyramidal syndrome	Subjective response to levodopa	[NM_020988.3]c.544G>A; p.C215Y, <b>UK</b>	
Family 7 Case A	European	Male	48 years	6 years	Dystonia	6 years	Generalized: 000-mandibular, cervical, trunk, upper limbs, left foot	Yes	No	No	No	No	Mild	No	Dysarthria	None	Subjective response to levodopa. No effect of trihexyphenidyl		
Family 8 Case A	European	Female	16 years	6 years	Dystonia	6 years	Segmental: 000-pharyngeal, neck and trapezius	Yes	Yes	No	No	No	Mild	No	Severe dysarthria	MDD	Mild improvement with gabapentin, no benefit with trihexyphenidyl		
Family 9 Case A	African American	Male	13 years	7 months	Developmental delay (Language delay)	5 years	Generalized: initially axial 000-000-000-000 neck involvement with secondary limbs and 000-mandibular involvement.	Yes	No	No	No	No	Moderate	No	Dysarthria	None	No response to levodopa and trihexyphenidyl. Rash with clonazepam. Minimal improvement with baclofen.		
Family 10 Case A	Moroccan Syrian Jewish	Female	15 years	1 year	Developmental delay (Motor delay)	5 years	Generalized dystonia. BFMDRS: 48.5	No	No	No	No	No	Mild	No	Dysarthria	Exaggerated startle reflex	No response to levodopa		
Family 11 Case A	European	Female	18 years 6 months	By 1 year	Developmental delay (Motor delay)	7 years	Generalized: cervical extension, dystonic forward trunk lean. BFMDRS: 85	Yes	No	Severe akinetic rigid syndrome	No	No	Mild	No	Anarthria	None	No response to levodopa, trihexyphenidyl and baclofen. Sustained response to 500-DBS	[NM_020988.3]c.7248G>A, <b>UK</b>	
Family 12 Case A	European	Female	21 years	By 1 year	Developmental delay (Motor delay)	7 years	Generalized dystonia with severe cervical neck extension and 000-mandibular dystonia. BFMDRS: 64.5	Yes	No	Akinetic rigidity, facial akinesia	No	No	Moderate	No	Normal	None	No response to levodopa, carbamazepine, trihexyphenidyl and baclofen. Good response to 500-DBS		
Family 13 Case A	Caucasian	Male	20 years 2 months	By 1 year	Developmental delay (Motor delay, Language delay)	11 years	Generalized: bilateral upper limb, axial, trunk, cervical, 000-linguo-pharyngo-000 dystonia with speech and swallowing impairment. Dystonic gait. BFMDRS: 45.5	Yes	Yes	Akinetic-rigid syndrome	No	Yes	No	No	Severe dysarthria	ADHD	Moderate and transient response to methylphenidate and trihexyphenidyl. Good response to 500-DBS		
Family 14 Case A	Chinese European	Male	13 years	3 years	Developmental Delay (Language delay)	11 years	Segmental: bilateral upper limb dystonia	No	No	No	Yes (upper limbs)	Yes	Mild	No	Normal	ASD	No response to acetazolamide and amantadine, improvement of dystonia with trihexyphenidyl		
Family 15 Case A	Mixed European	Female	11 years 8 months	10 months	Developmental delay (Myoclonus)	2 years	Generalized: upper and lower limbs, axial, dystonia gait	Yes	No	No	Yes (upper limbs)	Yes	No	No	Dysarthria	ADHD	Moderate response to tetraabenazine on chorea, good response to trihexyphenidyl		
Family 16 Case A	Northern European	Female	5 years 6 months	3 months	Developmental Delay (Motor delay, Hypotonia)	5 years	Segmental: dystonic posturing of fingers and hands	No	No	No	No	Yes	Mild	No	Dysarthria	None	Good response to levodopa		
Family 17 Case A	Caucasian	Male	18 years	2 years	Developmental delay (Language delay)	2 years	Segmental: laryngeal, right upper limb (handwriting) and cervical	No	No	No	No	No	No	No	Dysarthria	None	Response to anticholinergic and levodopa	[NM_020988.3]c.725A>C; p.N242T, <b>UK</b>	
Family 18 Case A	European	Female	20 years 4 months	6 years	Dystonia	6 years	Generalized dystonia. BFMDRS: 67.5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Mild	No	Anarthria	None	No response to haloperidol, 1000-DBS, 500-DBS, trihexyphenidyl. Moderate response to 000-000-000. Excellent response to 500-DBS	[NM_020988.3]c.737A>T; p.E246V, <b>UK</b>	
Family 19 Case A	European	Female	13 years	6 years	Dystonia	6 years	Multifocal: bilateral upper limb, cervical and 000-mandibular dystonia	No	No	Mild akinetic rigid syndrome	No	No	No	No	Dysarthria	None	NA	[NM_020988.3]c.765dupT; p.N25F, <b>UK</b>	
Family 19 Case B	European	Female	39 years	16 years	Dystonia	16 years	Multifocal: bilateral upper limb, cervical and 000-mandibular dystonia	No	No	Mild akinetic rigid syndrome	No	No	No	No	Dysarthria	None	No response to clonazepam. Sustained response to 500-DBS		
Family 20 Case A	Caucasian	Male	9 years	By 1 year	Developmental delay (Motor delay, Hypotonia)	9 years	Generalized: Upper limb and trunk dystonia, dystonic gait.	Yes	No	No	No	Yes	No	No	Normal	None	No response to levodopa, clonazepam or baclofen	Heterozygous deletion in 16q11.2 (273 kb, 375kb) encompassing GNAO1	
Summary		Female 15 Male 9	Mean age at last assessment 23.8 years	Mean age at disease onset 6.6 years	Mean age at dystonia onset: 10.1 years Motor Delay: 9 Language Delay: 4 Dystonia: 10 Hypotonia: 4 Seizure: 1 Myoclonus: 1	13 Mean age at dystonia onset: 10.1 years	Focal: 1 Segmental: 6 Multifocal: 4 Generalized 13	3 Exacerbation	7 Parkinsonism	3 Myoclonus	2 Chorea	11 Hypotonia	12 Intellectual disability	3 Seizures	19 Dysarthria	Pyramidal syndrome: 1 MDD: 1 ADHD: 2 ASD: 1 Exaggerated startle reflex: 1			

Abbreviations: htz: heterozygous, ID: Intellectual Disability, MDD: Major Depressive Disorder, ASD: Autism Spectrum Disorder, ADHD: Attention Deficit with Hyperactivity disorder, GPI-DBS: Globus Pallidus internal deep brain stimulation, BFMDRS: Burke Fahn Marsden Dystonia Rating Scale, dystonia score.

**Figure 1 Impact of the mutations on the protein**

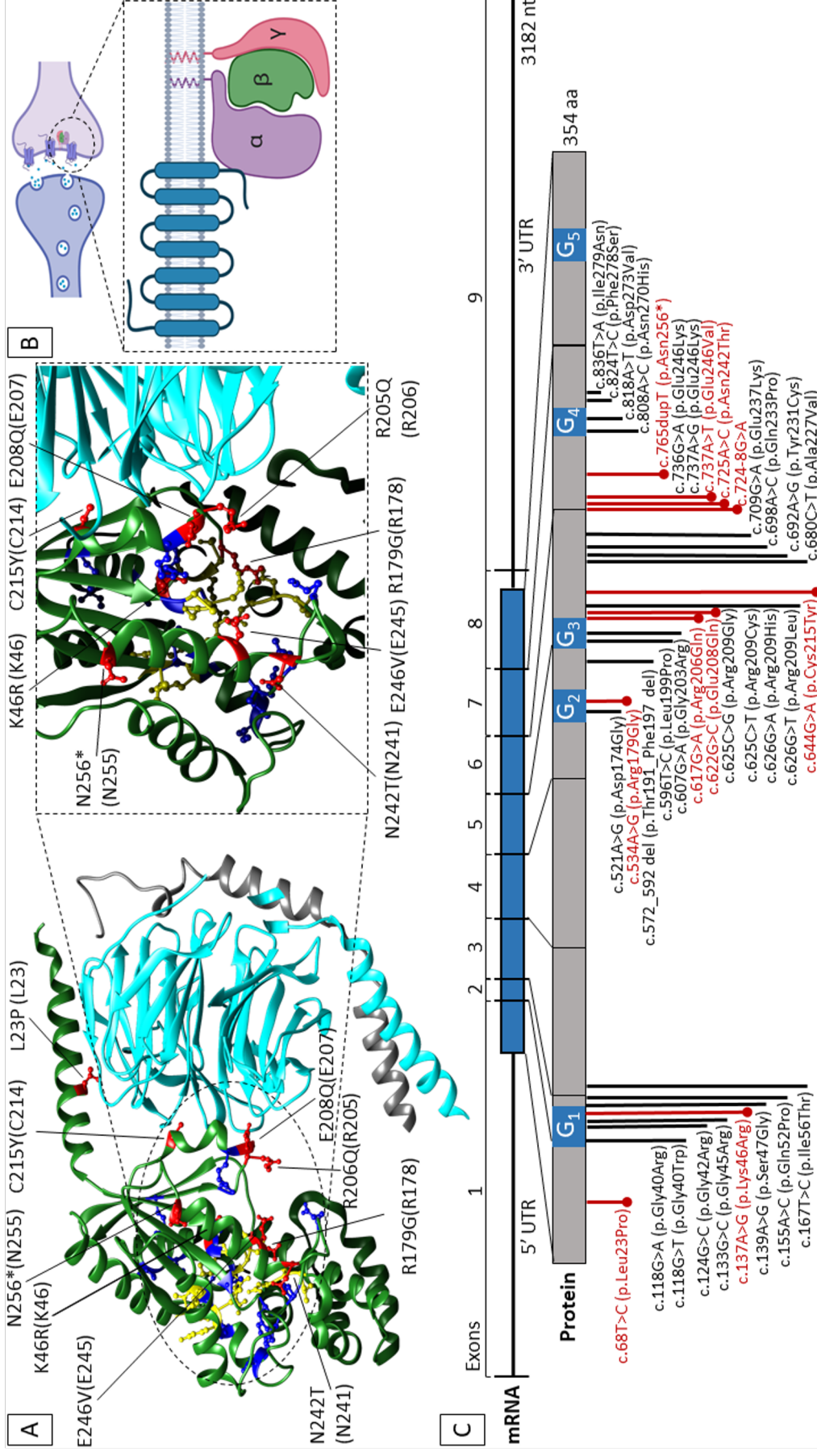


Figure 1. A. Position of the variant sites on the heterotrimeric complex containing the  $\alpha$  subunit. The heterotrimer is depicted in the resting state (GDP-bound, PDBcode 1GG2). Subunits  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  are colored in green, cyan and grey, respectively. Affected residues in this cohort are colored in red and their position is indicated both on the human Gao1 and on rat Gai1 (UniProtKB ID P10824, between brackets). GDP-binding residues are colored in blue. Previously reported GNAO1 variants are depicted in blue. On the right, a focused view of the GDP-Binding site is shown.

B. Cartoon model of the heterotrimeric- $\alpha\beta\gamma$  G-protein coupled-receptor on the synaptic cleft.

C. Schematic representation of the disease-causing variants on GNAO1 transcript (NM\_020988.3) and protein (UniProtKB ID P09471-1). The amino acids impacted by the mutations identified in this work are depicted in red, while previously reported variants are shown in black. The blue bar on the transcript indicates the translated region. The blue segments in the protein sequence indicate the G-motifs (containing the nucleotide binding residues) – numbered from 1 to 5.

Molecular graphics are realized with UCSF Chimera (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>), developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, with support from NIH P41-GM103311. The cartoon has been created with BioRender.com.

UTR: untranslated region. nt: nucleotides, aa: amino acids

## Whole Exome Sequencing

### Family 1, 2, 13

Whole-exome sequencing was performed only in the proband (singleton) using Agilent in-solution enrichment methodology to capture 50-Mb exons (SureSelect Human All Exon v5 kit, Agilent Technologies, Santa Clara, CA), followed by paired-end 75 bases massively parallel sequencing on an HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA). The bioinformatics analysis of the sequencing data was based on the Illumina pipeline (CASAVA1.8.2) (reference sequence hg19). Variants were sorted using ERIS (Exome Resequencing Intelligent Sorter, <http://eris.integragen.com/>) according to the abovementioned criteria. We restricted our analysis to rare (Minor allele frequency <0.005 in databases gnomAD, ESP, dbSNP, 1000genome), nonsense, missense substitutions, mutations in canonical splice sites and indel variants located in coding regions. Filtered variants were analysed using the interactive biosoftware ALAMUT V2.10, which uses several computational (in silico) predictive programs that makes an overall predication of potential pathogenic variants, notably for non-synonymous variants (SIFT, MutationTaster, and PolyPhen-2), for splice variants (GeneSplicer, MaxEntScan, NNSplice and SpliceSiteFinder-like), and evolutionary conservation of the residues across vertebrates and invertebrates (PhastCons and PhyloP) (<http://www.interactive-biosoftware.com/>).

### Family 4, 6

Genomic DNA from peripheral blood samples was extracted according to standard procedures. An exome capture kit (SeqCap EZ Exome probes; Roche-NimbleGen) was used to target all exons. Exons capture was followed by massive parallel 150pb paired-end sequencing (Illumina, San Diego, CA, USA). Read mapping and variant calling were performed following standard bioinformatics procedures. Filtering and prioritization of the variants were conducted using an in-house interactive Paris Descartes bioinformatics platform pipeline based on the Ensembl database (release 67). Variants were filtered according to their frequency (1%) against the dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), 1000 Genome Project (<http://www.internationalgenome.org/>), ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>) and GnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org/about>) databases. In silico prediction of variants pathogenicity was performed using SIFT, PolyPhen and Mutation Taster. Cadd score was also integrated to the prioritization criteria, and a cutoff of 20 was used to determine deleteriousness.

All pathogenic or likely pathogenic variants identified by Whole Exome Sequencing were confirmed by Sanger sequencing on both patients and asymptomatic parents.

#### Family 14, 15, 16, 17,

Using genomic DNA from the proband and parents, the exonic regions and flanking splice junctions of the genome were captured using the SureSelect Human All Exon V4 (50 Mb), the Clinical Research Exome kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) or the IDT xGen Exome Research Panel v1.0. Massively parallel (NextGen) sequencing was done on an Illumina system with 100bp or greater paired end reads. Reads were aligned to human genome build GRCh37/UCSC hg19 and analyzed for sequence variants using a custom-developed analysis tool. The general assertion criteria for variant classification are publicly available on the GeneDx ClinVar submission page (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/submitters/26957/>)

#### Family 7

Using genomic DNA from the proband, the exonic regions and flanking splice junctions of the genome were captured using the panel V1 DGMBC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Next Generation Sequencing was performed on Ion Proton platform (Thermo Fisher). Bioinformatic analysis were performed using Torrent suite for alignment on the human genome build GRCh37/UCSC hg19 and variant calling. The VarAFT software was used for variant annotation using ANNOVAR and UMD predictor. Analysis was filtered on dystonia-related genes, including *GNAO1*.

### **Whole Genome Sequencing**

#### Family 5

Whole Genome Sequencing was performed through the 100K Genomes Study (The National Genomics Research and Healthcare Knowledgebase v5, Genomics England. doi:10.6084/m9.figshare.4530893.v5. 2019).

#### Family 10, 11, 12

Whole Genome Sequencing was performed by BGI using the DNBSeg™ next-generation sequencing technology platform, using 100bp paired-end reads. Variant calling was performed using SAMtools, SOAPSnp and GATK. Reads were aligned to the GRCh37/hg19 reference genome. Variant prioritisation was performed using QIAGEN Ingenuity Variant Analysis™ followed by variant analysis using AlamutR Visual 2.11

## **Targeted gene panel sequencing**

### Family 3

Targeted sequencing of index cases' DNA was performed using a mean of a customized panel (Nextera Rapid Custom Enrichment, Illumina, San Diego, CA), including 102 genes, selected in accordance with the results of a systematic literature review of studies of MD-associated genes. The panel was designed with the Illumina Design Studio tool. The region of interest was the coding sequence of each gene with a  $\pm 20$  bp intronic flanking region to include splicing mutations. The 3' and 5' untranslated regions (UTRs) were included in the sequenced region only in genes with previously described pathogenic variants in the UTRs. Gene libraries were obtained from a Nextera Rapid Capture Target Enrichment Kit and sequenced on a MiSeq platform (Illumina). The generated reads were aligned to human genome assembly hg38 (December 2013, GRCh38). Variants were called using the HaplotypeCaller tool of GATK software, version 4.3 (Cambridge, MA, USA) and annotated with the ANNOVAR software tool (Wang et al., 2010). Annotated data were filtered to exclude intronic and synonymous variants that were not predicted to affect splice sites, as well as variants with reported minor allele frequency (MAF)  $\geq 0.01$  in publicly available resources on human variation, such as dbSNP ver. 144, 1000 Genomes, Exome Aggregation Consortium (ExAC), NHLBI Exome Sequencing Project Exome Variant Server (EVS). Missense variants of suspected pathogenicity were investigated using in silico prediction tools, including PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>), and Alamut (<https://www.interactive-biosoftware.com/>). Changes affecting the splice site were investigated with Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF/>).

### Family 8, 11

Dystonia Targeted Gene Panel Sequencing was performed in Sheffield University Hospital, as previously described (<https://www.sheffieldchildrens.nhs.uk/download/321/ngs/9793/next-generation-sequencing-v8.pdf>)

### Family 18

Genomic DNA was extracted from EDTA blood using standard methods. Libraries were prepared with either an AmpliSeq custom targeted gene panel (Thermo Fisher Scientific), a custom SureSelect XT gene panel, or a virtual gene panel extracted from SureSelect XT

Human All Exon v6, SureSelect XT Human All Exon v7, or SureSelect XT Clinical Research Exome (Agilent Technologies). The libraries were sequenced on the Ion Torrent PGM system (Thermo Fisher Scientific) for the custom panels, or the NextSeq 550 (Illumina) or the NovaSeq 6000 (Illumina) for virtual panels extracted from exomes. For the Ion Torrent PGM data, reads were mapped to hg19 with the torrent suite software (Thermo Fisher Scientific) and variant calling was performed with Strand NGS software. For the NextSeq 550 and NovaSeq 6000 data, reads were aligned to hg19 with the Burrows-Wheeler Aligner and variants were called with Freebayes software.

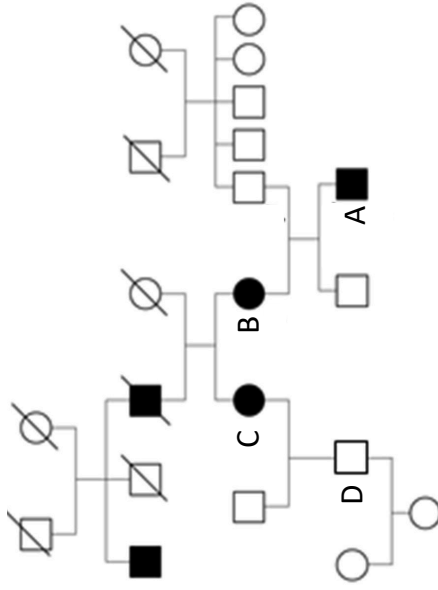
### **CGH-Array (Family 20)**

Genetic analyses were performed after obtaining informed consent. DNA was extracted from the lymphocytes of the patient with the QIAmp DNA Blood kit from Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instruction. Detection of copy number variations (CNV) was performed by comparative genomic hybridization (CGH-array) experiments using a 60 K oligonucleotide microarray (SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 8 × 60K, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The array-CGH procedures were performed in accordance with the manufacturer's instructions. Profiles were analyzed using the CGH-analytics software v2.7 and ADM2 algorithm application. The array-CGH results were analyzed using the GRCh37 genome assembly.

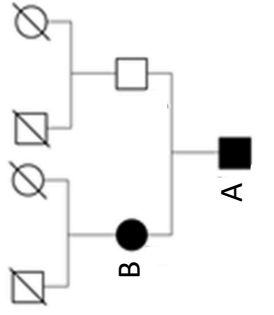


**Pedigrees of the family movement disorders associated with GNAO1-causative variants**

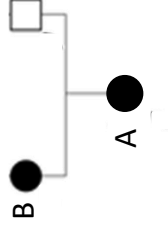
**Family 4**



**Family 6**

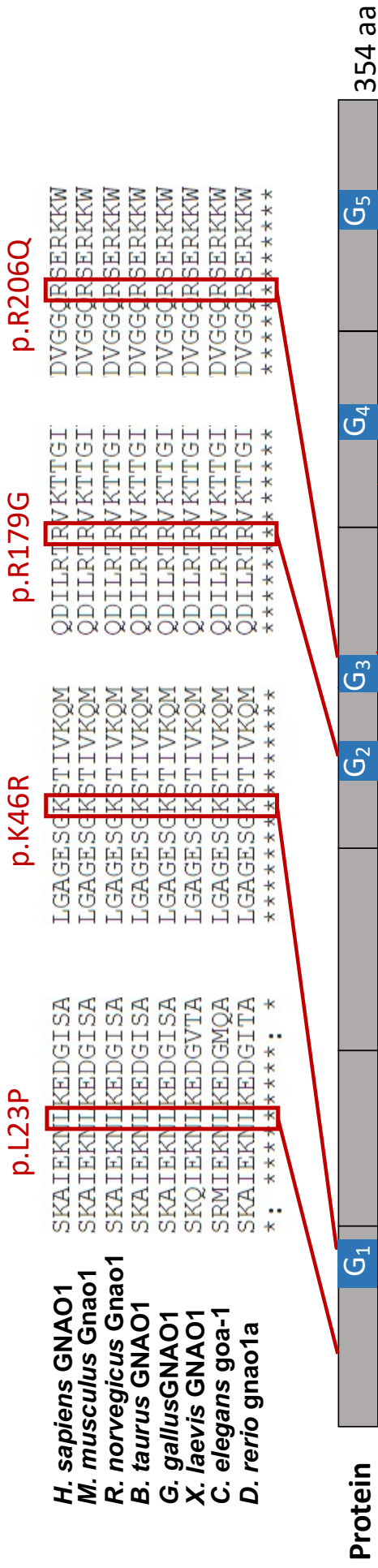


**Family 19**



Letters represent the cases reported in Table-1. Family 4 and Family 6 pedigrees were previously reported elsewhere

Patient ID	Family 1	Family 2	Family 3	Family 4	Family 5	Family 6, 7, 8	Family 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	Family 17	Family 18	Family 19	Family 20
<b>GNAO1 variant</b>	[NM_020988.3] c.68T>C; p.L23P, htz	[NM_020988.3] c.137A>G; p.K46R, htz	[NM_020988.3] c.535A>G; p.R179G, htz	[NM_020988.3] c.617G>A; p.R206Q, htz	[NM_020988.3] c.622G>C; p.E208N, htz	[NM_020988.3] c.644G>A; p.C215Y, htz	[NM_020988.3] c.724-8G>A, htz	[NM_020988.3] c.725A>C; p.N242T, htz	[NM_020988.3]: c.737A>T, p.Glu246Val, htz	[NM_020988.3] c.765dupT; p.N256*, htz	Heterozygous deletion in 16q12.2 (273 to 375kb) encompassing GNAO1
<b>Cadd</b>	24.8	27.2	24.3	29.1	28.1	29.1	24.3	24.7	31	48	/
<b>Polyphen</b>	Probably Damaging (HD score: 1.000)	Probably Damaging (HD score: 1.000)	Probably Damaging (HD score: 0.999)	Probably Damaging (HD score: 0.998)	Probably Damaging (HD score: 1)	Probably Damaging (HD score: 0.998)	/	Probably Damaging (HD score: 1)	Probably damaging ( HD score: 1.0)	Probably Damaging (HD score: 1)	/
<b>SIFT</b>	Deleterious (Score 0.00)	Deleterious (Score 0.00)	Deleterious (Score 0.00)	Deleterious (score: 0.00)	Deleterious (score 0.00)	Deleterious (score: 0.00)	/	Deleterious (score: 0.00)	Deleterious (Score 0.00)	Deleterious (score: 0.00)	/
<b>Mutation Taster</b>	Disease causing	Disease causing	Disease causing	Disease causing	Disease causing (1)	Disease causing	Disease causing	Disease causing	Disease causing	Disease causing	/
<b>Alamut</b>	/	/	/	/	/	/	Splicing abnormality (MaxEntScan: -73.6%)	/	/	/	/
<b>ACMG criteria</b>	PS2, PM1, PM2, PP2, PP3	PS2, PM1, PM2, PP2, PP3	PS2, PM1, PP2, PP3	BS4, PM1, PM2, PP2, PP3	PS2, PM1, PM2, PP2, PP3	PS2, PS4, PM1, PM2, PP1, PP2, PP3	PS2, PS4, PM1, PM2, PM4, PP3	PS2, PM1, PM2, PM4, PP3	PS2, PM1, PM2, PP2, PP3	PVS1, PM2, PP1	PVS1, PS2, PM2
<b>Clinvar</b>	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported	Absent	Not reported	Yes (pathogenic/likely pathogenic)	Not reported	Absent	Not reported	Not reported
<b>Variant class</b>	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Uncertain significance	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic
<b>Inheritance</b>	De novo	De novo	De novo	Autosomal dominant	De novo	Autosomal dominant, De novo	De novo	De novo	De novo	Autosomal dominant	De novo



**H. sapiens GNAO1**  
**M. musculus Gnao1**  
**R. norvegicus Gnao1**  
**B. taurus GNAO1**  
**G. gallusGNAO1**  
**X. laevis GNAO1**  
**C. elegans goa-1**  
**D. rerio gnao1a**

DVGGQRSERKKW  
 DVGGQRSERKKW  
 DVGGQRSERKKW  
 DVGGQRSERKKW  
 DVGGQRSERKKW  
 DVGGQRSERKKW  
 DVGGQRSERKKW  
 DVGGQRSERKKW  
 DVGGQRSERKKW  
 DVGGQRSERKKW  
 \*\*\*\*\*; \*\*\*\*\*

RKKWIHCFEDVTAI  
 RKKWIHCFEDVTAI  
 RKKWIHCFEDVTAI  
 RKKWIHCFEDVTAI  
 RKKWIHCFEDVTAI  
 RKKWIHCFEDVTAI  
 RKKWIHCFEDVTAI  
 RKKWIHCFEDVTAI  
 RKKWIHCFEDVTAI  
 RKKWIHCFEDVTAI  
 \*\*\*\*\*; \*\*\*\*\*

HEDETTNRMHESLMLFDSICNKKFFID  
 HEDETTNRMHESLMLFDSICNKKFFID  
 HEDETTNRMHESLMLFDSICNKKFFID  
 HEDETTNRMHESLMLFDSICNKKFFID  
 HEDETTNRMHESLMLFDSICNKKFFID  
 HEDETTNRMHESLMLFDSICNKKFFID  
 HEDETTNRMHESLMLFDSICNKKFFID  
 HEDETTNRMHESLMLFDSICNKKFFID  
 HEDETTNRMHESLMLFDSICNKKFFID  
 HEDETTNRMHESLMLFDSICNKKFFID  
 HEDETTNRMHESLMLFDSICNKKFFID  
 \*\*\*\*\*; \*\*\*\*\*

**p.E208N**  
**p.C215Y**  
**p.N242T p.E246V p.N256\***

### **Supplementary Table**

In silico tools prediction and variants class of pathogenicity according to the American College of Medical Genetics and Genomics recommendations.

### **Supplementary Figure**

Conservation of affected residues across evolution. All coding sequence variants caused substitution or deletion of evolutionarily conserved amino acids. Homologous sequences were aligned using the Clustal Omega program (see Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. (2013) McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, Cowley AP, Lopez R Nucleic acids research 2013 Jul;41(Web Server issue):W597-600 doi:10.1093/nar/gkt376) on UniprotKB (<https://www.uniprot.org/uniprot/>).

Patient	Drug or intervention	Trial period & dose	Treatment outcome						Please describe treatment effects in detail If quantification of medication outcome is available (BFMDRS or other) please add it here	Side-effects (Yes/No)	Please describe treatment side-effects in detail	
			Dystonia	Extrapyramidal syndrome	Myoclonus	Chores	Seizures	Other symptom (please specify)				
Patient 1-A	Levodopa	3 months 5mg/kg daily Discontinued	Minimally improved	NA	NA	NA	NA	NA	No changes	/	No	/
	Tropatépine	Time period not available 20 mg daily Continuing	Minimally improved	NA	NA	NA	NA	NA	No changes	30% improvement on dystonia	No	/
Patient 3-A	Levodopa	Dosage not available Time period not available Discontinued	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	No changes	No clear response after Levodopa trial	No	/
	Trihexyphenidyl	Time period not available 44+3 mg daily Continuing	Minimally improved	NA	NA	NA	NA	NA	No changes	Good response, significant worsening after an attempt of discontinuation	No	/
	Gabapentin	Time period not available 400+400+300 mg daily Continuing	Minimally improved	NA	NA	NA	NA	NA	No changes	Good response 25% of improvement on BFMDRS dystonia score together with botulinum toxin injection initiation	No	/
	Carbamazepine	Time period not available Dosage not available Continuing	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	Much improved	Seizure free after treatment initiation	No	/
	Tetrabenazine	2 months 5+25+25 mg daily Discontinued	Minimally worsened	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Slight worsening of cervical dystonia	No	/
	Botulinum Toxin-A injection (Cervical dystonia)	Continuing	Much improved	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Good response after injection protocol optimization (25% improvement together with gabapentin initiation)	No	/
Patient 4-A	Levodopa	Tried several months in 2016 300 mg daily Discontinued	No changes	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	/	Yes	irritability
	Tetrabenazine	6 months; 12.5mg/3 per day Discontinued	No changes	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	/	No	/
	Gpi Deep Brain Stimulation	Duration of stimulation 5 years Deep brain stimulation parameters 1,7 V/mA 90 us 130 Hz; E1- Type of device implanted Active RC 3389 leads	Minimally worsened	NA	NA	NA	NA	NA	NA	All the adjustments needed to conclude on ineffective DBS treatment were not completed. No improvement when DBS is switched off.	No	/
	BOTULINUM TOXIN for oromandibular dystonia	Continuing	Minimally improved	NA	NA	NA	NA	NA	NA	/	No	/
Patient 6-A	Levodopa	15 years 400 mg daily Continuing	Minimally improved	NA	NA	NA	NA	NA	NA	/	No	/
	Trihexyphenidyl	15 years 45 mg daily Continuing	Minimally improved	NA	NA	NA	NA	NA	NA	/	No	/
Patient 6-B	Levodopa	6 months 400 mg daily Discontinued	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Subjective improvement with no clear improvement of dystonic movements	No	/
Patient 7-A	Levodopa	Time period not available 562.5 mg days Continuing	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	NA	NA	Subjective improvement with no clear change of dystonic movements	No	/
	Trihexyphenidyl	Time period not available 5 mg days Discontinued	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	NA	NA	/	No	/
Patient 8-A	Trihexyphenidyl	Time period not available 5 mg twice daily Discontinued	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	NA	/	No	/
	Gabapentin	Time period not available 600 mg three times daily Continuing	Minimally improved	NA	NA	NA	NA	NA	NA	/	No	/

Patient 9-A	Levodopa	Time period not available 100/25 mg twice a day Discontinued	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	No improvement	Yes	Nausea
	Trihexyphenidyl	Time period not available 0.1 mg/kg/day Discontinued	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	No efficacy	No	/
	Clonazepam	Time period not available 0.03 mg/kg Discontinued	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	/	Yes	Rash
	Baclofen	Time period not available 70 mg daily Continuing	Minimally improved	NA	NA	NA	NA	NA	/	No	/
Patient 10-A	Levodopa	5mg/kg/day Time period not available Discontinued	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	/	No	/
Patient 11-A	Levodopa	Dose and time period not available Discontinued	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	/	No	/
	Trihexyphenidyl	Time period not available 27 mg daily Discontinued	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	/	No	/
	Gpi Deep Brain Stimulation	Duration of stimulation: 10 years Type of device implanted Active RC	Much improved	NA	NA	NA	NA	NA	BFMDRS improvement of 20% one year after surgery	No	/
Patient 12-A	Levodopa	Time period and dosage not available Discontinued	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	/	No	/
	Trihexyphenidyl	Time period and dosage not available Discontinued	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	/	No	/
	Baclofen	Time period not available 15 mg daily Continuing	Minimally improved	NA	NA	NA	NA	NA	/	No	/
	Gpi Deep Brain Stimulation	Duration of stimulation 12 years DBS settings not available Type of device implanted Active RC	Much improved	NA	NA	NA	NA	NA	20% improvement on BFMDRS 4 years after surgery	No	/
Patient 13-A	Levodopa	For 6 months 300 mg daily Discontinued	No changes	Minimally improved	NA	NA	NA	No changes	Slight amelioration of axial posture.	No	/
	Trihexyphenidyl	Time period not available 12 mg daily Continuing	Much improved	No changes	NA	NA	NA	NA	At the beginning: good control of axial spasms/ dose dependent.	Yes	Neuropsychological (attention) problems at 16 mg/daily.
	Methylphenidate	40 mg LA/day Time period not available Continuing	Minimally improved	No changes	NA	NA	NA	NA	Not otherwise specified in pediatric records , but worsening of axial posture while transient stop.	No	/
	Amantadine	200 mg daily Discontinued	Minimally improved	Minimally improved	NA	NA	NA	NA	Slight improvement of axial posture and gait speed.	No	/
	Gpi Deep Brain Stimulation	Duration of stimulation 13 months Deep brain stimulation parameters 1.2 - 1.6mA/ 140 us /130Hz Type of device implanted Percept PC	Much improved	Minimally worsened	NA	NA	NA	NA	Improvement of axial phasic dystonia, no dystonic storm over a year of stimulation. Worsen of appendicular dystonic posturing and general bradykinesia.	No	/
Patient 14-A	Trihexyphenidyl	Time period not available 6 mg daily Continuing	Minimally improved	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	GMFCS2 - unchanged	No	/
	Acetazolamide	Dosage not available Discontinued	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No effect	No	/
		2 weeks									

	Amantadine	Dosage not available Discontinued	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	Low dose: Short term; Agitated; no improvement	Yes	Agitated
Patient 15-A	Trihexyphenidyl	12 months 4mg/day total: 2 mg, 1mg, 1mg Continuing	Much improved	NA	NA	Much improved	NA	NA	Titrated up from 1 mg nightly for 1 week to 1 mg twice a day x 2 months with marginal improvement in handwriting and diminished drooling. Titrated up to 2 mg, 1mg, 1mg with 50% reduction in amplitude and frequency of involuntary movements	Yes	Mild dry mouth, mild sleepiness
	Tetrabenazine	2 months 12.5 mg tid Discontinued	No changes	NA	NA	Minimally improved	NA	NA	/	Yes	Sleep disturbance, daytime fatigue, lack of energy; did not improve with lowering dosage and was discontinued
Patient 16-A	Levodopa	Time period not available 200 mg daily Discontinued	Much improved	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	Improvement on dystonia	Yes	Nausea and vomiting; led to discontinuation of treatment
Patient 17-A	Levodopa	Time period not available 1200 mg daily Continuing	Much improved	NA	NA	NA	NA	NA	Improvement in dystonia - has residual cervical dystonia	No	None
	Trihexyphenidyl	Time period not available 12 mg daily Continuing	Minimally improved	NA	NA	NA	NA	NA	Improvement in dystonia - residual cervical dystonia	No	None
Patient 18-A	Haloperidol	Time period and dosage not available Discontinued	No changes	No changes	NA	No changes	NA	NA	/	No	/
	Trihexyphenidyl	Time period and dosage not available Discontinued	No changes	No changes	NA	No changes	NA	NA	/	No	/
	Tetrabenazine	Time period and dosage not available Discontinued	No changes	No changes	NA	No changes	NA	NA	/	No	/
	Clonidine	Time period and dosage not available Discontinued	Minimally improved	No changes	NA	No changes	NA	NA	/	No	/
	Gpi Deep Brain Stimulation	Duration of stimulation 10 years Deep brain stimulation parameters not available Type of device implanted: ACTIVA RC	Much improved	No changes	NA	Much improved	NA	NA	Improvement of 50% on SFMDRS 2 years after surgery	No	/
Patient 19-B	Clonazepam	Time period and dosage not available Discontinued	No changes	NA	NA	NA	NA	NA	Before 2000 and follow-up in the Department; no definite benefit reported but occurrence of an epileptic seizure at Clonazepam discontinuation	No	/
	Gpi Deep Brain Stimulation	Duration of stimulation 4 years Deep brain stimulation parameters 1,4 V/mA 60 us 130Hz; E1- Type of device implanted: Itrel II	Much improved	NA	NA	NA	NA	NA	Since surgery was performed, there was no recurrence of painful dystonic spasms in the neck; stimulators were not replaced since 2004; she continues to be followed with a stable clinical examination.	No	/
Patient 20-A	Trihexyphenidyl	20 mg/day Time period not available Continuing	No changes	No changes	No changes	No changes	NA	NA	/	No	/
	Clonazepam	30 days Dosage not available Discontinued	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	/	No	/
	Baclofen	30 mg /days Time period not available Discontinued	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	No changes	/	No	/

Treatment outcome was measured by the clinician using a clinical global improvement scale with 7 ranks: Very much improved, Much improved, Minimally improved, No changes, Minimally worsened, Much worsened, Very much worsened

## **2.3 Dystonie combinée : les syndromes dystonie-parkinsonisme liés aux mutations dans *NR4A2* et *PPP2R5D***

### 2.3.1 Génétique des syndromes dystonie-parkinsonisme

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux causes génétiques manquantes de syndrome dystonie-parkinsonisme de début précoce.

Le syndrome dystonie-parkinsonisme correspond à une forme particulière de dystonie combinée et se définit comme l'association d'une dystonie à un syndrome extrapyramidal (38).

Le syndrome extrapyramidal, ou syndrome parkinsonien, se définit cliniquement par l'association d'une akinésie, c'est-à-dire d'une lenteur et d'une diminution d'amplitude des mouvements volontaires, et d'une hypertonie plastique caractérisée par une résistance au mouvement passif au niveau d'une articulation, non dépendante de la vitesse ou de la direction du mouvement. Le syndrome extrapyramidal peut inclure également mais de façon inconstante un tremblement de repos (109). Il témoigne d'un trouble de la transmission dopaminergique pouvant correspondre à une perte neuronale au niveau de la substantia nigra pars compacta, telle qu'elle peut être observée dans la maladie de Parkinson, qui est la principale cause de syndrome extrapyramidal neurodégénératif sporadique (110).

La dystonie s'associe d'autant plus fréquemment au syndrome extrapyramidal que celui-ci va débiter précocement au cours de la vie (111). Ainsi, les formes génétiques de syndromes parkinsoniens juvéniles vont fréquemment comprendre des mouvements anormaux dystoniques. Pour cette raison, toute dystonie des membres ou généralisée débutant précocement au cours de la vie doit amener à rechercher une dopasensibilité de la symptomatologie, d'une part afin de guider les explorations génétiques et le phénotypage, d'autre part dans l'optique d'améliorer la symptomatologie des patients (1,32).



Parmi les causes génétiques de syndrome dystonie-parkinsonisme de début précoce, on distingue plusieurs entités nosographiques telles que les syndromes dystonie-parkinsonisme liés aux variants bialléliques perte de fonction dans le gène *PRKN* (112). Ces derniers sont responsables d'une authentique maladie de Parkinson juvénile sensible à la lévodopa caractérisée par la présence fréquente d'une dystonie des membres inférieurs, qui peuvent occasionnellement prendre un caractère paroxystique. De façon intéressante, les analyses anatomopathologiques de cerveaux de patients porteurs de mutations bialléliques dans ce gène ne retrouvent habituellement pas de corps de Lewy ou de dépôts d'alpha synucléine, qui est un marqueur pourtant classique de la maladie de Parkinson, mais une perte en neurones dopaminergiques au niveau de la substantia nigra pars compacta (113).

Les variants pathogènes dans le gène *TAF1* sont responsables d'un syndrome dystonie-parkinsonisme de type Lubag, suivant une transmission liée à l'X et incluant de façon inconstante de la chorée et des myoclonies (114). La mutation responsable est un SINE-VNTR-Alu rétrotransposon au niveau de l'intron 32 de *TAF1*, aboutissant à un épissage aberrant et à une rétention partielle de l'intron (73). Cette mutation est caractérisée par un effet fondateur dans la population des Philippines, le diagnostic de cette dystonie dans la population européenne reste ainsi exceptionnel.

Plus fréquents sont les variants pathogènes hétérozygotes dans *ATP1A3* responsables d'un syndrome dystonie-parkinsonisme de début rapide. Les symptômes apparaissent classiquement en quelques jours ou semaines à la suite d'une infection ou de l'exposition à une importante quantité d'alcool. La symptomatologie est ici peu sensible à la lévodopa et tend à rester stable après l'accès, qui peut parfois récidiver (115).

Plus récemment des variants pathogènes hétérozygotes dans le gène *GCH1*, ou bialléliques dans les gènes *TH* et *SEPR*, codant pour des enzymes impliqués dans le métabolisme de la dopamine et associés à une dystonie sensible à la lévodopa ont été mis en évidence dans de tels syndromes dystonie-parkinsonisme (32). Enfin, des tableaux plus complexes de neurodégénérescence par accumulation intracérébrale de fer, à l'image des syndromes liés aux mutations dans *WDR45* (72), *ATP13A2* (116), *PLA2G6* (117) ou *PANK2* (118) sont également responsables de syndromes dystonie-parkinsonisme.

Malgré l'exploration de la plupart de ces différents gènes sur notre cohorte de patients présentant un syndrome dystonie-parkinsonisme de début précoce au travers de l'analyse de notre panel de 127 gènes de mouvements anormaux, un nombre important de patients restaient sans diagnostic moléculaire établi (99). Cela suggérait pour ce phénotype également que des causes génétiques non couvertes par la capture ciblée du panel de gènes de mouvements anormaux pouvaient être à l'origine de la symptomatologie.

Nous avons ainsi appliqué la stratégie exome sur une cohorte de dix patients présentant des formes sporadiques de syndrome dystonie-parkinsonisme de début précoce (avant 40 ans) sans diagnostic moléculaire après l'analyse d'un panel de 127 gènes de mouvements anormaux. L'ensemble de ces patients avaient bénéficié d'explorations exhaustives incluant notamment une IRM cérébrale, une scintigraphie au ioflupane afin de confirmer l'existence d'une dénervation dopaminergique nigro-striatale (119). L'ADN des patients ainsi que de leurs deux parents étaient disponibles pour l'ensemble des cas, permettant d'effectuer un séquençage de l'exome en trio, c'est-à-dire du patient et de ses deux parents.

Nous avons pu identifier pour deux patients deux gènes candidats *NR4A2* et *PPP2R5D*. A l'aide du site internet Genematcher (98), nous avons pu être mis en contact avec d'autres équipes prenant en charge des patients porteurs de variants pathogènes similaires et présentant des phénotypes compatibles et confirmer que les variants pathogènes dans ces deux gènes sont deux nouvelles causes génétiques de syndromes dystonie-parkinsonisme de début précoce.

# **Loss-of-Function Mutations in *NR4A2* Cause Dopa-Responsive Dystonia Parkinsonism**

Thomas Wirth\*, Louise Laure Mariani\*, Gaber Bergant, Michel Baulac, Marie-Odile Habert, Nathalie Drouot, Emmanuelle Ollivier, Alenka Hodžić, Gorazd Rudolf, Patrick Nitschke, Gabrielle Rudolf, Jamel Chelly, Christine Tranchant, Mathieu Anheim, Emmanuel Roze

\* Thomas Wirth and Louise Laure Mariani are co-first authors and contributed equally to this study

**Publié dans *Movement Disorders*, 2020**

## **Loss-of-function mutations in *NR4A2* cause dopa-responsive dystonia-parkinsonism**

Thomas Wirth (MD, MSc)<sup>1\*</sup>; Louise Laure Mariani (MD,PhD)<sup>2,3\*</sup>; Gaber Bergant (MD)<sup>4</sup>;  
Michel Baulac (MD,PhD)<sup>2,3</sup>; Marie-Odile Habert (MD)<sup>5,6</sup>; Nathalie Drouot (Msc)<sup>7</sup> ;  
Emmanuelle Ollivier (MSc)<sup>8</sup>; Alenka Hodžić (PhD)<sup>4</sup>; Gorazd Rudolf (MD)<sup>4</sup>; Patrick  
Nitschke (MSc)<sup>8</sup>; Gabrielle Rudolf (PhD)<sup>1, 7, 9</sup>; Jamel Chelly (MD,PhD)<sup>1, 7, 10</sup>, Christine  
Tranchant (MD,PhD)<sup>1,7, 9</sup>; Mathieu Anheim (MD,PhD)<sup>1, 7, 9</sup>; Emmanuel Roze (MD,PhD)<sup>2,3</sup>

\* Co-first authors, these authors contributed equally to the present work.

1 Département de neurologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

2 Sorbonne Université, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, F-75013, Paris, France

3 Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Department of Neurology, Hôpital Pitié-Salpêtrière, F-75013, Paris, France

4 Clinical Institute of Medical Genetics, University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

5 Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale, LIB, F-75006, Paris, France

6 AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Médecine Nucléaire, F-75013, Paris, France

7 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France

8 Institut IMAGINE, Bioinformatics Platform, Université Paris Descartes, Paris, France

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

10 Laboratoire de Diagnostic Génétique, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

**Corresponding author information:**

**Dr Thomas WIRTH**

Present address:

Service de Neurologie

Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

1, avenue Molière

67098 Strasbourg

France

Phone : +33 (0)3 88 12 87 11

Fax : +33 (0) 3 88 12 85 33

Email: [thomas.wirth@etu.unistra.fr](mailto:thomas.wirth@etu.unistra.fr)

**Manuscript words count: 1585 words**

**Abstract word count: 150 words**

**Keywords:** NR4A2/ Dystonia/ Parkinsonism/ Developmental delay/ Next Generation

Sequencing

**Running title:** NR4A2 mutations cause dystonia-parkinsonism

**Relevant conflicts of interest/financial disclosures:** Nothing to report

**Funding agencies:** T.Wirth was funded by a grant from the Revue Neurologique for this work. The study has been supported by a grant from France Parkinson.

## ABSTRACT

**Background:** The group of dystonia genes is expanding, and mutations of these genes have been associated with various combined dystonia syndromes. Among these latter, the cause of some dystonia-parkinsonism cases remains unknown.

**Objective:** To report patients with early-onset dystonia-parkinsonism due to loss-of-function mutations in *NR4A2*.

**Methods:** Phenotypic characterization and exome sequencing were carried out in two families.

**Results:** The two patients reported here both had a history of mild intellectual disability in childhood and subsequently developed dystonia-parkinsonism in early-adulthood. Brain MRIs were normal and DATscan suggested bilateral dopaminergic denervation. Two frameshift mutations in *NR4A2* were identified, a *de novo* insertion (NM\_006186.3; c.326dupA) in the first case and another small insertion (NM\_006186.3; c.881dupA) in the second.

**Conclusions:** *NR4A2* haploinsufficiency mutations have been recently reported in neurodevelopmental phenotypes. Our findings indicate that dystonia and/or parkinsonism may appear years after initial symptoms. Mutations in *NR4A2* should be considered in patients with unexplained dystonia-parkinsonism.

## Introduction

Dystonia and parkinsonism are frequently combined, particularly in patients with an early-onset 1–5. Several genes have been associated with phenotypes characterized by early-onset dystonia-parkinsonism<sup>1</sup>. *NR4A2* encodes for Nurr1, a transcription factor belonging to the steroid-thyroid hormone and retinoid nuclear receptor superfamily<sup>6</sup> that has been implicated in the development<sup>7</sup> and the survival<sup>8</sup> of substantia nigra dopaminergic neurons. Variants in non-coding regions of *NR4A2* have been suspected to represent susceptibility factors for autosomal dominantly inherited Parkinson's disease<sup>9</sup>. However, subsequent studies did not replicate the above-mentioned finding. Recently, de novo overlapping deletions encompassing *NR4A2* were identified in patients with intellectual disability<sup>10</sup>. Here, we report two patients carrying frameshift insertions in *NR4A2* resulting in dopa-responsive dystonia-parkinsonism, along with previously reported neurodevelopmental deficit.

## Material and Methods

### Patients recruitment

Patient 1 was referred at age 29 for early-onset dystonia-parkinsonism, intellectual disability and epilepsy. Targeted high-throughput sequencing of a panel including 21 genes associated with dystonia and a panel of 127 genes associated with movement disorders were subsequently performed on patient's DNA and failed to identify a causative mutation (see supplemental 1 for respective gene lists). Trio-based Whole Exome Sequencing analysis was then performed to achieve a molecular diagnosis. By submitting the variant in *NR4A2* on the collaborative platform Genematcher<sup>11</sup>, we identified patient 2. This woman was referred at age 57 for the genetic diagnosis of a similar phenotype combining dystonia, parkinsonism and mild intellectual disability and Solo WES was directly performed.

Patient 1, his asymptomatic parents, brother and sister, as well as patient 2 gave written informed consent before all genetic analysis. Patient 1 also gave written informed consent for the video recordings.

### **Whole Exome Sequencing (WES) analysis**

DNA was extracted from blood subjects according to standard techniques. A detailed description of WES procedures and variant prioritization for the two patients is available as supplemental 1. By using these methods, we generated high-quality sequencing data with an average depth of sequencing of 92.9% (>30X) and a mean coverage of 89.3% for patient 1. By sequencing the DNA sample of patient 2, we reached median coverage of 72.1X and covered over 97.1% targeted regions with minimum 30X depth of coverage. Potentially causative variants were characterized according to the American College of Human Genetics and Genomics variant classification<sup>12</sup>.

## **Results**

### **Cases description**

Patient 1 had initially been followed for epilepsy with general tonic-clonic seizures since the age of 26. He presented a previous history of developmental delay characterized by mild ID with prominent language impairment (acquisition of speech at age 4) while he walked normally at the age of 16 months old. His IQ was 56 when assessed at age 37. There was neither consanguinity nor family history of ID, movement disorders, or epilepsy and he was of Caucasian descent. At 29, he presented with right lower limb dystonic postures (Figure 1A), initially paroxysmal and often triggered by mild exercise such as walking. At age 32, paroxysmal episodes of generalized dystonia started, involving the face and trunk. During these episodes, the laryngo-facial component prevented him from talking and swallowing when it occurred during his meal (see Figure 1B and supplemental video 1). A permanent asymmetric



parkinsonian syndrome appeared, with discrete akinesia, rigidity and an upper limbs rest tremor, all prominently affecting the right arm, associated with a mild bilateral postural tremor. Cerebrospinal fluid (CSF) analysis indicated dopaminergic dysfunction with low HVA (94 nmol/L; N=115-488) and a reduced HVA/5HIAA ratio (1.36; N>1.44) consistent with the clinical phenotype of dystonia-parkinsonism. A <sup>123</sup>I-ioflupane SPECT, performed at age 34, showed a reduced uptake, predominating on the putamen (Figure 1C). Cerebral MRI and spectro-MRI were normal (Figure 1D). Treatment with levodopa allowed for total recovery of limbs dystonia and parkinsonism, and a dramatic decrease of the oro-mandibular dystonic episodes (see supplemental video 2). Levodopa daily doses required to control his symptoms increased gradually over the disease course.

The initial symptoms observed in patient 2 were a mild intellectual disability from early-childhood. She had no family history of intellectual disability, movement disorders or epilepsy. She was born from a non-consanguineous union and was of Caucasian descent. No other significant medical condition was noted until she reached the age of 30, when she presented with a left-handed tremor associated with behavioral changes, including physical inactivity and clumsiness. There was a progressive worsening of her condition over the subsequent ten years. She started to experience dystonia, bradykinesia and rigidity, prominently affecting the left side of her body which led to the diagnosis of an early-onset dystonia-parkinsonism syndrome. Similarly to patient 1, the dystonia was paroxysmal and characterized by episodes of abnormal postures, affecting the extremity of the left upper limb associated with involuntary left knee extension as well as ankle and toes joints flexion. These symptoms dramatically improved following the initiation of a dopaminergic treatment combining levodopa/carbidopa and bromocriptine. However, the growing frequency of dystonic episodes over the disease course, as well as the occurrence of gait freezing, led to a subsequent gradual increase of levodopa daily dose, as in patient 1. Brain MRI performed at the age of 50 was normal, apart from a thinning

of the substantia nigra pars compacta (Figure 2A). 123I-ioflupane SPECT showed a reduced uptake (Figure 2B). Neuropsychological assessment revealed multiple cognitive domains impairment including severe memory, attention, visual spatial and executive functions deficits, but language was by contrast globally preserved. At the most recent examination, 27 years after movement disorders onset, the patient's symptoms were well controlled with a dopaminergic treatment combining levodopa/carbidopa/entacapone, pramipexole and rasagiline.

### **Whole Exome Sequencing findings**

Whole Exome Sequencing identified in patient 1 a small de novo frameshift insertion located in exon 3 of the *NR4A2* gene (NM\_006186.3): Chr2(GRCh37):g.157186373dup; c.326dupA; p.Ser110Valfs\*2. According to the ACMG variants classification, the variant was rated as pathogenic (PVS1 + PS2 + PM2 criteria). The mutation was recently reported in a patient showing similarly intellectual disability, language impairment and epilepsy<sup>13</sup>. No other pathogenic or likely pathogenic variation was identified by this analysis (see supplemental 3 for the list of variants of unknown significance identified by WES). Subsequent Sanger sequencing confirmed the presence of the mutation in the patient's DNA and its absence in asymptomatic parents, brother, and sister (Figure 1E).

In patient 2, WES allowed the identification of a small frameshift insertion in exon 4 of the *NR4A2* gene (NM\_006186.3): Chr2(GRCh37):g.157185029dup; c.881dupA; p.(Asn294fs) (Figure 2C). The variant was considered as likely pathogenic according to the ACMG classification (PVS1 + PM2 criteria) and was absent from all public or mutations databases. Segregation analysis was not performed because the patient's parents were both deceased.

## Discussion

We report loss-of-function mutations of *NR4A2* leading to early-onset dopa-responsive dystonia-parkinsonism syndrome in two patients with a previous history of mild intellectual disability.

Converging evidence led us to consider these variations as causative. First, the probability of loss-of-function intolerance was at 0.99 and 1 according to Exac and Gnomad database respectively, knowing that a score above 0.9 is highly suggestive of an extremely intolerant to loss-of-function gene<sup>14</sup>. Additionally, haploinsufficiency score reported for *NR4A2* was 1.28%, which is far below the 10% cutoff proposed to determine haploinsufficiency<sup>15</sup>.

Second, our patients' phenotype shared some similarities with the few previously described cases of *NR4A2*-associated developmental syndromes: the phenotype being mostly neurologic and including mild ID, language impairment and autism spectrum disorders<sup>3</sup>. The same de novo mutation carried by patient 1 was recently reported in a child showing intellectual disability with prominent language impairment together with epilepsy<sup>13</sup>, suggesting a potential mutational hot spot. While this latter, as well as all other patients carrying large *NR4A2* deletions, do not present movement disorders yet, it is noteworthy that most of them are pediatric cases. Since our two patients did not experience any parkinsonian signs before 29 years of age, it is not excluded that these children may develop dystonia and/or parkinsonism features later over the course of the disease. Late appearance of movement disorders during adulthood has been previously reported in developmental encephalopathy, such as Rett syndrome or Beta-propeller associated neurodegeneration due to heterozygous mutations in *MECP2*<sup>16</sup> and *WDR45*<sup>17</sup>, respectively.

A third argument for the implication of *NR4A2* in dystonia-parkinsonism is the previous identification of -291Tdel and -245T>G variants in the 5'-UTR region of *NR4A2* exon 1 in 8 families presenting with autosomal dominantly inherited Parkinson's disease<sup>9</sup>. Two subsequent

screening studies failed to confirm this finding in sporadic and autosomal dominant inherited Parkinson's disease<sup>18,19</sup>. However, experimental data support a role for *NR4A2* in the promotion of substantia nigra neurons survival since Nurr1 activation or increase protect from dopaminergic neuron loss in in vitro and murine models of Parkinson's disease<sup>20–22</sup>. Conversely, heterozygous invalidation of *NR4A2* in mice leads to a progressive loss of dopaminergic neuron in the substantia nigra<sup>23</sup> and the occurrence of parkinsonian features<sup>24</sup>. An ongoing neurodegenerative process targeting dopaminergic neurons of the substantia nigra might thus account for the progressive worsening of dystonia-parkinsonism and the gradual increase in levodopa doses required to control our patients' symptoms.

Our patients are the firsts showing loss-of-function mutations in *NR4A2* and a highly consistent phenotype characterized by dopa-responsive dystonia-parkinsonism preceded by intellectual disability with or without epilepsy and language impairment. We think that follow-up of the few reported patients harboring *NR4A2* deletion may provide further insight into the potential implication of this gene in the dystonia-parkinsonism phenotype. Our findings suggest that *NR4A2* loss-of-function mutations should be considered in patients with a history of mild intellectual disability with a subsequent occurrence of dystonia and parkinsonism in early adulthood. *NR4A2* should also be implemented in the design of future genes panels for the molecular diagnosis of intellectual disability and movement disorders, particularly dystonia-parkinsonism.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to thank the 2 patients and the family of patient 1 for their participation in this study, Bernard JOST from the IGBMC Microarray and Sequencing Platform, the France Parkinson association and the Revue Neurologique for their support.

## **AUTHORS' ROLE**

T Wirth: Conception, execution of the study; Analysis of the data; Writing of the first draft and review of the manuscript.

LL Mariani: Conception, execution of the study; Acquisition of the data; Writing of the first draft and review of the manuscript.

G Bergant: Acquisition of the data, Analysis of the data, review of the manuscript

M Baulac: Acquisition and analysis of the data; Review and Critique of the manuscript.

M-O Habert: Acquisition and analysis of the data; Review and Critique of the manuscript.

N Drouot: Acquisition and analysis of the data; Review of the manuscript

E Ollivier: Acquisition and analysis of the data; Review of the manuscript

A Hodžić: Acquisition of the data, Analysis of the data, review of the manuscript

Go Rudolf: Acquisition of the data, Analysis of the data, review of the manuscript  
P Nitschke: Acquisition and analysis of the data; Review of the manuscript

Ga Rudolf: Acquisition and analysis of the data; Review of the manuscript

Jamel Chelly: Conception, Organization of the study; Analysis of the data; Review and Critique of the manuscript.

C Tranchant: Conception, Organization of the study; Analysis of the data; Review and Critique of the manuscript.

M Anheim: Conception, Organization of the study; Review and Critique of the manuscript.

E Roze: Conception, Organization of the study; Analysis of the data; Review and Critique of the manuscript.

## FINANCIAL DISCLOSURES

T.W. received research supports grants from the Revue Neurologique, the Fondation Planiol, the APTES associations and travels funding from the ANAINF and LVL medical; LL.M. has received research support grants from INSERM, JNLF, The L'Oreal Foundation; speech honoraria from CSL, Sanofi-Genzyme, Lundbeck, Teva; consultant for Alzprotect and received travel funding from the Movement Disorders Society, ANAINF, Merck, Merz, Medtronic, Teva and AbbVie, outside the submitted work. C.T. received honoraria from Allergan and Merz; E.R received research support from Merz-Pharma, Orkyn, Aguetant, Elivie, Ipsen, Fondation Desmarest, AMADYS, Agence Nationale de la Recherche, and Fonds de Dotation Brou de Laurière; has served on scientific advisory boards for Orkyn, Aguetant, Merz-Pharma and has received honoraria from Orkyn, Aguetant, Merz-Pharma, and Medday-Pharma; M. A. received honoraria from Teva, Merz, AbbVie, Actelion, Johnson and Johnson, Aguetant, Orkyn, LVL, Elivie.

The other authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, et al. Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord* 2013;28(7):863–73.
2. Haggstrom L, Darveniza P, Tisch S. Mild parkinsonian features in dystonia: Literature review, mechanisms and clinical perspectives. *Parkinsonism Relat Disord* 2017;35:1–7.
3. Balint B, Bhatia KP. Isolated and combined dystonia syndromes - an update on new genes and their phenotypes. *Eur J Neurol* 2015;22(4):610–7.
4. Gitiaux C, Roze E, Kinugawa K, et al. Spectrum of movement disorders associated with glutaric aciduria type 1: a study of 16 patients. *Mov Disord* 2008;23(16):2392–7.
5. Kasten M, Hartmann C, Hampf J, et al. Genotype-Phenotype Relations for the Parkinson's Disease Genes *Parkin*, *PINK1*, *DJ1*: MDSGene Systematic Review. *Mov Disord* 2018;33(5):730–41.
6. Wang Z, Benoit G, Liu J, et al. Structure and function of *Nurr1* identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 2003;423(6939):555–60.
7. Zetterström RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T. Dopamine neuron agenesis in *Nurr1*-deficient mice. *Science* 1997;276(5310):248–50.
8. Decressac M, Volakakis N, Björklund A, Perlmann T. *NURR1* in Parkinson disease—from pathogenesis to therapeutic potential. *Nature Reviews Neurology* 2013;9(11):629–36.
9. Le W-D, Xu P, Jankovic J, et al. Mutations in *NR4A2* associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet* 2003;33(1):85–9.
10. Lévy J, Grotto S, Mignot C, et al. *NR4A2* haploinsufficiency is associated with intellectual disability and autism spectrum disorder. *Clin Genet* 2018;94(2):264–8.
11. Sobreira N, Schiettecatte F, Valle D, Hamosh A. GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. *Hum Mutat* 2015;36(10):928–30.
12. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405–24.
13. Ramos LLP, Monteiro FP, Sampaio LPB, et al. Heterozygous loss of function of *NR4A2* is associated with intellectual deficiency, rolandic epilepsy, and language impairment. *Clinical Case Reports* 2019;7(8):1582–4.
14. Fuller ZL, Berg JJ, Mostafavi H, Sella G, Przeworski M. Measuring intolerance to mutation in human genetics. *Nat Genet* 2019;
15. Huang N, Lee I, Marcotte EM, Hurler ME. Characterising and Predicting Haploinsufficiency in the Human Genome. *PLOS Genetics* 2010;6(10):e1001154.

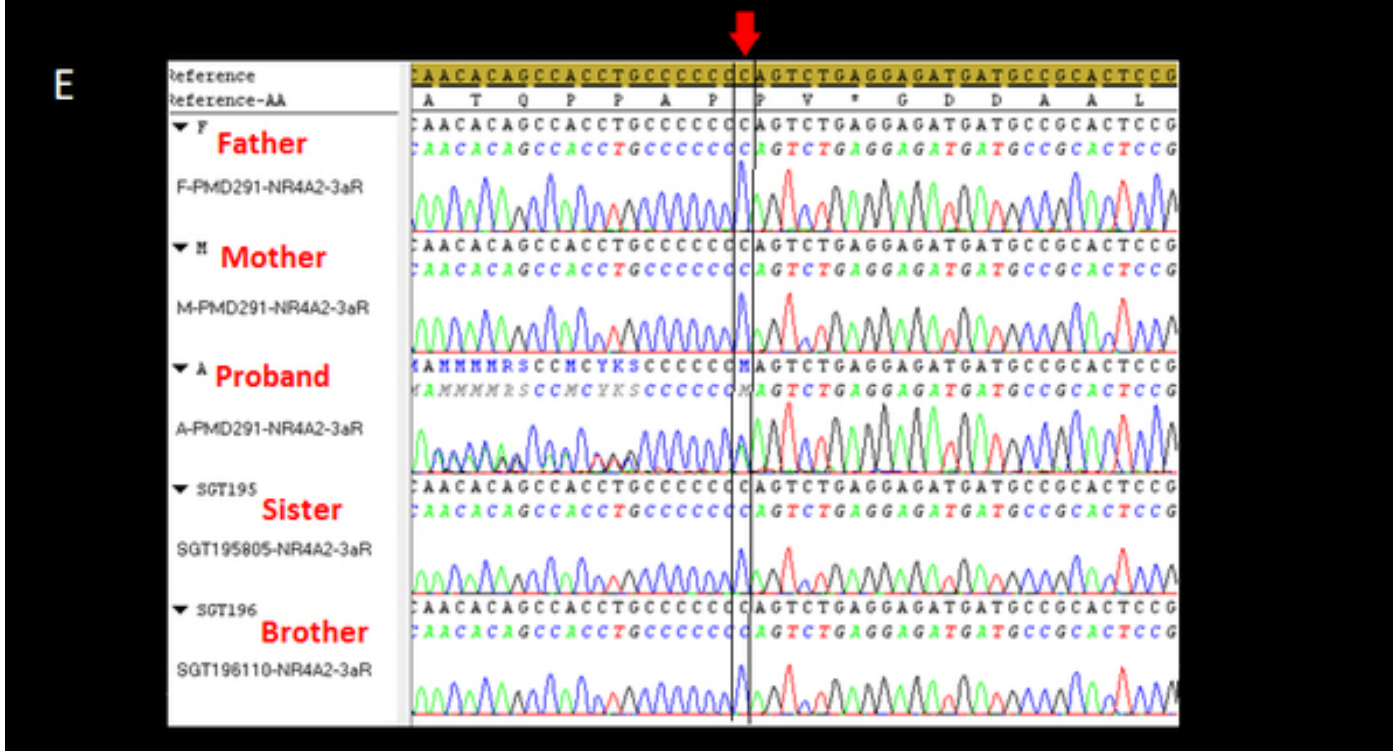
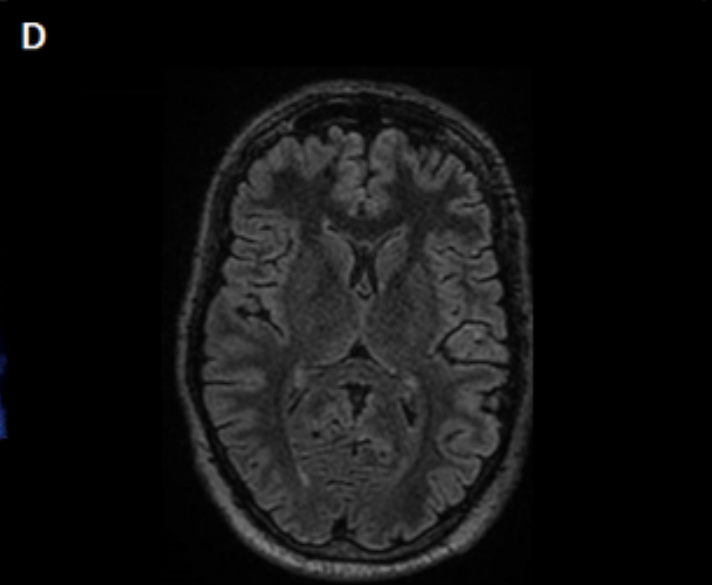
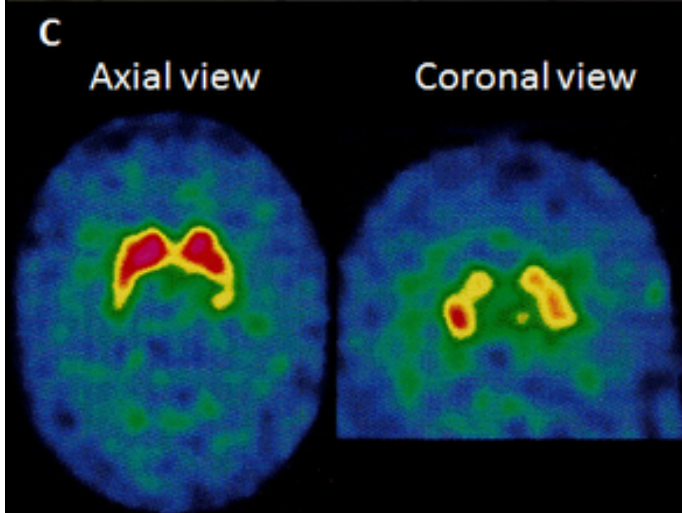
16. Roze E, Cochen V, Sangla S, et al. Rett syndrome: an overlooked diagnosis in women with stereotypic hand movements, psychomotor retardation, Parkinsonism, and dystonia? *Mov Disord* 2007;22(3):387–9.
17. Saitsu H, Nishimura T, Muramatsu K, et al. De novo mutations in the autophagy gene WDR45 cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat Genet* 2013;45(4):445–9, 449e1.
18. Hering R, Petrovic S, Mietz E-M, et al. Extended mutation analysis and association studies of Nurr1 (NR4A2) in Parkinson disease. *Neurology* 2004;62(7):1231–2.
19. Ibáñez P, Lohmann E, Pollak P, et al. Absence of NR4A2 exon 1 mutations in 108 families with autosomal dominant Parkinson disease. *Neurology* 2004;62(11):2133–4.
20. Spathis AD, Asvos X, Ziavra D, et al. Nurr1:RXR $\alpha$  heterodimer activation as monotherapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci* 2017;114(15):3999–4004.
21. Sun C, Wang Y, Mo M, et al. Minocycline Protects against Rotenone-Induced Neurotoxicity Correlating with Upregulation of Nurr1 in a Parkinson's Disease Rat Model. *Biomed Res Int* 2019;2019:6843265.
22. Liu W, Gao Y, Chang N. Nurr1 overexpression exerts neuroprotective and anti-inflammatory roles via down-regulating CCL2 expression in both in vivo and in vitro Parkinson's disease models. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;482(4):1312–9.
23. Jiang C, Wan X, He Y, Pan T, Jankovic J, Le W. Age-dependent dopaminergic dysfunction in Nurr1 knockout mice. *Exp Neurol* 2005;191(1):154–62.
24. Zhang L, Le W, Xie W, Dani JA. Age-related changes in dopamine signaling in Nurr1 deficient mice as a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2012;33(5):1001.e7-16.



## Figure legends:

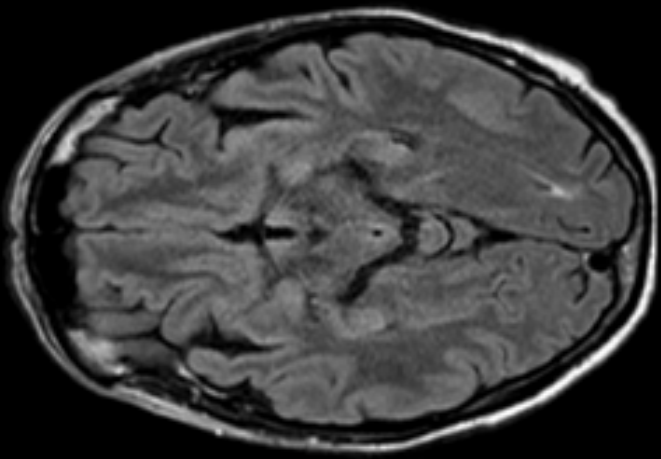
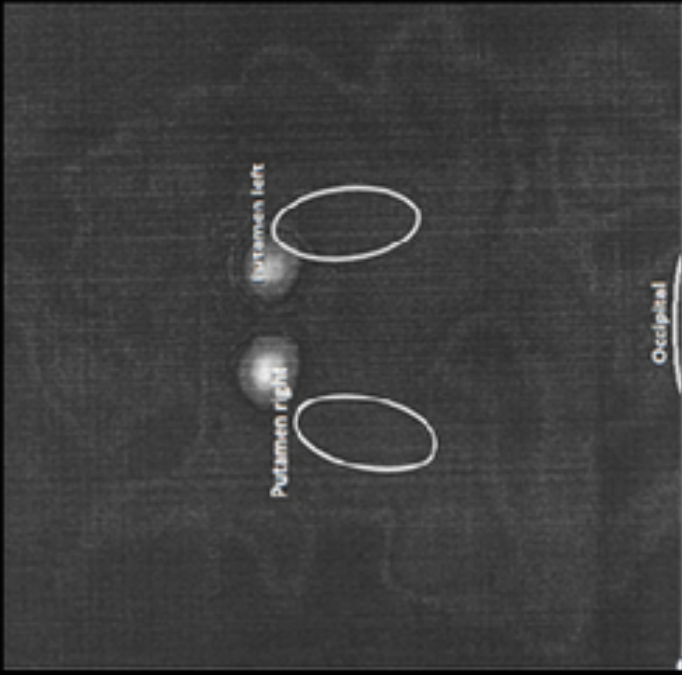
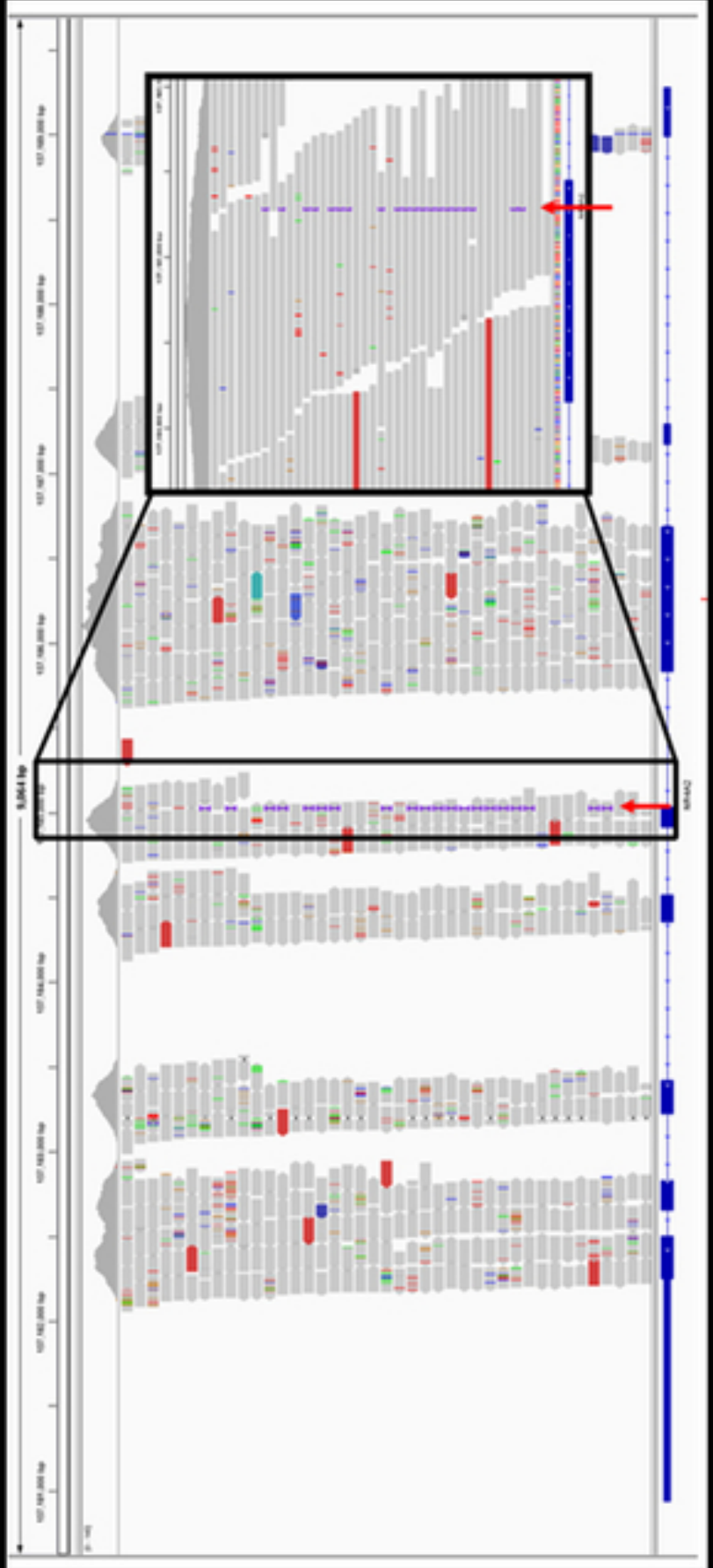
### Figure 1: Clinical, genetic and imaging findings in patient 1

- Figure 1A: Illustration of the abnormal posture of the right lower limb that the patient 1 used to present before levodopa treatment.
- Figure 1B: Picture of the patient 1 as he suffers a paroxysmal dystonic episode involving the face and jaw.
- Figure 1C:  $^{123}\text{I}$ -ioflupane Single Photon Emission Computed Tomography, performed at the age of 34 in patient 1 showing bilateral reduced uptake predominating on the putamen (Figure 1C)
- Figure 1D: Brain MRI of the patient showing no abnormality
- Figure 1E: Sanger sequencing of the (NM\_006186.3) c.326dupA mutation showing the absence of the deletion in the brother's, sister's and the two parents' DNA and its presence in the patient 1's (red arrow), confirming *de novo* inheritance pattern.



## Figure 2: Imaging and genetic findings in patient 2

- Figure 2A: Brain MRI performed at the age of 57 in patient 2 showing thinning of the *substantia nigra* without other abnormalities
- Figure 2B: <sup>123</sup>I-ioflupane Single Photon Emission Computed Tomography performed at the age of 50 in patient 2, showing bilateral reduced uptake
- Figure 2C: Visualization using Integrated Genome Viewer of Next Generation Sequencing data showing the reads covering the region where the variant was identified (red arrow)

**A****B****C**

## **Supplemental:**

- **Supplemental video-1:** Series of paroxysmal episodes of dystonia occurring during a meal as the patient 1 eats and is talking to his parents. The patient suffers several dystonic episodes involving the face and the trunk, and an oro-mandibular and an oro-laryngeal component preventing him from talking and swallowing when it occurs.
- **Supplemental video-2:** The patient is showed walking in the corridor of the hospital after the initiation of a treatment based on levodopa. Abnormal posture of the lower limb has completely disappeared.
- **Supplemental 1:** List of the genes included in the 21 dystonia genes panel, list of the genes included in the 127 movement disorders genes panel and exome sequencing and variations analysis methods
- **Supplemental 2:** Table showing variants characteristics and assessment of pathogenicity of patient 1. Abbreviations: Htz: heterozygous, Hmz: hemizygous, snp: single nucleotide polymorphism, ins: insertion

**List of the genes included in the 127 movement disorders genes panel of Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France**

ABCD1 CIZ1 FTL JPH1 NPC1 SDHA TAF1 ACTB CLN3 FUCA1 KCNA1 NPC2 SDHAF1 TH ADCY5 COASY  
GALC KCNMA1 PANK2 SEPSECS THAP1 ALDH5A1 COL4A1 GAMT LRRK2 PARK2 SERAC1 TIMM8A  
ALDH7A1 COMT GBA MAPT PARK7 SETX TOR1A ANO3 COX15 GCDH MECP2 PDHA1 SGCE TPP1 AP4B1  
CP GCH1 MMADHC PDHX SLC16A2 TUBB4A APTX DCAF17 GIGYF2 NDUFA10 PINK1 SLC19A3 UCHL1  
ARSA DCTN1 GLB1 NDUFA12 PLA2G6 SLC1A3 VPS13A ARX DLD GLRA1 NDUFA2 PLP1 SLC2A1 VPS35  
ATM DNAJC13 GLRB NDUFA9 PNKD SLC30A10 WDR45 ATP13A2 DNAJC6 GM2A NDUFAF2 POLG  
SLC6A3 XK ATP1A3 DRD5 GNAL NDUFAF6 PRKCG SNCA ZFYVE26 ATP6AP2 EIF4G1 GRN NDUFS3  
PRKRA SPG11 ATP7B ETHE1 HEXA NDUFS4 PRNP SPR C19orf12 FA2H HEXB NDUFS7 PRRT2 SUCLA2  
CACNA1A FBXO7 HPRT1 NDUFS8 RAB39B SUOX CACNB4 FOXG1 HTRA2 NKX2-1 RAB7L1 SURF1 CHAC1  
FOXRED1 HTT NOL3 SCP2 SYNJ1

**List of the genes included in the 21 dystonia genes panel of the Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France**

ANO3	DYT24	AD	Dystonia 24	Charlesworth et al., 2012
ATP1A3	DYT12	AD	Dystonia 12	de Carvalho Aguiar et al., 2004
CIZ1	DYT23	AD	-	Xiao et al., 2012
DDC		AR	Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency	Chang et al., 1998
GCH1	DYT5	AD	Dystonia DOPA-responsive with or without hyperphenylalaninemia	Ichinose et al., 1994
GNAL	DYT25	AD	Dystonia 25	Fuchs et al., 2013
PNKD / MR1	DYT8	AD	Paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia	Rainier et al., 2004
PRKRA	DYT16	AR	Dystonia 16	Camargos et al., 2008
PRRT2	DYT10	AD	Episodic kinesigenic dyskinesia 1; Convulsions familial infantile with paroxysmal choreoathetosis	Chen et al., 2011; Meneret et al., 2012
PTS	-	AR	Hyperphenylalaninemia, BH4-deficient A	Thony et al., 1994
QDPR/DHPR	-	AR	Hyperphenylalaninemia, BH4-deficient C	Howells et al., 1990
SGCE	DYT11	AD	Dystonia 11 myoclonic	Zimprich et al., 2001
SLC18A2 / VMAT2	-	AR	-	Rilstone et al., 2013
SLC2A1 / GLUT1	DYT9	AD	Dystonia 9	Weber et al., 2008
SLC6A3 / DAT1	-	AR	Parkinsonism-dystonia infantile	Kurian et al., 2009
SPR	-	AR	Dystonia dopa-responsive due to sepiapterin reductase deficiency	Friedman et al., 2006
TAF1	DYT3	XR	Dystonia-Parkinsonism X-linked	Makino et al., 2007
TH	DYT5b / DYT14	AR	Segawa syndrome recessive	Ludecke et al., 1995
THAP1	DYT6	AD	Dystonia 6 torsion	Fuchs et al., 2009
TOR1A	DYT1	AD	Dystonia 1 torsion	Ozelius et al., 1997
TUBB4 / TUBB4A	DYT4	AD	Dystonia 4 torsion, autosomal dominant	Hersheson et al., 2013

## **Exome sequencing and variations analysis**

For patient 1, an exome capture kit (SeqCap EZ Exome probes; Roche-NimbleGen) was used to target all exons. Exons capture was followed by massive parallel 150pb paired-end sequencing (Illumina, San Diego, CA, USA). Read mapping and variant calling were performed following standard bioinformatics procedures(1). Filtering and prioritization of the variants were conducted using an in house interactive Paris Descartes bioinformatics platform pipeline based on the Ensembl database (release 67)(2). Variants were filtered according to their frequency against the dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), 1000 Genome Project (<http://www.internationalgenome.org/>), ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>) and GenomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org/about>) databases. In silico prediction of variants pathogenicity was performed using SIFT(3), PolyPhen(4) and Mutation Taster(5).

Variations were considered as causative if they fulfilled the following criteria: convincing sequencing quality (minimum depth of coverage of 30 reads) and (i) known disease mutation reported in ClinVar and/or HGMD or (ii) loss-of-function variant in genes intolerant to loss-of-function according to Exac database, or (iii) missense variant predicted deleterious by at least two algorithms, very rare or absent in population databases.

The causative variant was confirmed by PCR amplification followed by Sanger sequencing.

For patient 2, sequencing of the defined clinical target was performed using next-generation sequencing on the isolated DNA sample. The fragmentation and enrichment of the isolated DNA sample were performed according to the protocol Illumina Nextera Coding Exome, with subsequent sequencing on Illumina NextSeq 550 (Illumina, San Diego, CA, USA). After duplicates were removed, the alignment of reads to UCSC hg19 reference assembly was done using BWA algorithm (v0.6.3) and variant calling was done using GATK framework (v2.8). Only variants exceeding the quality score of 30.0 and depth of 5 were used for down-stream analyses. Variant annotation was performed using ANNOVAR and snpEff algorithms, with



pathogenicity predictions in dbNSFPv2 database. Reference gene models and transcript sequences are based on RefSeq database. Structural variants were assessed using CONIFER v0.2.2 algorithm.

After the initial capture of exome sequences using one of the capture kits followed by sequencing on Illumina NextSeq 550 platform, the raw sequence files were processed using a custom exome analysis pipeline, based upon GATK best practices backbone. Population variation resources included an in-house background population variant frequency estimates based on compilation of over 3500 exomes comprising of both patients and family members referred to our institution for sequencing. The Genome Aggregation Database (GnomAD), Exome Aggregation Consortium (ExAC) and UK10K control population were employed as sources of variant frequencies in worldwide populations. For both local database and outside sources the cutoff frequency for variants considered pathogenic was 1%. Consensus calls of dbNSFP v2 precomputed pathogenicity predictions were used for evaluation of pathogenicity for missense variants. Additionally SnpEff predictors were utilized for further annotation of variant effects. GERP++ rejected substitution (RS) scores were used as a fundamental information source of evolutionary sequence conservation. Finally, pipeline included ClinVar as a source of known disease association of identified variants.

The strategy for exome data interpretation was primarily based on the combined disease and phenotype gene target definition approach, which we described previously(6). Information on additional analytical methods used is also available in our previous publications(7).

The interpretation effort in the patient initially focused on the following genes, however open exome analysis was performed due to patient's consent, resulting in the review and interpretation of all captured regions:

**687 genes associated with a clinical sign: Cognitive disorder - HP:0100543** (AASS, ABCA12, ABCA4, ABCB7, ABCC9, ACOX1, ACSL4, ACTA2, ACTB, ACTG1, ACVR1, ADAMTS10, ADAMTSL2, ADAR, ADRA2B, AGA, AGL, AGPAT2, AGTR2, AHI1, AIFM1, AIPL1, AKT1, ALDH18A1, ALDH3A2, ALDH5A1, ALDH7A1, ALG1, ALG12, ALG13, ALG2, ALG3, ALG6, ALG9, ALMS1, ALOX12B, ALX4, AMER1, ANK1, ANKRD11, AP1S2, APTX, ARG1, ARHGAP31, ARHGEF6, ARID1A, ARID1B, ARL13B, ARL2BP, ARL6, ARSB, ARVCF, ARX, ASAH1, ASCL1, ASL, ASPA, ASXL1, ATM, ATP6VOA2, ATP7A, ATP8A2, ATR, ATRIP, ATRX, ATXN1, AUH, B3GALNT2, B3GALT6, B4GAT1, B9D1, BBIP1, BBS1, BBS10, BBS12, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, BCOR, BDNF, BEST1, BLM, BMP2, BMP4, BRAF, BRCA2, BRIP1, BSCL2, BUB1, BUB1B, BUB3, CA2, CA4, CA8, CANT1, CASK, CAV1, CBS, CC2D2A, CCBE1, CCDC78, CD96, CDC6, CDH23, CDHR1, CDKL5, CDT1, CENPE, CENPJ, CEP152, CEP164, CEP290, CEP41, CEP57, CERKL, CHD7, CHN1, CHRM3, CHRNG, CHST14, CIB2, CISD2, CKAP2L, CLCN7, CLMP, CLPP, CLRN1, CNGA1, CNGB1, CNTP2, COL2A1, COL3A1, COL4A1, COMT, COX7B, CRB1, CRX, CSPP1, CTC1, CTD1, CTNS, CTSA, CTSK, CUL4B, CYP27A1, CYP2U1, CYP4F22, DARS2, DCAF17, DCX, DHCR24, DHDDS, DIS3L2, DKC1, DLD, DLG3, DLL3, DMD, DMPK, DNMT3B, DOCK6, DOLK, DPAGT1, DPM1, DSE, DUOX2, DUOXA2, DYM, ECE1, EDN3, EDNRB, EFNB1, EFTUD2, EHMT1, EIF2AK3, EMG1, EMX2, EOGT, EPG5, EPHX1, ERCC1, ERCC2, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERF, ESCO2, EVC, EVC2, EYA1, EYS, EZH2, FAM126A, FAM161A, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, FAT4, FBN1, FGD1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FIG4, FKBP, FKTN, FLNA, FLNB, FMR1, FOS, FOXE1, FOXG1, FRAS1, FREM2, FSCN2, FTSJ1, FUCA1, GAA, GALE, GALT, GATA4, GBE1, GCDH, GDF3, GDF5, GDF6, GDI1, GDNF, GFAP, GHR, GJA1, GJB2, GJB3, GJB6, GJB8, GJC2, GK, GLA, GLI3, GLRA1, GLRB, GNPTB, GNAQ, GNAS, GNPTAB, GNPTG, GORAB, GP1BB, GPC3, GPC6, GPHN, GRIP1, GUCA1B, GUCY2D, GUSB, HARS2, HBA1, HBA2, HCCS, HCF1, HDAC4, HDAC6, HDAC8, HES7, HESX1, HEXB, HIRA, HMGA2, HNF1B, HPRT1, HRAS, HSD17B10, HSD17B4, HSPG2, IDH3B, IDS, IDUA, IFIH1, IFT140, IFT27, IGBP1, IGF1R, IKBKG, IL1RAPL1, IMPDH1, IMPG2, INPP5E, INSR, INVS, IQCB1, IQSEC2, IRF6, ISPD, ITGA7, ITPR1, IVD, IYD, KANSL1, KAT6B, KCND3, KCNJ13, KCNQ2, KCNQ3, KCNT1, KDM5C, KDM6A, KIAA0196, KIAA2022, KIF11, KIF22, KIF7, KIT, KIZ, KLHL7, KMT2D, KRAS, KRT16, KRT17, KRT6A, KRT6B, KRT81, KRT83, KRT86, L1CAM, L2HGDH, LAMP2, LARS2, LCA5, LEMD3, LFNG, LHX3, LHX4, LIG4, LIPA, LIPN, LMBR1, LMNA, LMNB1, LONP1, LRAT, LRP2, LRP5, LTBTP2, LYST, LZTFL1, MAGT1, MAK, MAN2B1, MANBA, MAOA, MAP2K1, MAP2K2, MARS2, MBD5, MBTPS2, MCOLN1, MCPH1, MECP2, MED12, MEF2C, MEIS2, MEOX1, MERTK, MESP2, MGAT2, MGP, MID2, MKKS, MKS1, MLYCD, MMADHC, MPDU1, MTFMT, MTO1, MTRR, MUT, MVK, MYO5A, MYO7A, NAA10, NAGA, NAGS, NBN, NDE1, NDP, NEK2, NEU1, NF1, NFIX, NHP2, NHS, NIPAL4, NIPBL, NKX2-1, NKX2-5, NLRP3, NMNAT1, NOP10, NOTCH1, NPHP1, NPHP3, NPHP4, NR2E3, NRAS, NRL, NRTN, NSD1, NSDHL, NTNG1, NTRK1, OCRL, OFD1, OGDH, OPA3, OPN1, ORC1, ORC4, ORC6, PAH, PAK3, PALB2, PAX1, PAX3, PAX6, PAX8, PCCA, PCCB, PCDH15, PCNT, PDE4D, PDE6A, PDE6B, PDE6D, PDE6G, PEPD, PEX1, PEX10, PEX11B, PEX12, PEX13, PEX14, PEX16, PEX19, PEX2, PEX26, PEX3, PEX5, PEX6, PEX7, PGM3, PHF6, PHF8, PHOX2B, PHYH, PIEZO2, PIGL, PIK3CA, PLP1, POLA1, POLG, POLR1C, POLR1D, POMGNT1, POMGNT2, POMK, PQBP1, POMT1, POMT2, PORCN, POU1F1, PPARG, PQBP1, PRCD, PRKRA1A, PROM1, PROP1, PRPF3, PRPF31, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPH2, PRPS1, PSMB8, PTCH1, PTCH2, PTCHD1, PTSS1, PTEN, PTPN11, PTPN22, PUS1, QDPR, RAB18, RAB39B, RAB39G, RAB39A, RAB39B, RAB39C, RAD21, RAD51C, RAF1, RAI1, RARB, RBBP8, RBP3, RBPJ, RD3, RDH12, RECQL4, RET, RGR, RHO, RIPK4, RLBP1, RMRP, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, RNF213, RNU4ATAC, ROBO3, ROM1, ROR2, RP1, RP2, RP9, RPE65, RPRG, RPRGIP1, RPRGIP1L, RPS6KA3, RTEL1, SAG, SALL1, SAMHD1, SATB2, SBDS, SC5D, SCN4A, SCN8A, SDCCAG8, SDHA, SDHAF1, SEMA3E, SEMA4A, SETBP1, SETD2, SHANK3, SHH, SHOC2, SIL1, SIM1, SIX3, SKI, SLC12A6, SLC16A2, SLC25A19, SLC25A4, SLC26A4, SLC2A1, SLC2A10, SLC46A1, SLC52A2, SLC52A3, SLC5A5, SLC6A19, SLC6A5, SLC6A8, SLC7A14, SLC9A6, SLX4, SMAD4, SMARCA2, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, SMC1A, SMC3, SMO1, SNAI2, SNAP29, SNRNP200, SNX10, SOST, SOX10, SOX11, SOX2, SPATA7, SPINK5, SRCAP, STRA6, STS, SUCLA2, SUFU, SUMF1, SYN1, SYP, TAT, TBC1D20, TBCE, TBX1, TCF12, TCF4, TCIRG1, TCOF1, TCTN1, TCTN2, TCTN3, TERC, TERT, TFAP2B, TG, TGM1, TINF2, TMC01, TMEM138, TMEM216, TMEM231, TMEM237, TMEM240, TMEM5, TMEM67, TMEM70, TNFSF11, TOPORS, TP53, TP63, TPO, TREX1, TRIM32, TSC1, TSC2, TSM, TSHR, TSPAN7, TTC19, TTC37, TTC8, TUB, TUBGCP6, TULP1, TWIST1, UBA1, UBE3A, UBR1, UFD1L, UMPS, UPF3B, USB1, USH1C, USH1G, USH2A, USP9X, VIPAS39, VLDLR, VPS13B, VPS33B, WAS, WDPCP, WDR73, WDR81, WFS1, WIPF1, WNT5A, WRAP53, WT1, XYLT1, YAP1, YARS2, ZBTB20, ZBTB24, ZC4H2, ZDHHC9, ZEB2, ZNF41, ZNF423, ZNF513, ZNF674, ZNF711, ZNF81),

**45 genes associated with a clinical sign: Parkinsonism - HP:0001300** (AFG3L2, APOE, APP, ATP13A2, ATP1A3, ATP6AP2, ATXN3, CHCHD10, CLN3, DCTN1, DNAJC5, DNAJC6, EIF4G1, FMR1, FTL, GCH1, GRN, KIF5A, MAPT, MECP2, NR4A2, PANK2, PARK2, PDGFB, PDGFRB, PINK1, PLA2G6, POLG, PPP2R2B, PRKRA, PRNP, PSEN1, PTS, RAB39B, SLC20A2, SLC30A10, SLC6A3, SNCA, SNCB, SYNJ1, TBP, TH, TMEM240, VPS13A, VPS35, WDR45).

**135 genes in the panel Expanded dystonia panel** (ADAR, ADCY5, ANO3, AP1S2, APTX, ARSA, ARX, ATM, ATN1, ATP13A2, ATP1A2, ATP1A3, ATP7B, ATXN2, ATXN3, BCAP31, BCS1L, C19orf12, CACNA1A, CACNB4, CHMP2B, CIZ1, CLN3, COASY, COX10, COX15, CP, CSTB, DBH, DCAF17, DCTN1, DDC, DHFR, DLAT, DNAJC12, DSC3, ECHS1, ETHE1, FA2H, FBXO7, FOLR1, FOXP2, FTL, GCDH, GCH1, GFAP, GLRA1, GLRB, GNAL, GNAO1, HEXA, HIBCH, HPCA, HPRT1, HTRA2, IFIH1, ISG15, IVD, JPH3, KCNA1, KCNK18, KCNQ2, KCNQ3, KMT2B, MAOA, MECP2, MECR, MR1, MUT, NDUFA1, NDUFA10, NDUFAF2, NDUFAF6, NDUFS4, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NKX6-2, NPC1, NPC2, OCLN, PANK2, PARK2, PARK7, PCCA, PCCB, PDE10A, PDGFB, PDGFRB, PDHA1, PDP1, PINK1, PLA2G6, PNKD, PRKRA, PRNP, PRRT2, PTS, QDPR, RAB39B, SCN1A, SCN8A, SDHA, SERAC1, SGCE, SLC16A2, SLC18A2, SLC19A3, SLC1A3, SLC20A2, SLC25A19, SLC2A1, SLC30A10, SLC39A14, SLC6A3, SLC6A5, SPR, SUCLA2, SUCLG1, SURF1, SYNJ1, TAF1, TBP, TH, THAP1, TIMM8A, TOR1A, TUBA1A, TUBB4A, VAC14, VPS13A, WDR45, WDR73, XPR1, YY1),

**29 genes in the panel Parkinson's disease** (ADH1C, ATP13A2, ATP1A3, CSF1R, DCTN1, EIF4G1, FBX07, GBA, GCH1, GIGYF2, HTRA2, LRRK2, MAPT, NR4A2, PARK2, PARK7, PDE8B, PDXK, PINK1, PLA2G6, POLG, PRKRA, SLC6A3, SNCA, SNCAIP, SNCB, TAF1, TH, UCHL1, VPS35).

1. Broix L, Jagline H, L Ivanova E, Schmucker S, Drouot N, Clayton-Smith J, et al. Mutations in the HECT domain of NEDD4L lead to AKT-mTOR pathway deregulation and cause periventricular nodular heterotopia. *Nat Genet.* nov 2016;48(11):1349-58.
2. Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D, et al. Ensembl 2012. *Nucleic Acids Res.* janv 2012;40(Database issue):D84-90.
3. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 1 juill 2003;31(13):3812-4.
4. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* janv 2013;Chapter 7:Unit7.20.
5. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* avr 2014;11(4):361-2.
6. Maver A, Lovrecic L, Volk M, Rudolf G, Writzl K, Blatnik A, et al. Phenotype-driven gene target definition in clinical genome-wide sequencing data interpretation. *Genet Med.* 2016;18(11):1102-10.
7. Bergant G, Maver A, Lovrecic L, Čuturilo G, Hodzic A, Peterlin B. Comprehensive use of extended exome analysis improves diagnostic yield in rare disease: a retrospective survey in 1,059 cases. *Genet Med.* 2018;20(3):303-12.

## **Early-Onset Parkinsonism is a Manifestation of the PPP2R5D p.E200K Mutation**

Christine Y Kim\*, Thomas Wirth\*, Cécile Hubsch, Andrea H Németh, Volkan Okur, Mathieu Anheim, Nathalie Drouot, Christine Tranchant, Gabrielle Rudolf, Jamel Chelly, Katrina Tatton-Brown, Cornelis Blauwendraat, Jean Paul G Vonsattel, Ety Cortes, Roy N Alcalay, Wendy K Chung

\*These authors contributed equally to this work

**Publié dans *Annals of Neurology*, 2020**

**Title: Early-Onset Parkinsonism is a Manifestation of the *PPP2R5D* p.E200K Mutation**

Running head: Parkinsonism in *PPP2R5D* p.E200K mutation carriers

Christine Y. Kim, MD <sup>\*1,2</sup>; Thomas Wirth, MD, MS <sup>\*3,4,5</sup>; Cécile Hubsch, MD, PhD <sup>6</sup>; Andrea H. Németh, MB.BS, DPhil <sup>7</sup>; Volkan Okur, MD <sup>8</sup>; Mathieu Anheim, MD, PhD <sup>4,5,9</sup>; Nathalie Drouot, MS <sup>5</sup>; Christine Tranchant, MD, PhD <sup>4,5,9</sup>; Gabrielle Rudolf, PhD <sup>4,5,9</sup>; Jamel Chelly, MD, PhD <sup>4,5,10</sup>; Katrina Tatton-Brown, MD <sup>11</sup>; Cornelis Blauwendraat, PhD <sup>12</sup>; Jean Paul G. Vonsattel, MD <sup>13</sup>; Ety Cortes, MD <sup>14</sup>; Roy N. Alcalay, MD, MS <sup>15, 16</sup>; Wendy K. Chung, MD, PhD <sup>8, 17</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurology, Yale School of Medicine, Yale University, New Haven, CT, USA.

<sup>2</sup> Center for Neuroepidemiology and Clinical Neurological Research, Yale School of Medicine, Yale University, New Haven, CT, USA.

<sup>3</sup> Unit of Functional Neurosurgery, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, University College London Hospital, London, UK.

<sup>4</sup> Service de Neurologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

<sup>5</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM-U964/CNRS-UMR7104/Université de Strasbourg, Illkirch-Grattenstaden, France.

<sup>6</sup> Fondation Ophtalmologique A. de Rothschild, Paris, France.

<sup>7</sup> Oxford University Hospitals NHS Trust and University of Oxford, Oxford, UK.

<sup>8</sup> Department of Pediatrics, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY, USA.

<sup>9</sup> Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Strasbourg, France.

<sup>10</sup> Laboratoire de diagnostic génétique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

<sup>11</sup> St. George's University Hospitals NHS Foundation Trust, London, UK.

<sup>12</sup> Laboratory of Neurogenetics, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

<sup>13</sup> Department of Pathology and Cell Biology, Columbia University Medical Center and the New York Presbyterian Hospital, New York, NY, USA.

<sup>14</sup> Department of Pathology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, USA.

<sup>15</sup> Department of Neurology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY, USA.

<sup>16</sup> Taub Institute for Research on Alzheimer's Disease and the Aging Brain, Columbia University, New York, NY, USA.

<sup>17</sup> Department of Medicine, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY, USA.

\*These authors contributed equally to this work.

Title character count: 123; Running head character count: 44

Abstract word count: 100

Introduction word count: 184

Discussion word count: 576

Body word count (excluding title page, abstract, legends, and references): 1500

Table and figure count: Table: 1; Figures: 2

## Abstract

*PPP2R5D*-related neurodevelopmental disorder is characterized by a range of neurodevelopmental and behavioral manifestations. We report the association of early-onset parkinsonism with the *PPP2R5D* p.E200K mutation. Clinical characterization and exome sequencing were performed on three patients, with postmortem neuropathologic examination for one patient. All patients had mild developmental delay and developed levodopa-responsive parkinsonism between the ages of 25 and 40 years. The *PPP2R5D* c.598G>A (p.E200K) mutation was identified in all patients. Neuropathologic examination demonstrated uneven, focally severe neuronal loss and gliosis in the substantia nigra pars compacta, without Lewy bodies. Our findings suggest the *PPP2R5D* p.E200K mutation to be a possible new cause of early-onset parkinsonism.

## Introduction

*PPP2R5D*, primarily expressed in brain, encodes the regulatory subunit B566 of PP2A, a serine–threonine phosphatase playing a crucial regulatory role in multiple cellular processes, including proliferation, apoptosis, and signal transduction.<sup>1</sup> Recurring de novo missense mutations in *PPP2R5D* have been associated with neurodevelopmental delay, intellectual disability, macrocephaly, motor and coordination deficits, epilepsy, visual impairment, and autism spectrum disorders (Mendelian Inheritance in Man (MIM) number 616355).<sup>2–5</sup> Most of these mutations, including p. E200K, occur in a hotspot coding for a conserved acidic ltxjp enabling B56δ to bind the scaffolding and catalytic PP2A subunits.<sup>6</sup> p.E200K might impair this binding, perturbing the holoenzyme formation and hindering dephosphorylation of the normal PP2A substrates through a dominant-negative effect.<sup>3</sup> The associated phenotype of p. E200K appears to be milder, with greater functional capacity than other mutations, but with limited certainty given the condition's rarity. Additionally, given that most confirmed genetic diagnoses of *PPP2R5D*-related disorder are in children, its natural history after 20 years of age

remains largely unknown. We report clinical courses for three adults carrying the *PPP2R5D* p.E200K mutation with mild intellectual disability who developed early-onset parkinsonism. We report postmortem neuropathologic examination for one patient.

## Methods

Cases 1 and 2 were identified through Movement Disorders clinics. Case 3 was identified through an overgrowth study.<sup>4</sup> Genomic DNA was extracted from whole blood. Whole exome sequencing (WES) and Sanger confirmations<sup>4,7,8</sup> and neuropathologic analysis<sup>9</sup> were performed as previously described.

All participation was voluntary. Signed informed consent was obtained from each patient or representative before genetic testing. Patients were enrolled in institutional research studies, approved by the Columbia University Institutional Review Board, Strasbourg Ethics Committee,<sup>10</sup> and London Multicentre Ethics Committee, respectively.

## Results

### *Clinical summaries:*

Case 1: The patient had mild developmental motor and language delays. At 40 years of age, he developed gait difficulty and bradykinesia. Brain magnetic resonance imaging (MRI) demonstrated T2 white matter hyperintensities (Fig 1A). He had co-morbid hypertension and diabetes mellitus. Motor symptoms improved with dopaminergic therapy, gradually complicated by motor and nonmotor fluctuations. Treatment with dopamine agonists was limited by impulse control disorders. At 57 years of age, he underwent implantation for deep brain stimulation, with unclear benefit. He died at 61 years of age from aspiration pneumonia.

Case 2: The patient had no motor delay but had intellectual disability. At 27 years of age, he developed rest tremor and myoclonus, evolving to akinetic rigid parkinsonism. Brain MRI was normal (Fig 1B). Motor symptoms improved with levodopa, limited by motor and nonmotor fluctuations, controlled with carbidopa/levodopa intestinal gel. Treatment with dopamine

agonists was complicated by impulse control disorders. Early nonmotor features of parkinsonism were noted.

Case 3: The patient was previously reported (case COG0328).<sup>4</sup> She was suspected to have Sotos syndrome based on overgrowth features; however, no mutations in *NSDJ* or *NFIX* were identified. She had delays in motor development and language acquisition, with mild intellectual disability. By 22 years of age, she developed rest tremor, incoordination, and parkinsonism with good levodopa responsiveness, ultimately complicated by motor fluctuations including dyskinesias.

Birth history was unremarkable in all cases. No family members were affected. Details of clinical courses are provided in Table and as Supplemental Material (Video SI examination).

#### *Genetic findings:*

In Case 1, the variant *PPP2R5D* c.598 G>A;p.E200K (NM\_006245.3) was identified by proband-only WES, confirmed with Sanger sequencing as present in the patient and absent from his unaffected older sister. This variant was reported as pathogenic by multiple institutions in ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/clinvar/variation/217456/>). Assessment for likely gene-disrupting or deleterious missense variants in known Parkinson's disease (PD) genes was negative. A heterozygous variant in *PARK7* c.70delG; p.Asp24fs (NM\_007262) was identified in the proband and his unaffected sister. The same *PPP2R5D* variant, c.598G>A;p.E200K, was identified through WES in both Cases 2 and 3. The mutation was confirmed by Sanger sequencing in both cases and was absent from both parents in Case 2. Although the parents were unavailable for testing in Case 3, the mutation was presumed de novo because they were reported to be clinically unaffected. No other likely pathogenic variants in genes associated with PD or early-onset parkinsonism<sup>10</sup> were identified in Case 2. Known PD genes were not assessed specifically in Case 3.



### *Neuropathology (Case 1):*

The external brain surface (1,792.2g) was normal except for the presence of bilateral frontal electrodes and atheromatous plaques involving the large arteries of the base (maximum 50% luminal stenosis). Bilateral electrode tracks extended from the cortex to the zona incerta. Transverse slices from the brainstem revealed marked depigmentation of the substantia nigra bilaterally, contrasting with the well-pigmented nucleus coeruleus. Microscopic assessment of the substantia nigra was performed using two levels: one near the red nucleus, the other near the decussation of the superior cerebellar peduncle (Fig 2). Bilateral, uneven loss of pigmented neurons, reactive gliosis, and the presence of scant, small macrophage clusters with pigmented cytoplasmic debris were notable.

The density of pigmented neurons was either apparently normal or mildly to moderately decreased in patches, flanked by areas showing severe loss of pigmented neurons with loose, gliotic parenchyma. Sections from the rostral level were less involved than the caudal. In the left pars compacta, loss of pigmented neurons prevailed medially. In contrast, on the right, loss was severe laterally but moderate medially. The pars reticulata was unremarkable. The dorsal nucleus of the vagus was normal bilaterally. Neither Lewy body-containing neurons nor Lewy neuritis was detected throughout the myelencephalon, mesencephalon, diencephalon, basal forebrain, or cerebral cortex. The nucleus coeruleus showed no abnormality. Marked cribrures involved the polar subcortical white matter and lenticular nuclei; athero-arteriolosclerosis was likewise marked.

### **Discussion**

The association of parkinsonism with a unique recurring de novo mutation, *PPP2R5D* p.E200K, is noteworthy. Although the association between the p.E200K mutation and impaired neurodevelopment is well established, our report is the first linking it to neurodegeneration,

which represents an important advance in understanding of the natural history of this condition. The clinical courses of all three patients are notable for mild intellectual disability and early-onset parkinsonism, with onset from ages 25 to 40 years and variable rates of progression. This phenotype of stable intellectual disability during childhood with subsequent adult-onset parkinsonism has been described with mutations in only a few genes previously.<sup>8,11</sup> All *PPP2R5D* p.E200K cases demonstrated levodopa responsiveness with motor fluctuations; two were complicated by impulse control disorders.

Incidence of the *PPP2R5D* neurodevelopmental disorder is estimated at 2.32 to 2.87 per 100,000 births.<sup>12</sup> The mutation frequency in early-onset PD is unknown. We explored public PD genetic databases for the presence of the p.E200K mutation and did not identify any PD or control carriers, suggesting the variant to be extremely rare in the general population (JJ Kim; MB Makarious; S Bandres Ciga; JR Gibbs; J Ding; D Hernandez; J Brooks; F Grenn; H Iwaki; A Singleton; MA Nalls; G Blauwendraat; and International Parkinson's Disease Genomics Consortium, <https://pdgenetics.shinyapps.io/VariantBrowser/>, manuscript in preparation). Notably, current databases do not distinguish between early-onset, familial, and other PD. We searched for *PPP2R5D* in a University of Strasbourg cohort of 122 patients with parkinsonism, including 60 early-onset and 35 familial cases; we did not identify any pathogenic or likely pathogenic variants. Further clarification will require study of a larger early-onset cohort.

The association of other *PPP2R5D* mutations with neurodegeneration is unknown. Parkinsonism has not been reported in association with other mutations to our knowledge. Increased screening (eg, inclusion of *PPP2R5D* in a genetic panel for early-onset parkinsonism) and longitudinal follow-up of *PPP2R5D* mutation carriers would allow better delineation of phenotype–genotype correlation. Biochemical/functional studies are reported in another manuscript currently under review and suggest alteration in targets of phosphorylation with the

mutation. Identification of the downstream targets of different mutations should help to elucidate the molecular mechanisms underlying neurological manifestations.

The neuropathologic findings represent the first such characterization in a *PPP2R5D* mutation carrier, to our knowledge. Focally severe substantia nigra atrophy and the absence of Lewy body pathology are notable. The absence of  $\alpha$ -synuclein pathology is reminiscent of Parkin-associated PD13 or l-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-related parkinsonism,<sup>14</sup> both of which are thought to be primarily attributable to mitochondrial impairment.<sup>14,15</sup> In contrast to most idiopathic PD cases, the nucleus coeruleus was unaffected here, the sparing of which is also reported in most Parkin-associated PD.<sup>13</sup> PP2A-B56 $\delta$  plays an important role in regulating phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 beta-mediated growth control and tau phosphorylation, but tau deposits were not induced in a *PPP2R5D* knockout mouse model.<sup>16,17</sup> Thus, although neurofibrillary tangles were not noted, we cannot exclude the possibility that altered dephosphorylation of tau might have contributed to the observed neurodegeneration.

We suspect that the noted vascular changes involving the subcortical white matter reflect incidental microvascular disease secondary to the patient's vascular risk factors. Notably, brain MRI in Gase 2 was reassuring for significant white matter abnormalities (Fig 1B). Gase 1 is notable for a heterozygous DJ-1 frameshift variant, very likely to be incidental, given that his asymptomatic sister is also a carrier, only recessive mutations in DJ-1 have been linked to PD, and all DJ-1 PD cases with published neuropathology have demonstrated Lewy body pathology,<sup>18,19</sup> absent here.

Rare neurogenetic conditions associated with intellectual disabilities, autism, and epilepsy are rapidly being identified, meriting further natural history data in adults. Although many will be static, identification of those associated with neurodegeneration or other systemic phenotypes is important. Understanding the precise molecular genetic basis for neurological conditions will allow individualized prognostication and, ultimately, treatment.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Jordan's Guardian Angels, SFARI/Simons Foundation, the France Parkinson organization, the Revue Neurologique and the JPB Foundation. The Columbia Parkinsonism Brain Bank is funded by the Parkinson's Foundation. We thank the patients and their families for their generous contributions. We thank Paul Greene (Yale University) for his clinical care and Kurenai Tanji (Columbia University) for her expert opinion of neuropathology for Case 1. We thank Bernard Jost from the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) Microarray and Sequencing Platform for his support. We thank Emmanuelle Ollivier and Patrick Nistchke from the IMAGINE Institute in Paris for the bioinformatic treatment of the exome data from Case 2. We thank the Childhood Overgrowth Study, based at the Institute of Cancer Research, London, UK.

### **Authorship Contributions:**

Conception and design of study was by W.C. Acquisition and analysis of data was performed for Case 1 by: C.K., V.O., J.P.V., E.C., R.A. and W.C.; for Case 2 by: T.W., N.D., C.H., G.R., M.A., C.T., and J.C.; and for Case 3 by: A.N. and K.T.B.. C.B. conducted database search pertinent to all cases. C.K., T.W., J.P.V., and W.C. drafted a significant portion of the manuscript.

For case 2 T.W., N.D. and G.R. prepared the DNA libraries, interpreted the exome sequencing data and realized the Sanger sequencing. J.C. and T.W. analyzed the additional movement

disorders associated gene panel sequencing data. C.H. clinically assessed the patient, help to realize the figure 2 that reports the imaging findings of this case (DAT-scan and brain MRI) and was actively involved in the discussion focusing on the correlation between the patient's phenotype and mutation. J.C., M.A. and C.T. supervised the genetic analysis, designed the study, and funded the project.

### **Potential Conflicts of Interest:**

The authors report no conflicts of interest.

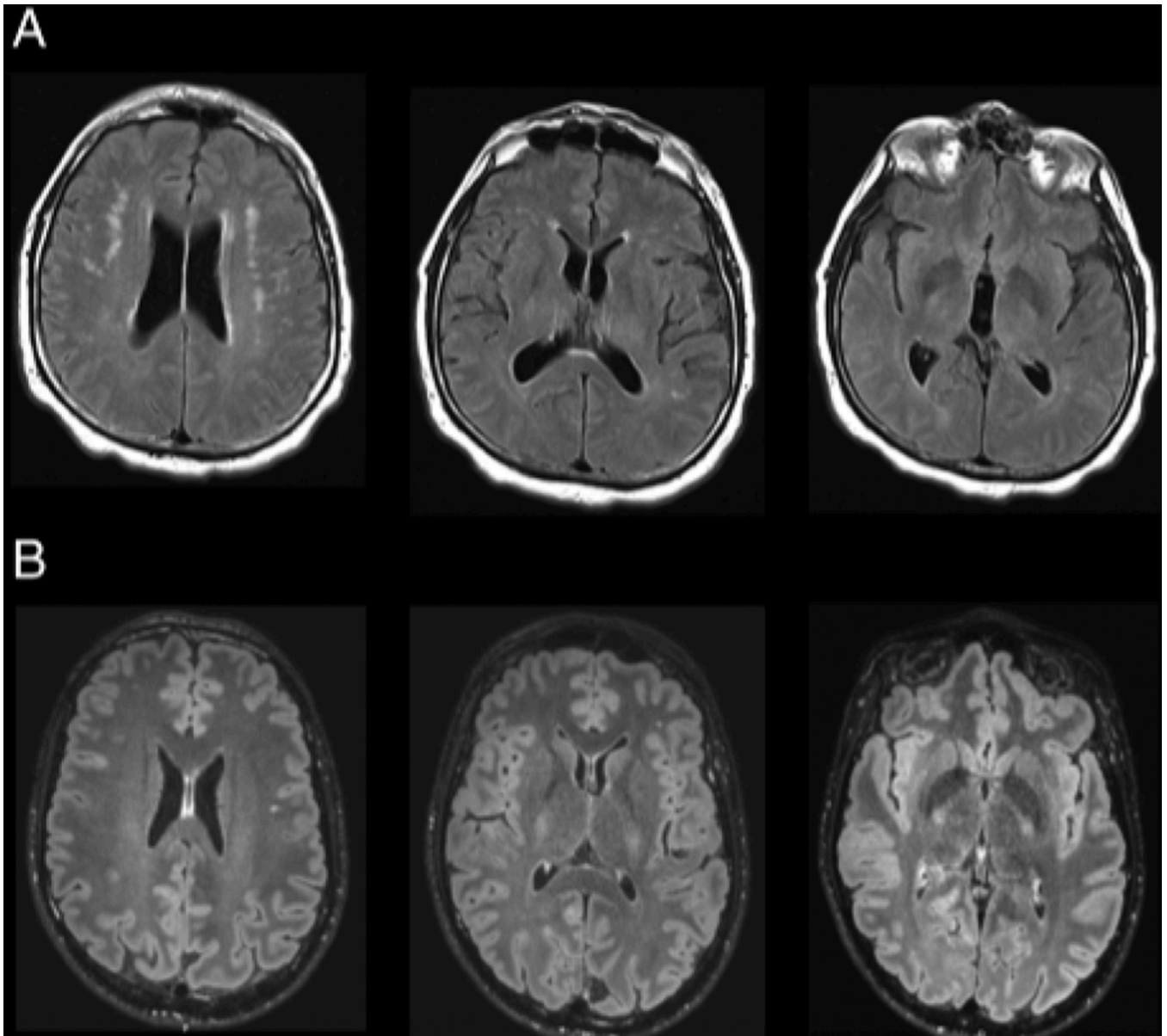
### **References:**

1. Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K, Batra SK. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett* 2013;335:9–18. 10.1016/j.canlet.2013.02.036.
2. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature* 2015;519:223–228. 10.1038/nature14135.
3. Houge G, Haesen D, Vissers LE, et al. B56delta-related protein phosphatase 2A dysfunction identified in patients with intellectual disability. *J Clin Invest* 2015;125:3051–3062. 10.1172/jci79860.
4. Loveday C, Tatton-Brown K, Clarke M, et al. Mutations in the PP2A regulatory subunit B family genes *PPP2R5B*, *PPP2R5C* and *PPP2R5D* cause human overgrowth. *Hum Mol Genet* 2015;24:4775–4779. 10.1093/hmg/ddv182.
5. Shang L, Henderson LB, Cho MT, et al. De novo missense variants in *PPP2R5D* are associated with intellectual disability, macrocephaly, hypotonia, and autism. *Neurogenetics* 2016;17:43–49. 10.1007/s10048-015-0466-9.
6. Cho US, Xu W. Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature* 2007;445:53–57. 10.1038/nature05351.
7. Tanaka AJ, Cho MT, Millan F, et al. Mutations in *SPATA5* are associated with microcephaly, intellectual disability, seizures, and hearing loss. *Am J Hum Genet* 2015;97:457–464. 10.1016/j.ajhg.2015.07.014.
8. Wirth T, Mariani LL, Bergant G, et al. Loss-of-function mutations in *NR4A2* cause dopa-responsive dystonia parkinsonism. *Mov Dis* 2020;35:880–885. 10.1002/mds.27982.

9. Vonsattel JP, Del Amaya MP, Keller CE. Twenty-first century brain banking. Processing brains for research: the Columbia University methods. *Acta Neuropathol* 2008;115:509–532. 10.1007/s00401-007-0311-9.
10. Montaut S, Tranchant C, Drouot N, et al. Assessment of a targeted gene panel for identification of genes associated with movement disorders. *JAMA Neurol* 2018;75:1234–1245. 10.1001/jamaneurol.2018.1478.
11. Saitsu H, Nishimura T, Muramatsu K, et al. De novo mutations in the autophagy gene WDR45 cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nature Genet* 2013;45: 445–449, 9e1. 10.1038/ng.2562.
12. Lopez-Rivera JA, Perez-Palma E, Symonds J, et al. A catalogue of new incidence estimates of monogenic neurodevelopmental disorders caused by de novo variants. *Brain* 2020;143:1099–1105. 10.1093/brain/awaa051.
13. Schneider SA, Alcalay RN. Neuropathology of genetic synucleinopathies with parkinsonism: review of the literature. *Mov Disord* 2017;32:1504–1523. 10.1002/mds.27193.
14. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983;219:979–980. 10.1126/science.6823561.
15. Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 2004; 279:18614–18622. 10.1074/jbc.M401135200.
16. Louis JV, Martens E, Borghgraef P, et al. Mice lacking phosphatase PP2A subunit PR61/B $\delta$  (Ppp2r5d) develop spatially restricted tauopathy by deregulation of CDK5 and GSK3 $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:6957–6962. 10.1073/pnas.1018777108.
17. Yu UY, Yoo BC, Ahn JH. Regulatory B subunits of protein phosphatase 2A are involved in site-specific regulation of tau protein phosphorylation. *Kor J Physiol Pharmacol* 2014;18:155–161. 10.4196/kjpp.2014.18.2.155.
18. Taipa R, Pereira C, Reis I, et al. DJ-1 linked parkinsonism (PARK7) is associated with Lewy body pathology. *Brain* 2016;139:1680–1687. 10.1093/brain/aww080.
19. Narendra DP, Isonaka R, Nguyen D, et al. Peripheral synucleinopathy in a DJ1 patient with Parkinson disease, cataracts, and hearing loss. *Neurology* 2019;92:1113–1115. 10.1212/wnl.00000000000007614.

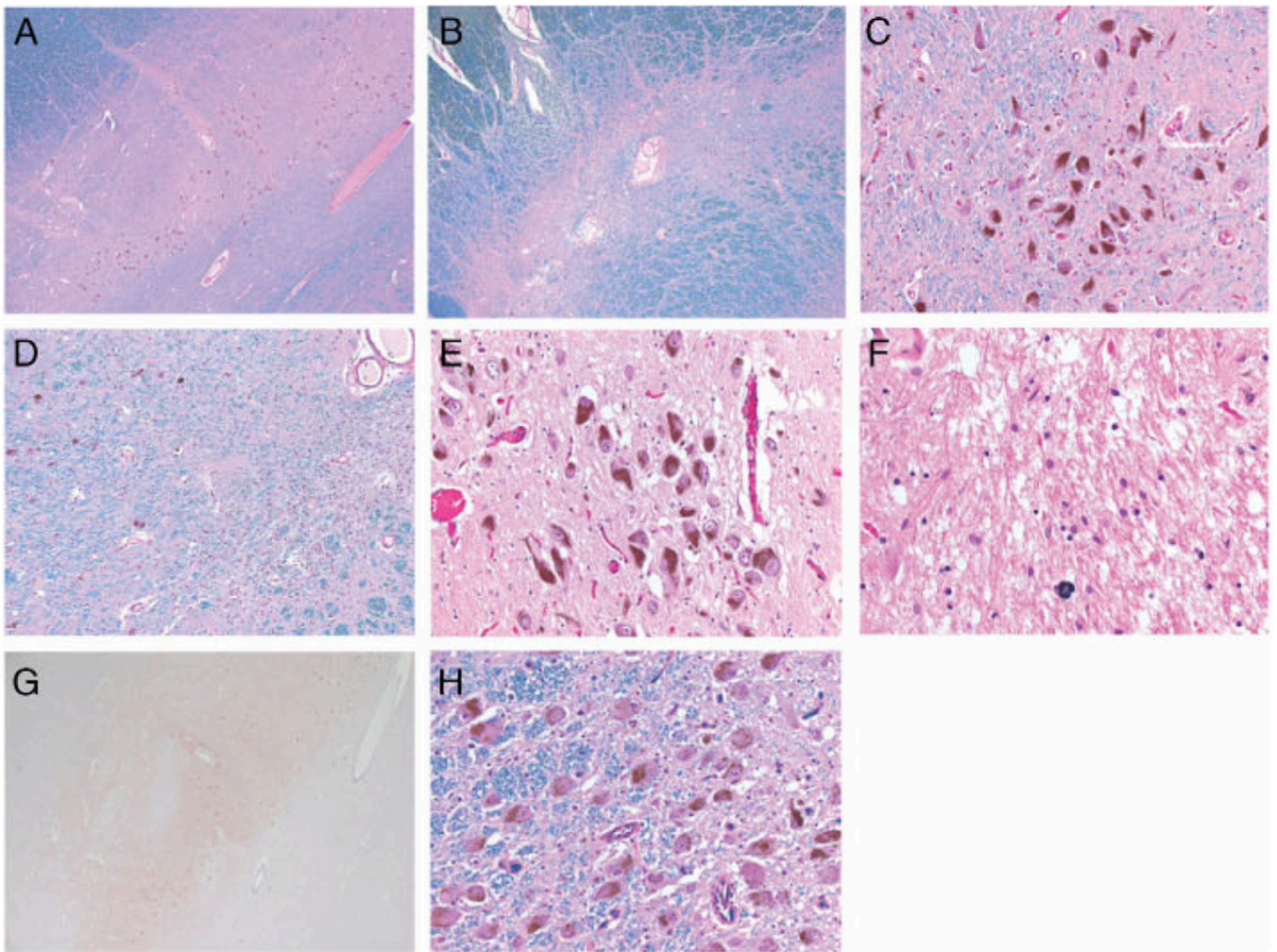
**Figure legends:**

**Figure 1.**



Neuroimaging: Cases 1 and 2. (A) Case 1: magnetic resonance imaging (MRI) brain T2 fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) images demonstrating hyperintensities in subcortical white matter bilaterally. (B) Case 2: MRI brain T2 FLAIR images demonstrating relative paucity of white matter signal abnormality.

**Figure 2.**



(A–D) Photomicrographs of the left substantia nigra: rostral, medial levels in A and C; caudal in B; and caudal, medial levels in D. The loss of pigmented neurons is uneven and prevails at the caudal levels. Relatively sharp demarcation between foci without or with resilient neurons in D. (E–H) Photomicrographs of the caudal levels of the right substantia nigra in E–G and of the nucleus coeruleus in H. (E) The density of pigmented neurons is apparently normal within the medial third. (F) The loss is subtotal within the lateral third. (G) Neither Lewy body-containing neurons nor Lewy neurites were detected. (H) The neuronal density of the nucleus coeruleus is normal. Staining: Luxol Fast Blue counterstained with Hematoxylin and Eosin in A–D and H; Hematoxylin and Eosin in E and F; and a-synuclein in G. Original magnification:  $\times 25$  in A, B, and G;  $\times 100$  in D;  $\times 200$  in C, E, and H; and  $\times 400$  in F.



**Supplemental Material: Video legend**

Motor examination, Case 1 (9 years after symptom onset, 5 hours after levodopa (partial levodopa-OFF state)) demonstrating hypomimia, bradykinesia worse on left, and posturing of right lower extremity.

**Table 1:** *PPP2R5D* (NM\_006245.3) p.E200K mutation carriers and parkinsonism: clinical features

	<b>Case 1</b>	<b>Case 2</b>	<b>Case 3</b>
<i>Ancestry</i>	European	European	European
<i>Sex</i>	Male	Male	Female
<i>Age at last visit</i>	61 yrs.	34 yrs.	44 yrs.
<i>Genetic test</i>	Exome sequencing	Exome sequencing	Exome sequencing
<i>Developmental history</i>	Term birth. Motor delay: walked at 2 - 3 yrs. Language delayed. Mild intellectual disability: special education classes. vocational high school.	Term birth: possible amniotic fluid aspiration). No motor delays. Language delayed. Severe learning disability: stopped schooling at 15 yrs.	Term birth. Motor delay: sat at 9 - 10 mos.; cruised at 2 yrs. Hypotonia. Language delayed. Mild intellectual disability.
<i>Seizures</i>	No	No	No
<i>Past medical history</i>	DM type 2; hypertension; sensorimotor neuropathy	None	Overgrowth (height 97 <sup>th</sup> percentile by 2.5 yrs., macrocephaly)
<i>Parkinsonism: age at onset</i>	40 yrs.	27 yrs.	22 yrs.
<i>Motor features</i>	Onset of gait difficulty generalized bradykinesia; subsequent freezing of gait (FOG). Atremulous.	Onset of right arm rest tremor; subsequently predominantly akinetic-rigid. Postural instability.	Onset of asymmetric rest tremor; subsequent FOG, postural instability, cervical dystonia.
<i>Non-motor features</i>	Autonomic: non-motor off symptoms (sweats, urinary urgency). No cognitive decline.	Autonomic: constipation, urinary urgency. REM sleep behavior disorder. Depression, anxiety. Early cognitive decline.	Autonomic: none. Sleep disturbance: none. Visual hallucinations.
<i>Atypical features</i>	None	Myoclonus; oculomotor abnormalities	None.
<i>Rate of progression</i>	Fluctuations: 9 yrs. after onset. Freezing of gait: 10 yrs. after onset. Wheelchair bound: 17 yrs. after onset.	Fluctuations: 3 yrs. after onset. Postural instability: 5 yrs. after onset. Remains ambulatory without aids.	Slow progression since onset (nearly 20 yrs.).
<i>Diagnostic studies</i>	MRI brain without contrast: subcortical white matter T2 hyperintensities (Fig 1A)	DAT scan: abnormal MRI brain without contrast: normal (Fig 1B) EMG/NCS: normal	None
<i>Levodopa and other treatment response</i>	Levodopa responsive. Deep brain stimulation (subthalamic nuclei, 17 yrs. after onset): unclear benefit	Levodopa responsive.	Levodopa responsive.
<i>Complications of therapy</i>	Motor and non-motor off symptoms. Impulse control disorders (ICDs) (gambling, over-eating) with dopamine agonist	Motor and non-motor off symptoms. ICDs (gambling, hypersexuality) with dopamine agonist.	Fluctuations: motor off symptoms (marked rigidity); dopamine-induced dyskinesias.
<i>Age/cause of death</i>	61 yrs./ aspiration pneumonia	N/A	N/A

## **2.4 Dystonie paroxystique : variants pathogènes dans *TMEM151A* et dyskinésies paroxystiques kinésigéniques**

### **2.4.1 Phénoménologie et génétique des dystonies paroxystiques**

Les dystonies paroxystiques se définissent comme des accès de mouvements anormaux dystoniques de durée brève déclenchés par un stimulus spécifique et persistant après que ce stimulus se soit interrompu (1)

On distingue classiquement trois grands types de dystonies paroxystiques : les dystonies induites par l'effort, les dyskinésies paroxystiques non-kinésigéniques et les dyskinésies paroxystiques kinésigéniques (28).

Les dystonies induites par l'effort peuvent débuter dès l'enfance ou à l'âge adulte. Elles sont déclenchées par l'exercice prolongé, correspondant à au moins 5 minutes d'exercice physique. Les attaques de dystonie durent habituellement entre 5 et 30 minutes et affectent principalement la partie du corps concernée par l'exercice. Les variants pathogènes hétérozygotes dans *SLC2A1*, codant pour GLUT1 un transporteur du glucose au niveau cérébral, sont la principale cause génétique de ce mouvement anormal (120).

Les dyskinésies paroxystiques non kinésigéniques débutent dans l'enfance ou la petite enfance. Les accès de dystonie sont volontiers déclenchés par la consommation de caféine ou d'alcool. Ces derniers durent habituellement de 10 minutes à 1 heure et toujours moins de quatre heures. Elles peuvent répondre aux benzodiazépines. Les variants pathogènes hétérozygotes dans *PNKD* forment la principale cause génétique de ce phénotype (121).

Les dyskinésies paroxystiques kinésigéniques, se définissent comme des accès paroxystiques de dystonie et/ou de chorée durant habituellement moins d'une minute. L'âge de début est habituellement compris entre 1 et 20 ans. Ces dyskinésies sont habituellement déclenchées par le mouvement ou la surprise, et peuvent toucher les membres, le visage ou la face de façon focale, multifocale ou généralisée (27). Les variants pathogènes hétérozygotes dans *PRRT2* sont responsables de 27% à 65% des cas et sont donc la principale cause génétique de ce phénotype (28,122).

En collaboration avec l'équipe de la Pitié Salpêtrière, nous avons collecté l'ADN de 35 patients présentant des dyskinésies paroxystiques kinésigéniques, par ailleurs non porteurs de variants pathogènes dans *PRRT2*. Parmi ces 35 patients, 23 présentaient une forme sporadique, et 12 étaient issus de six familles présentant des dyskinésies paroxystiques suivant un mode de transmission autosomique dominant (deux familles) ou autosomique récessif (4 familles).

Nous avons émis l'hypothèse que d'autres causes génétiques que les variants pathogènes dans *PRRT2* pourraient être à l'origine de ce phénotype. Nous avons appliqué le séquençage de l'exome pour l'ensemble de ces patients non porteurs de variants pathogènes dans *PRRT2* et présentant des dyskinésies paroxystiques kinésigéniques. L'ADN des patients ainsi que de leurs deux parents dans les formes sporadiques ou de transmission autosomique récessive, ou de plusieurs membres symptomatiques de la famille dans les formes dominantes étaient disponibles. Ceci devait permettre d'effectuer des exomes en trio (parents et enfant) dans les formes sporadiques ou associées à un mode de transmission autosomique récessif et des exomes du plus grand nombre de membres de la famille symptomatiques dans les formes suivant un mode de transmission autosomique dominant.

Chez un patient présentant une forme sporadique de dyskinésie paroxystique kinésigénique, nous avons pu identifier un variant délétère de novo dans *TMEM151A*. La publication par plusieurs équipes chinoises de variants pathogènes dans ce gène associés à ce phénotype nous a permis dans un second temps de valider ce gène candidat (123–125).

## 2.4.2 Article 5

# **De Novo Mutation in TMEM151A and Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia**

Thomas Wirth #, Aurélie Méneret #, Nathalie Drouot, Gabrielle Rudolf, Ouhaïd Lagha Boukbiza, Jamel Chelly, Christine Tranchant, Amélie Piton, Emmanuel Roze +, Mathieu Anheim +

# These authors contributed equally and should be considered as co-first authors.

+ These authors contributed equally and should be considered as co-last authors.

**Publié dans Movement Disorders, 2022**

## **De novo mutation in *TMEM151A* and Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia**

Thomas Wirth (MD, MS)<sup>1,2,3\*</sup>, Aurélie Méneret (MD, PhD)<sup>4,5\*</sup>, Nathalie Drouot (PhD)<sup>2</sup>,  
Gabrielle Rudolf (PhD)<sup>1,2,3</sup>, Ouhaïd Lagha Boukbiza (MD)<sup>1</sup>, Jamel Chelly (MD, PhD)<sup>2,3,6</sup>,  
Christine Tranchant (MD, PhD)<sup>1,2,3</sup>, Amélie Piton (PhD)<sup>2,3,6</sup>, Emmanuel Roze (MD, PhD)<sup>4,5+</sup>,  
Mathieu Anheim (MD, PhD)<sup>1,2,3+</sup>

1 Service de Neurologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

2 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, INSERM-U964/CNRS-UMR7104/Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France.

3 Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

4 Département de neurologie, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

5 Sorbonne Université, Institut du Cerveau, INSERM-U1127/CNRS-UMR7225, Salpêtrière hospital, AP-HP, Paris, France.

6 Laboratoire de Diagnostic Génétique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

\*These authors contributed equally and should be considered as co-first authors

+These authors contributed equally and should be considered as co-last authors

### **Corresponding author information:**

#### **Thomas WIRTH**

Neurology department, Strasbourg University Hospital

67098 Strasbourg, France

Phone: +33 (0)3 88 12 87 11

Fax : +33 (0) 3 88 12 85 33

Email : [thomas.wirth@etu.unistra.fr](mailto:thomas.wirth@etu.unistra.fr)

**Manuscript words count:** 477

**Figures and Tables:** 1 Figure

#### **Key words:**

*TMEM151A*

Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia

Next Generation Sequencing

*De novo* mutation

Exome

**Running title:** *TMEM151A* mutation and paroxysmal dyskinesia

**Relevant conflicts of interest/financial disclosures:** No

**Funding agencies:** Thomas Wirth received research grant from the Revue Neurologique for this work. This study was funded by a grant from the Fondation Maladies Rares.

## Manuscript

We read with great interest the article of Tian and colleagues (1). Heterozygous mutations in TMEM151A, encoding a protein of undetermined function, have been very recently associated with paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD) in the Chinese population (1–4). TMEM151A is highly expressed in the brain including the cerebral cortex and the thalamus and is highly conserved among species. To definitively confirm the association between TMEM151A and PKD, other mutations in the same gene should be identified in independent cohorts from different populations.

We applied whole exome sequencing (WES) on 23 French patients with sporadic PKD who were tested negative for PRRT2 mutations, as well as their asymptomatic parents. PKD diagnosis was made by movement disorders specialists according to the consensus clinical criteria (5). WES, bioinformatic analysis and variant prioritization were performed as previously described (6). Variants were classified according to the American College of Human Genetics and Genomics (ACMG) criteria (7). All patients gave written informed consent before genetic testing and a local ethics committee approved the study. We identified a de novo missense variant (c.166G>C [p.Gly56Arg]) in TMEM151A in a single patient (Figure-1) through trio-based exome sequencing. This variant, absent from public databases including Exac, 1000G and GnomAD, led to a substitution in the second transmembrane domain of the protein, near previously reported pathogenic variant such as (c.140T>C [p.Leu47Pro]) or (c.133T>G [p.Cys45Arg]). It was predicted to be damaging by Polyphen, with a CADD score above 20. The phenotype was consistent with previous reports of TMEM151A-related PKD. The patient had no history of infantile seizures and presented with brief attacks of dystonia triggered by voluntary movements, surprise, or stressful events beginning after age 16. Before medication initiation, the patient experienced between 10 and 20 attacks a day, usually lasting a few tens of seconds. Attacks could be focal or generalized, affecting speech or involving face,

the upper and lower limbs, subsequently or simultaneously. The attacks totally ceased after the initiation of low doses of lamotrigine (50 mg/d). This variant was subsequently classified as Likely Pathogenic (class IV) according to the ACMG criteria (PS2 + PM1 + PM2 + PP2 + PP4) (7). No other de novo class IV or V variant was identified in this cohort. TMEM151A mutation was identified in one out of 23 patients of our PRRT2-negative PKD cohort, which is in accordance with the frequency of 4.8% found by Tian et al (1).

We report on a de novo mutation in TMEM151A in a patient with PKD. Our findings confirm TMEM151A variants as a genetic cause of PKD and suggest that de novo mutations in this gene are infrequently responsible for sporadic PKD cases (4). Further works are warranted to refine the phenotype/genotype correlations among TMEM151A-related disorders. Whether TMEM151A is a transmembrane protein involved in synaptic function and whether TMEM151A-related PKD is underpinned by its loss of function also remain to be elucidated.

### **Authors' roles**

T Wirth: conception, execution of the study, analysis of the data, writing of the first draft

A Méneret: conception, execution of the study, analysis of the data, review of the manuscript.

N Drouot: execution of the study, analysis of the data

G Rudolf: execution of the study, analysis of the data

O Lagha Boukbiza: execution of the study

J Chelly: conception, execution of the study; review and critique of the manuscript.

C Tranchant: conception, execution of the study; review and critique of the manuscript.

A Piton: conception, execution of the study; review of the manuscript.

E Roze: conception, organization of the study, execution of the study, review of the manuscript

M Anheim: conception, execution, organization of the study; analysis of the data; review and critique of the manuscript.



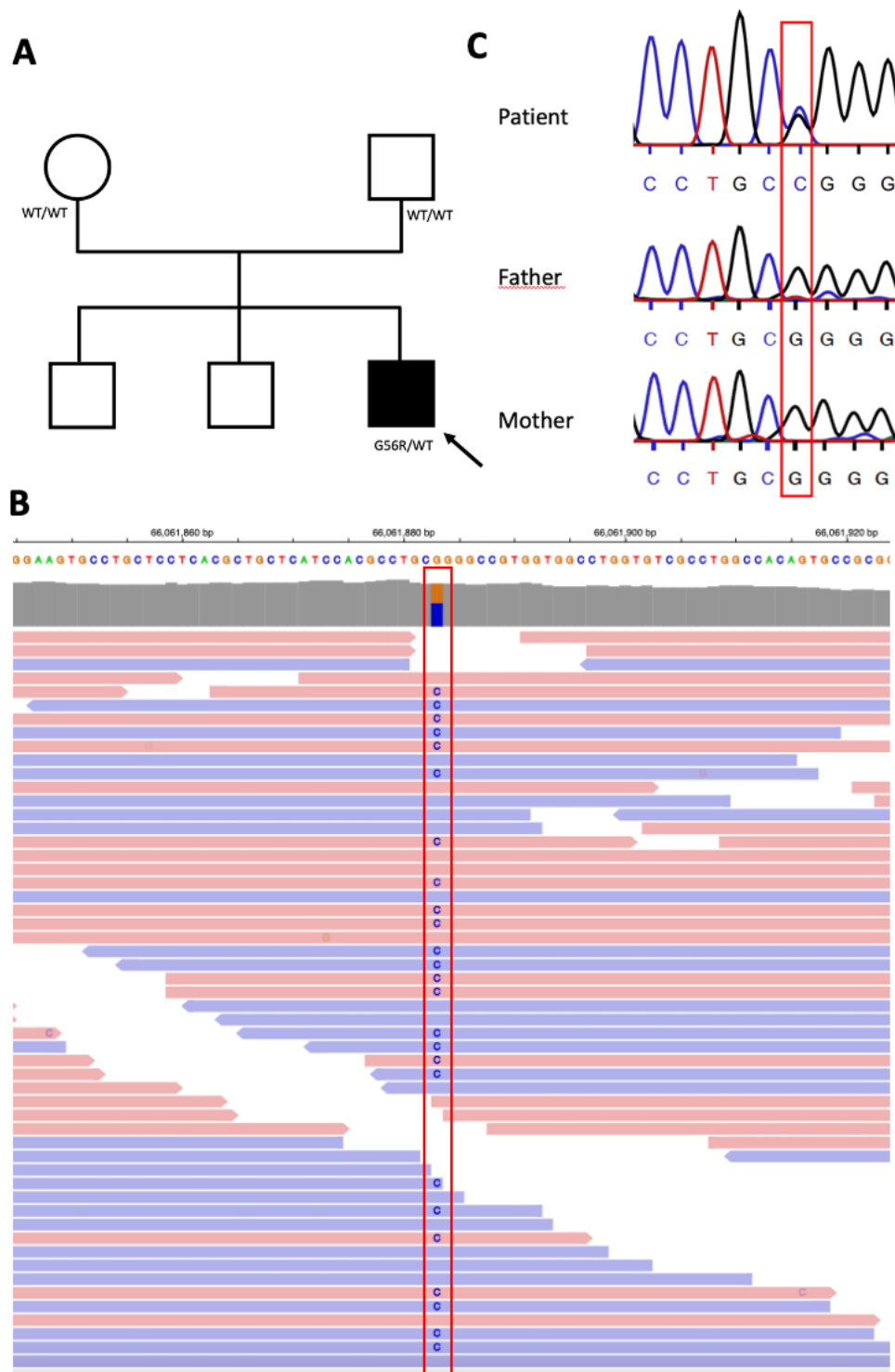
## References

1. Tian W-T, Zhan F-X, Liu Z-H, Liu Z, Liu Q, Guo X-N, et al. TMEM151A Variants Cause Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia: A Large-Sample Study. *Mov Disord.* 24 nov 2021;
2. Li H-F, Chen Y-L, Zhuang L, Chen D-F, Ke H-Z, Luo W-J, et al. TMEM151A variants cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Cell Discov.* 13 sept 2021;7:83.
3. Li Y-L, Lv W-Q, Zeng Y-H, Chen Y-K, Wang X-L, Yang K, et al. Exome-Wide Analyses in Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia Confirm TMEM151A as a Novel Causative Gene. *Mov Disord.* 31 déc 2021;
4. Chen Y-L, Chen D-F, Li H-F, Wu Z-Y. Features Differ Between Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia Patients with PRRT2 and TMEM151A Variants. *Mov Disord.* 27 janv 2022;
5. Méneret A, Grabli D, Depienne C, Gaubebout C, Picard F, Dürr A, et al. PRRT2 mutations: a major cause of paroxysmal kinesigenic dyskinesia in the European population. *Neurology.* 10 juill 2012;79(2):170-4.
6. Wirth T, Tranchant C, Drouot N, Keren B, Mignot C, Cif L, et al. Increased diagnostic yield in complex dystonia through exome sequencing. *Parkinsonism & Related Disorders.* 1 mai 2020;74:50-6.
7. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* mai 2015;17(5):405-24.

## Declaration of competing interest

Thomas Wirth received grants from the Revue Neurologique, the Fondation Planiol and the APTEs organizations and travels funding from LVL medical; Aurélie Méneret received speaker honoraria from Abbvie, Emmanuel Roze received honorarium for speech from orkyn aguettant, elivie and for participating in an advisory board from allergan, research support from Merz-Pharma, Orkyn, Aguettant, Elivie, Ipsen, Allergan, Everpharma, Fondation Desmarest, AMADYS, ADCY5.org, Agence Nationale de la Recherche, Société Française de Médecine Esthétique, Dystonia Medical Research Foundation. The other authors declare no competing interest.

Figure 1



Pedigree of the family (A) and visualization of the (c.166G>C [p.Gly56Arg]) variant (between red lines) in patient within the *TMEM151A* sequence through Integrated Genome Viewer (B): the replacement of the reference G by a C (blue) is present on half of patient's read, meaning heterozygosity. Sanger sequencing of the (c.166G>C [p.Gly56Arg]) variant (between red lines) (C): the variant is present in a heterozygous state in the patient but absent in the two asymptomatic parents, compatible with a de novo occurrence.

## 2.5 Syndrome dystonie et troubles oculomoteurs

### 2.5.1 Présentation du phénotype

En collaboration avec d'autres centres français spécialisés dans les mouvements anormaux, nous avons identifié un phénotype particulier présenté par plusieurs patients associant dystonie multifocale ou généralisée et paralysie de la verticalité du regard.

La paralysie de la verticalité du regard, ou paralysie supranucléaire, se définit comme une diminution de l'amplitude des saccades vers le haut et vers le bas parfois associée à une lenteur et à une augmentation des latences (126). Ce signe clinique particulier marque une atteinte de trois structures du tronc cérébral impliquées dans les mouvements oculaires verticaux : le noyau rostral interstitiel du faisceau longitudinal médian, le noyau interstitiel de Cajal et la commissure postérieure (126). La paralysie de la verticalité du regard est un signe clinique se retrouvant dans plusieurs pathologies neurologiques, elle est alors hautement évocatrice du diagnostic. C'est le cas de la paralysie supranucléaire progressive, une pathologie neurodégénérative sporadique apparaissant autour de 70 ans, associée à une tauopathie et caractérisée par l'association d'un syndrome extrapyramidal et d'une paralysie de la verticalité du regard avec un déclin cognitif à type de syndrome frontal d'évolution rapide (127). La paralysie de la verticalité du regard est également un signe clinique évocateur de pathologies neurogénétiques à l'image de la maladie de Niemann Pick C (128).

Notre cohorte comportait dix patients (sex ratio H/F : 0.66), l'âge de début moyen de la symptomatologie était 27 ans (écart type : 12,3 ans), l'âge moyen au moment de l'évaluation clinique précédant le prélèvement et le séquençage de l'exome était de 37,3 ans (écart type : 11,3 ans). La dystonie était généralisée dans sept cas et multifocale dans trois cas. La dystonie était progressive dans six cas et non progressive dans quatre cas. Les symptômes additionnels incluaient une épilepsie tonico-clonique généralisée dans un cas, un syndrome fronto-dyséxecutif léger dans un cas et un syndrome extrapyramidal dans un cas. Les IRM cérébrales réalisées chez ces patients étaient sans particularités. La dystonie ne répondait pas à la lévodopa pour l'ensemble des cas. Aucun patient ne rapportait une histoire familiale de dystonie.

L'ADN des patients ainsi que de leurs deux parents étaient disponibles pour 5 cas, permettant d'effectuer un séquençage de l'exome en trio. Pour 5 cas, nous ne disposons que de l'ADN du patient. Un séquençage de l'exome en solo (patient seul) fut réalisé pour ces 5 derniers cas, limitant les possibilités d'analyse à la recherche de variants pathogènes déjà rapportés dans Clinvar et HGMD, aux variants perte de fonction dans les gènes intolérants à la perte de fonction et à la recherche de variants et de gènes récurrents identifiés chez les patients ayant bénéficié de l'analyse en trio.

### 2.5.2 Gènes candidats identifiés

Les gènes candidats identifiés sont rapportés dans le tableau 5. Nous n'avons pas pu identifier au sein de cette cohorte de variants délétères dans des gènes récurrents. Nous avons pu déposer ces gènes candidats sur Genematcher, néanmoins nous ne sommes pas parvenus à identifier des patients présentant un phénotype similaire et porteurs de variants pathogènes dans ces gènes.

Nous avons notamment identifié un variant de novo dans le gène *GNAI2* (NM\_002070.4):c.847C>T; p.Pro283Ser chez un patient ayant bénéficié d'un séquençage de l'exome en trio. *GNAI2* code pour la sous unité  $G\alpha_i$  d'une protéine G hétérotrimérique. La similitude du phénotype avec celui rencontré chez les porteurs de variants pathogènes dans *GNAO1* ainsi que la nature du gène nous ont amené à considérer ce gène comme un candidat intéressant.

D'autres variants dans *NCKAP5*, *RAP1GAP*, *WDR33* ou *PITRM1* ont également été identifiés sans que nous ne puissions valider ces gènes candidats faute de récurrence dans notre cohorte et au travers de l'utilisation de Genematcher.

**Tableau 5 :** Variants délétères dans les gènes candidats identifiés au sein de la cohorte de patients présentant une dystonie associée à une paralysie de la verticalité du regard

Gène	Nomenclature	Protéine	Mode de transmission	Fréquence dans GnomAD	Polyphen	SIFT	Mutation taster	Score CADD	Rôle de la protéine
GNAI2	NM_002070.4:c.847C>T	p.Pro283Ser	Autosomique dominant (de novo)	Absent	Probably damaging	Benign	Disease causing	20.2	Code pour la sous unité G $\alpha$ i d'une protéine G hétérotrimérique exprimée au niveau du système nerveux central et des ganglions de la base.
	NM_207363.3:c.1231C>T	p.Arg411Ter	Autosomique dominant (de novo)	Absent	Probably damaging	Deleterious	Disease causing	36	Protéine de fonction inconnue exprimée au niveau du cerveau
RAP1GAP	NM_001145658:c.1456A>G	p.Thr486Ala	Autosomique récessif (hétérozygotie composite)	Absent	Benign	Tolerated	Disease causing	22.5	GTPase exprimée au niveau du cerveau régulant négativement la protéine RAP1. RAP1 joue un rôle dans la croissance et la différenciation cellulaire.
	NM_001145658:c.547A>G	p.Thr183Ala		0.001668	Benign	Tolerated	Disease causing	21.2	
WDR33	NM_018383:c.2104C>T	p.Gln702*	Inconnu	Absent	Probably damaging	Deleterious	Disease causing	37	Protéine d'expression ubiquitaire pouvant jouer un rôle dans le processus de différenciation cellulaire
	NM_001347730:c.2323G>A	p.Val775Ile	Autosomique récessif (hétérozygotie composite)	0.0002887	Possibly damaging	Deleterious	Disease causing	23.7	Enzyme impliquée dans le dégradation du peptide bêta amyloïdogénique. Les variants pathogènes dans ce gène sont associés à des ataxies spinocérébelleuses récessives infantiles.
PITRM1	NM_001347730:c.2302G>A	p.Val768Met		0.0001124	Benign	Tolerated	Polymorphism	15.2	

# 3. Discussion, perspectives et conclusion

### 3.1 Une architecture génétique commune entre dystonie et pathologies neurodéveloppementales

En utilisant le séquençage de l'exome, nous avons identifié dans le premier travail de cette thèse des variants pathogènes ou probablement pathogènes pour 10 des 24 familles incluses, permettant de poser un diagnostic moléculaire chez 34,4 % des patients.

Ce résultat était proche des taux de diagnostic obtenus dans les précédentes études utilisant le séquençage de l'exome dans la dystonie (99–101,108,129–133). De façon intéressante, nous avons noté que la plupart des variants pathogènes ont été identifiés chez des patients présentant une dystonie complexe, en particulier lorsque celle-ci était associée à une déficience intellectuelle. Aucune autre caractéristique clinique n'était significativement associée à un taux de diagnostic plus élevé. En cohérence avec ce résultat, la plupart de ces variants causaux étaient localisés dans des gènes précédemment associés à la déficience intellectuelle comme *CTNNA1* (134) ou *HIBCH* (135), ou à une encéphalopathie épileptique comme *KCNB1* (136). Bien que ce résultat soit préliminaire et nécessite une confirmation dans une cohorte plus large, il suggère un chevauchement génétique et physiopathologique potentiel entre la dystonie et d'autres maladies neurodéveloppementales. Ces gènes devraient donc être soigneusement pris en compte lors de la conception des futurs panels de gènes de la dystonie, afin d'adapter les panels aux dystonies complexes et d'améliorer le taux de diagnostics (137).

Notre travail souligne également l'importance d'un examen neurologique minutieux et complet des patients atteints de dystonie sélectionnés pour une analyse par séquençage haut débit de l'ADN, afin de pouvoir identifier une déficience intellectuelle ou d'autres signes neurologiques permettant de faciliter l'interprétation des données génétiques et de guider le choix de la technique de séquençage haut débit à privilégier. Des stratégies d'analyses plus larges, telle qu'un séquençage du génome, sont probablement à préférer chez ces patients présentant une dystonie s'intégrant dans un tableau clinique complexe.

Notre étude a également contribué à mieux délimiter le spectre phénotypique de plusieurs gènes liés à la dystonie. Outre l'identification de variants délétères dans *GNAO1* pour deux

familles qui feront l'objet du deuxième travail de cette thèse, nous avons identifié un variant faux-sens de novo dans *RELN* chez un patient présentant une dystonie myoclonique. Jusqu'alors, peu de familles incluant des patients porteurs de variants hétérozygotes délétères dans ce gène et présentant une myoclonie-dystonie autosomique dominante avaient été rapportées, l'association entre variant hétérozygote rare dans *RELN* et dystonie myoclonique restant controversée. L'identification d'un variant de novo chez un patient de notre cohorte plaide en faveur d'une l'implication potentielle de variants pathogènes ou probablement pathogènes localisés dans ce gène, dans la survenue de syndromes dystoniques (138).

Notre travail contribue également à reconsidérer le phénotype de l'encéphalopathie liée à *NUS1*. Nous avons ainsi identifié un variant faux sens de novo chez un patient présentant une dystonie myoclonique de début précoce avec déficience intellectuelle mais sans parkinsonisme, épilepsie ou ataxie cérébelleuse, élargissant ainsi le spectre phénotypique associé à ce gène (139–141). Cette découverte suggère également que les spectres cliniques de nombreux gènes associés aux pathologies du neurodéveloppement pourraient être plus larges et comprendre des symptômes supplémentaires apparaissant au cours de la vie. Le suivi des patients présentant des troubles du neurodéveloppement permettra probablement de mieux connaître l'évolution de leurs symptômes à l'âge adulte et de déterminer si certains d'entre eux sont susceptibles de développer un phénotype neurodégénératif plus tardivement (137).

Étonnamment, nous n'avons pas identifié de patients porteurs de variants dans *KMT2B*, bien que ces derniers soient désormais reconnus comme l'une des causes génétiques les plus courantes de dystonies généralisées d'apparition précoce (68).

En définitive, ce premier travail souligne que le séquençage de l'exome, utilisé dans une population de patients sélectionnés, permet d'augmenter le taux d'identification de variants pathogènes ou probablement pathogènes, contribuant à améliorer le diagnostic moléculaire des patients atteints de dystonies complexes.



## 3.2 Le large spectre phénotypique associé aux variants pathogènes dans *GNAO1*

Dans ce deuxième travail, nous avons constitué une large cohorte de patients présentant des phénotypes légers liés à *GNAO1*, confirmant que les variants pathogènes dans ce gène peuvent être une cause génétique de syndromes dystoniques isolés sans encéphalopathie chronique sévère associée.

Le phénotype typique de cette cohorte était ainsi celui d'une dystonie non progressive, généralisée ou segmentaire prédominant au niveau du haut du corps, apparaissant au-delà de la petite enfance et associé à une dysarthrie. Ces phénotypes contrastaient ainsi avec ceux présentés par la plupart des patients précédemment rapportés et souffrant de mouvements anormaux associés à des variants pathogènes dans *GNAO1*, qui présentaient une encéphalopathie hyperkinétique sévère avec des exacerbations dystoniques récurrentes, un retard de développement profond débutant dans la première année de vie (47,104,142).

La topographie de la dystonie prédominait au niveau du haut du corps chez la plupart de nos patients, rappelant les tableaux cliniques associés à d'autres gènes liés à la dystonie, tels que *GNAL* (50) ou *ANO3* (143). Sept patients présentaient également un syndrome extrapyramidal léger, ce qui est cohérent avec le rôle de  $G\alpha_o$  dans la transduction du signal dopaminergique (144) et n'avait pas été rapporté jusqu'à présent dans les tableaux cliniques associés aux variants pathogènes dans *GNAO1*.

Nous avons identifié trois familles autosomiques dominantes où plusieurs membres symptomatiques étaient porteurs de variants hétérozygotes pathogènes, ce qui contrastait avec l'ensemble des patients rapportés qui présentaient des variants pathogènes de novo. De façon intéressante, un porteur du variant (NM\_020988.3):c.617G>A; p.Arg206Gln était resté totalement asymptomatique. Les similitudes entre le phénotype de cette famille et les autres cas - tous ayant une distribution de la dystonie au niveau du haut du corps - plaident en faveur de l'implication de ce variant, alors qu'aucun autre variant de classe IV à V dans un gène lié à la dystonie n'avait été identifié parmi les membres de cette famille.

De plus, il faut noter qu'un membre de cette même famille et porteur de ce variant avait présenté ses premiers symptômes après 40 ans, ce qui signifie que ce porteur asymptomatique de 30 ans pourrait être potentiellement présymptomatique. L'identification d'une autre famille incluant des patients présentant une dystonie suivant un mode de transmission autosomique dominant liée à ce variant (NM\_020988.3):c.617G>A; p.Arg206Gln dans *GNAO1* ainsi que le suivi de ce patient permettront de confirmer si une pénétrance incomplète est possible dans les dystonies liées à *GNAO1*.

La plupart des variants identifiés dans ce deuxième travail n'avaient pas été rapportés parmi les cas précédemment publiés présentant un phénotype sévère, et deux variants étaient récurrents dans plusieurs familles, ce qui suggère que ces phénotypes légers pourraient être liés à des mutations spécifiques. Cependant, les variants que nous avons identifiés étaient proches des hot spot précédemment décrits conduisant à une substitution d'acides aminés dans les mêmes domaines fonctionnels (103). Des études fonctionnelles pourraient être utiles afin de déterminer si ces différents variants ont un impact plus léger sur la fonction de la protéine.

De façon intéressante nous avons identifié deux variants aboutissant putativement à une perte de fonction (un variant non-sens et une délétion du gène entier), affectant vraisemblablement l'expression de la protéine et provoquant en définitive une haploinsuffisance de *GNAO1*. Les 3 porteurs présentaient une dystonie débutant à la fin de l'enfance ou à l'adolescence sans déficience intellectuelle. Ces résultats contrastaient avec les précédents patients porteurs de variants présumés perte de fonction dans *GNAO1*, dans la mesure où des travaux antérieurs avaient suggéré que les variants perte de fonction étaient principalement responsables d'encéphalopathies épileptiques tandis que les mutations gain de fonction étaient principalement associées à un phénotype incluant des mouvements anormaux (103). Des travaux récents suggèrent que les variants pathogènes exercent leurs effets sur la transmission du signal dopaminergique par une combinaison d'effet dominant négatif et de perte de fonction (145).

Au total, notre second travail démontre l'existence d'un phénotype plus léger associé aux variants pathogènes dans *GNAO1*, contribuant à élargir le spectre phénotypique associé à cette condition.

À la suite de la publication de ce manuscrit, Krenn et al. ont publié une réponse à notre publication sous forme de lettre à l'éditeur (146). En réévaluant l'ensemble des données de séquençage de l'exome réalisé sur une cohorte de plus de 1100 patients dystoniques, les auteurs avaient pu identifier une délétion interstitielle hétérozygote en 16q12.2 incluant les exons 4 à 8 de *GNAO1* portés par deux apparentés au premier degré symptomatiques présentant une dystonie légère sans déficience intellectuelle associée. De façon intéressante, ce variant avait été initialement classé comme un variant de signification indéterminées (VUS) puis reclassé probablement pathogène à la suite de la publication de nos travaux. Ce résultat contribue ainsi à confirmer l'association entre l'haploinsuffisance de *GNAO1* et les phénotypes dystoniques légers sans caractéristiques encéphalopathiques.

Notre réponse à cette lettre est disponible en Annexe 1.

### **3.3 Les variants pathogènes dans *NR4A2* et *PPP2R5D*, deux causes génétiques de syndrome dystonie-parkinsonisme**

Dans le troisième travail de cette thèse, nous rapportons deux mutations perte de fonction dans *NR4A2* conduisant à la survenue d'un syndrome dystonie-parkinsonisme d'apparition précoce sensible à la lévodopa chez deux patients ayant un antécédent de déficience intellectuelle légère.

Des preuves convergentes nous ont amené à considérer ces variants comme responsables de la symptomatologie chez ces deux patients. Premièrement, la probabilité d'intolérance à la perte de fonction pour *NR4A2* était respectivement de 0,99 et 1 selon les bases de données Exac et Gnomad, sachant qu'un score supérieur à 0,9 est fortement évocateur d'une intolérance à la perte de fonction. Deuxièmement les phénotypes de nos patients partageaient plusieurs similitudes avec les quelques cas précédemment décrits de troubles du neurodéveloppement associés à *NR4A2* : les phénotypes étant principalement neurologiques et comprenaient une déficience intellectuelle légère, des troubles du langage et des troubles du spectre autistique (147). De façon suprenante, la même mutation de novo portée par notre premier patient avait été récemment rapportée chez un enfant présentant une déficience intellectuelle avec un trouble du langage important ainsi qu'une épilepsie, suggérant un hot

spot mutationnel potentiel (148). Troisièmement, les données expérimentales suggèrent que *NR4A2* joue un rôle dans la promotion de la survie des neurones de la substantia nigra dans la mesure où l'activation ou l'augmentation de Nurr1, la protéine codée par *NR4A2*, protège contre la perte de neurones dopaminergiques dans des modèles in vitro et murins de maladie de Parkinson (149–151). Inversement, l'inactivation hétérozygote de *NR4A2* chez la souris conduit à la perte progressive des neurones dopaminergiques dans la substantia nigra et à l'apparition de signes parkinsoniens (152).

À la suite de la publication de ce travail, plusieurs autres équipes ont indépendamment identifié de nouveaux patients porteurs de variants pathogènes perte de fonction ou faux-sens dans *NR4A2* et présentant une dystonie parfois associée à un syndrome extrapyramidal, confirmant ce gène comme étant associé à un syndrome dystonie-parkinsonisme de début précoce sensible à la lévodopa (153–156).

Concernant le quatrième travail de cette thèse, nous avons identifié la mutation récurrente (NM\_006245.4):c.598G>A ; p.Glu200Lys dans *PPP2R5D* chez trois patients présentant un syndrome parkinsonien juvénile associé à une déficience intellectuelle légère et de façon inconstante à une dystonie ou des myoclonies. Bien que l'association entre les mutations dans *PPP2R5D*, notamment la mutation p.Glu200Lys, et la déficience intellectuelle soit bien établie (157–160), ce travail est le premier à relier ce variant pathogène à une pathologie neurodégénérative, ce qui représente une avancée importante dans la compréhension de l'histoire naturelle de cette affection.

L'analyse neuropathologique d'un des patients de ce travail représente la première caractérisation de ce type chez un sujet porteur d'un variant pathogène dans *PPP2R5D*. Les résultats remarquables étaient l'absence de corps de Lewy, l'absence d'atteinte du locus coeruleus et la perte dopaminergique prononcée au niveau de la substantia nigra, différant en cela de l'aspect classique observé dans la maladie de Parkinson (113). De façon intéressante, cet aspect anatomopathologique est similaire au syndrome dystonie-parkinsonisme lié aux mutations bialléliques dans le gène *PRKN*, dont on suspecte qu'il soit en lien avec une dysfonction mitochondriale (161).

Suite à la publication du manuscrit, une équipe indépendante a rapporté au travers d'une lettre à l'éditeur le cas d'un patient présentant également un syndrome parkinsonien juvénile et porteur d'une mutation (NM\_006245.4):c.752A>T ; p.D251, confirmant l'implication de *PPP2R5D* dans ce phénotype (162). Cette lettre démontre par ailleurs que le syndrome parkinsonien ne relève pas d'un effet spécifique de la mutation p.Glu200Lys, mais est bien une caractéristique du spectre phénotypique associé à l'ensemble des mutations dans *PPP2R5D*. Notre réponse à cette lettre est disponible en Annexe 2.

Depuis, d'autres patients porteurs de mutation dans *PPP2R5D* et présentant un syndrome parkinsonien précoce ont été rapportés (163,164). *PPP2R5D* fait également parti des gènes rapportés comme étant associés à des syndromes dystoniques dans un récent travail portant sur une cohorte de 1100 patients souffrant de dystonie (165). Pris ensemble, ces résultats confirment que le spectre phénotypique associé aux mutations dans *PPP2R5D* comprend un syndrome dystonie-parkinsonisme de début précoce en plus de la déficience intellectuelle.

### **3.4 Les variants pathogènes dans *TMEM151A* sont associés aux dyskinésies paroxystiques kinésigéniques**

Les mutations hétérozygotes de *TMEM151A*, gène codant pour la protéine transmembranaire 151 A, une protéine de fonction indéterminée, ont été très récemment associées aux dyskinésies paroxystiques kinésigéniques dans la population chinoise (123–125). *TMEM151A* est fortement exprimé dans le cerveau, notamment le cortex cérébral et le thalamus et est hautement conservé au cours de l'évolution.

Nous avons identifié un variant faux-sens de novo (NM\_153266.4):c.166G >C ; p.Gly56Arg dans *TMEM151A* chez un patient, en utilisant le séquençage de l'exome en trio. Ce variant, absent des bases de données publiques dont Exac, 1000G et GnomAD, conduisait à une substitution dans le deuxième domaine transmembranaire de la protéine à proximité de variants pathogènes précédemment signalés, tels que (NM\_153266.4):c.140T>C ; p.Leu47Pro ou (NM\_153266.4):c.133T>G ; p.Cys45Arg.

Le variant était prédit damaging par Polyphen et avait un score CADD supérieur à 20. Le phénotype était cohérent avec ceux rapportés chez les patients porteurs de variants pathogènes dans *TMEM151A* et était constitué de brèves attaques de dystonies durant quelques dizaines de secondes, favorisées par le mouvement volontaire.

Ce variant fut classé comme probablement pathogène (classe IV) selon les critères de l'ACMG (PS2 + PM1 + PM2 + PP2 + PP4). Aucun autre variant de classe IV ou V n'a par ailleurs été identifié dans cette cohorte de 23 patients incluant des patients présentant des formes sporadiques de dyskinésies paroxystiques kinésigéniques. La fréquence de ce variant pathogène correspondait ainsi à celle rapportée par Tian et al. (4,8%) (124).

Dans les formes familiales, nous avons également pu identifier des variants d'allure délétère dans différents gènes non rapportés jusqu'à présent dans les dyskinésies paroxystiques kinésigéniques incluant notamment *KCNJ10*, *GRIN2A*, *NLGN1*, et *HUWE1*. Ces gènes candidats ont été déposés sur Genematcher sans que nous ayons pu identifier pour le moment d'autres patients porteurs de variants pathogènes dans ces gènes, permettant de les rapporter en tant que nouvelles causes génétiques de dyskinésies paroxystiques kinésigéniques. Des travaux supplémentaires sur cette cohorte, incluant notamment le séquençage du génome des patients non porteurs de variants dans *TMEM151A* sont prévus à terme afin d'identifier les causes génétiques manquantes de dyskinésies paroxystiques kinésigéniques.

### **3.5 Perspectives pour le groupe de patients présentant une dystonie généralisée associée à des troubles oculomoteurs**

Concernant ce dernier phénotype, nous ne sommes pas parvenus à valider les gènes candidats identifiés en utilisant la stratégie exome sur ce groupe de patients présentant une paralysie de la verticalité du regard associée à une dystonie. Les gènes candidats ont été déposés sur Genematcher sans que nous puissions identifier d'autres patients porteurs de variants pathogènes dans ces gènes et présentant un phénotype compatible avec les sujets de notre cohorte.

S'il n'est pas formellement exclu que les variants identifiés dans ces gènes candidats soient responsables de la symptomatologie chez nos patients présentant ce phénotype spécifique, l'absence de retour sur Genematcher suggère que ces variants ne correspondent pas à des causes fréquentes de syndromes dystoniques. L'autre explication serait, en conformité avec notre hypothèse initiale, que des causes génétiques non capturées par le séquençage de l'exome puisse expliquer ce tableau clinique particulier.

Plusieurs types de variants sont en effet mal détectés par le séquençage de l'exome (82). C'est le cas notamment des variants de structure. Ces variants de grande taille (par définition supérieurs à 50 pb), vont comprendre, d'une part, les translocations, les inversions qui ne modifient pas la longueur du génome et, d'autre part, les grandes délétions et duplications, appelées encore variations du nombre de copies (CNV), qui la modifient. Ils sont un support important de la variabilité génétique, et sont une cause génétique fréquente de pathologies neurodéveloppementales. Dans le domaine des pathologies neurologiques de l'adulte, les CNVs ont également été associés à divers phénotypes. On peut citer les délétions d'exons dans le gène *Parkin* (166) et les duplications du gène *SNCA* (167), ce dernier étant responsable de syndromes parkinsoniens de transmission autosomique dominante. Dans la mesure où leur longueur peut excéder celle des reads (75–150 pb), la présence d'un CNV va essentiellement se manifester par une diminution localisée de la profondeur de lecture, nécessitant l'usage d'outils bio-informatiques spécifiques pour assurer leur détection. De nouvelles technologies, à l'image de la cartographie optique du génome basée sur de l'ADN linéarisé de très haut poids moléculaire ont démontré une meilleure capacité de détection de CNV complexes (168).

Les répétitions courtes en tandem sont un type de mutation fréquemment à l'origine de pathologies neurogénétiques de l'adulte. On en dénombre actuellement plus de 50 (169). L'exemple le plus connu reste celui de la chorée de Huntington associée à une répétition de triplets CAG dans le gène *HTT* (170), mais on peut également citer la répétition d'un hexanucléotide dans *C9orf72*, responsable de sclérose latérale amyotrophique ou de démence lobaire frontotemporal de transmission autosomique dominante (171). Ces motifs posent des problèmes de séquençage dans la mesure où il s'agit de séquences répétées, rendant l'alignement sur le génome de référence difficile. En l'état actuel, le séquençage de l'exome ou le séquençage d'un panel de gènes par capture ciblée ne permettent pas

d'identifier ce type de mutation. Le séquençage du génome long-reads rendu possible par les technologies Oxford Nanopore sequencing ou Single-Molecule Real-Time sequencing de Pacific Biosciences permet de contourner ces difficultés d'alignement et d'identifier ces répétitions courtes en tandem (172).

Un grand nombre de pathologies neurologiques de l'adulte sont liées à des mutations localisées non pas au niveau de l'ADN nucléaire, qui est analysé par le séquençage haut débit de l'ADN, mais dans le génome mitochondrial. Cela est vrai dans le syndrome de Leigh (encéphalomyélite nécrosante) souvent caractérisée par un phénotype dystonique ou myoclonique (74). Ces variants ne sont pas capturés par le séquençage de l'exome.

L'insuffisance de couverture est également une limite pouvant potentiellement expliquer un défaut de détection de causes génétiques de dystonie. Le séquençage de l'exome ne couvre qu'environ 90 % des régions codantes. Ces régions mal couvertes comprennent notamment des régions répétées. Ces difficultés peuvent également s'observer avec le séquençage d'un panel de gènes par capture ciblée. Il a été démontré que le génome assure une meilleure couverture de ces régions codantes que le séquençage de l'exome, améliorant de fait la détection des variants localisés dans de telles régions (173).

Enfin, il n'est pas exclu qu'un certain nombre des causes génétiques manquantes de syndromes dystoniques soient liées à des variants pathogènes localisés en dehors de la séquence codante, à l'image des variants introniques profonds. Ces variants ne sont pas couverts par le séquençage de l'exome, et seul le génome permet leur détection. Le couplage du génome à des données de séquençage de l'ARN peut être utile pour faciliter l'interprétation de la pathogénicité de ces variants en démontrant un impact sur l'épissage et les transcrits du gène concerné (174).

Afin de poursuivre ce travail et d'identifier les causes génétiques manquantes chez ces patients présentant ce syndrome associant dystonie et paralysie de la verticalité, nous avons prévu de poursuivre les explorations en réalisant un génome associé à un pipeline bio-informatique incluant l'outil ExpansionHunter, ceci afin de pouvoir détecter les répétitions courtes en tandem (175).



### 3.6 Conclusion

Au travers de ce travail de thèse, nous avons pu identifier une architecture génétique commune entre pathologies neurodéveloppementales et syndromes dystoniques génétiquement déterminés. Nous avons contribué à élargir le spectre phénotypique associé aux variants pathogènes dans *GNAO1*. Nous avons identifié deux nouvelles causes de syndromes dystonie-parkinsonisme de début précoce que sont les mutations perte de fonction dans *NR4A2* et la mutation p.Glu200Lys dans *PPP2R5D*. Enfin nous avons confirmé l'implication des variants rares dans *TMEM151A* dans l'apparition de dystonies paroxystiques kinésigéniques.

Dans la continuité de ce travail, une analyse du génome couplée à une stratégie de détection des séquences répétées en tandem sont prévues afin d'identifier les causes génétiques manquantes non couvertes par l'exome chez les patients présentant une dystonie associée à une paralysie de la verticalité.

## Références

1. Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, DeLong MR, Fahn S, Fung VSC, et al. Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord.* 15 juin 2013;28(7):863-73.
2. Elble RJ. Defining dystonic tremor. *Curr Neuropharmacol.* janv 2013;11(1):48-52.
3. Albanese A, Di Giovanni M, Lalli S. Dystonia: diagnosis and management. *Eur J Neurol.* janv 2019;26(1):5-17.
4. Wenning GK, Kiechl S, Seppi K, Müller J, Högl B, Saletu M, et al. Prevalence of movement disorders in men and women aged 50-89 years (Bruneck Study cohort): a population-based study. *Lancet Neurol.* déc 2005;4(12):815-20.
5. Balint B, Mencacci NE, Valente EM, Pisani A, Rothwell J, Jankovic J, et al. Dystonia. *Nat Rev Dis Primers.* 20 sept 2018;4(1):25.
6. Steeves TD, Day L, Dykeman J, Jette N, Pringsheim T. The prevalence of primary dystonia: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* déc 2012;27(14):1789-96.
7. Tan EK, Jankovic J. Tardive and idiopathic oromandibular dystonia: a clinical comparison. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* févr 2000;68(2):186-90.
8. Scorr LM, Cho HJ, Kilic-Berkmen G, McKay JL, Hallett M, Klein C, et al. Clinical Features and Evolution of Blepharospasm: A Multicenter International Cohort and Systematic Literature Review. *Dystonia.* 2022;1:10359.
9. Page D, Butler A, Jahanshahi M. Quality of life in focal, segmental, and generalized dystonia. *Mov Disord.* 15 févr 2007;22(3):341-7.
10. Simonyan K, Barkmeier-Kraemer J, Blitzer A, Hallett M, Houde JF, Jacobson Kimberley T, et al. Laryngeal Dystonia: Multidisciplinary Update on Terminology, Pathophysiology, and Research Priorities. *Neurology.* 25 mai 2021;96(21):989-1001.
11. Wirth T. Haut taux de mutations identifié par séquençage de l'exome dans les dystonies complexes [Thèse d'exercice]. [2009-....., France]: Université de Strasbourg; 2019.
12. Marsden CD, Harrison MJ. Idiopathic torsion dystonia (dystonia musculorum deformans). A review of forty-two patients. *Brain.* déc 1974;97(4):793-810.
13. Bressman SB, Sabatti C, Raymond D, de Leon D, Klein C, Kramer PL, et al. The DYT1 phenotype and guidelines for diagnostic testing. *Neurology.* 9 mai 2000;54(9):1746-52.
14. Phukan J, Albanese A, Gasser T, Warner T. Primary dystonia and dystonia-plus

- syndromes: clinical characteristics, diagnosis, and pathogenesis. *Lancet Neurol.* déc 2011;10(12):1074-85.
15. Dauer WT, Burke RE, Greene P, Fahn S. Current concepts on the clinical features, aetiology and management of idiopathic cervical dystonia. *Brain.* avr 1998;121 ( Pt 4):547-60.
  16. Martino D, Defazio G, Abbruzzese G, Girlanda P, Tinazzi M, Fabbrini G, et al. Head trauma in primary cranial dystonias: a multicentre case-control study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* mars 2007;78(3):260-3.
  17. Stell R, Thompson PD, Marsden CD. Botulinum toxin in spasmodic torticollis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* juill 1988;51(7):920-3.
  18. Marsden CD, Marion MH, Quinn N. The treatment of severe dystonia in children and adults. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* nov 1984;47(11):1166-73.
  19. Jankovic J. Medical treatment of dystonia. *Mov Disord.* 15 juin 2013;28(7):1001-12.
  20. Vidailhet M, Vercueil L, Houeto JL, Krystkowiak P, Benabid AL, Cornu P, et al. Bilateral deep-brain stimulation of the globus pallidus in primary generalized dystonia. *N Engl J Med.* 3 févr 2005;352(5):459-67.
  21. Gruber D, Kühn AA, Schoenecker T, Kivi A, Trottenberg T, Hoffmann KT, et al. Pallidal and thalamic deep brain stimulation in myoclonus-dystonia. *Mov Disord.* 15 août 2010;25(11):1733-43.
  22. Ostrem JL, San Luciano M, Dodenhoff KA, Ziman N, Markun LC, Racine CA, et al. Subthalamic nucleus deep brain stimulation in isolated dystonia: A 3-year follow-up study. *Neurology.* 3 janv 2017;88(1):25-35.
  23. Doummar D, Dentel C, Lyautey R, Metreau J, Keren B, Drouot N, et al. Biallelic PDE2A variants: a new cause of syndromic paroxysmal dyskinesia. *Eur J Hum Genet.* oct 2020;28(10):1403-13.
  24. Tsubota K, Fujihara T, Kaido M, Mori A, Mimura M, Kato M. Dry eye and Meige's syndrome. *Br J Ophthalmol.* juin 1997;81(6):439-42.
  25. Cooper IS, Bravo GJ. Alleviation of dystonia musculorum deformans and other involuntary movement disorders of childhood by chemopallidectomy and chemopallido-thalamectomy. *Clin Neurosurg.* 1958 1957;5:127-49.
  26. Spasmodic torticollis: a case study [Internet]. Canadian Chiropractic Association (CCA) - Association chiropratique canadienne. [cité 26 oct 2022]. Disponible sur: <https://chiropractic.ca/jcca-online/issue/september-1992-volume-36-no-3/spasmodic-torticollis-a-case-study/>

27. Bruno MK, Hallett M, Gwinn-Hardy K, Sorensen B, Considine E, Tucker S, et al. Clinical evaluation of idiopathic paroxysmal kinesigenic dyskinesia: new diagnostic criteria. *Neurology*. 28 déc 2004;63(12):2280-7.
28. Garone G, Capuano A, Travaglini L, Graziola F, Stregapede F, Zanni G, et al. Clinical and Genetic Overview of Paroxysmal Movement Disorders and Episodic Ataxias. *International Journal of Molecular Sciences*. janv 2020;21(10):3603.
29. Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, Seki N, Hori T, Segawa M, et al. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet*. nov 1994;8(3):236-42.
30. Bonafé L, Thöny B, Penzien JM, Czarnecki B, Blau N. Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. *Am J Hum Genet*. août 2001;69(2):269-77.
31. Knappskog PM, Flatmark T, Mallet J, Lüdecke B, Bartholomé K. Recessively inherited L-DOPA-responsive dystonia caused by a point mutation (Q381K) in the tyrosine hydroxylase gene. *Hum Mol Genet*. juill 1995;4(7):1209-12.
32. Wijemanne S, Jankovic J. Dopa-responsive dystonia--clinical and genetic heterogeneity. *Nat Rev Neurol*. juill 2015;11(7):414-24.
33. Sheehy MP, Marsden CD. Writers' cramp-a focal dystonia. *Brain*. sept 1982;105 (Pt 3):461-80.
34. Rietveld ABM, Leijnse JN a. L. Focal hand dystonia in musicians: a synopsis. *Clin Rheumatol*. avr 2013;32(4):481-6.
35. Dhungana S, Jankovic J. Yips and other movement disorders in golfers. *Mov Disord*. mai 2013;28(5):576-81.
36. Albanese A, Bhatia K, DeLong MR, Fahn S, Fung VSC, Hallett M, et al. « Complex » dystonia is not a category in the new 2013 consensus classification. *Mov Disord*. nov 2016;31(11):1758-9.
37. Roze E, Lang AE, Vidailhet M. Myoclonus-dystonia: classification, phenomenology, pathogenesis, and treatment. *Curr Opin Neurol*. août 2018;31(4):484-90.
38. Schneider SA, Bhatia KP. Rare causes of dystonia parkinsonism. *Curr Neurol Neurosci Rep*. nov 2010;10(6):431-9.
39. Paudel R, Hardy J, Revesz T, Holton JL, Houlden H. Review: genetics and neuropathology of primary pure dystonia. *Neuropathol Appl Neurobiol*. oct 2012;38(6):520-34.
40. Bhatia KP, Marsden CD. The behavioural and motor consequences of focal lesions of

the basal ganglia in man. *Brain*. août 1994;117 ( Pt 4):859-76.

41. Egger K, Mueller J, Schocke M, Brenneis C, Rinnerthaler M, Seppi K, et al. Voxel based morphometry reveals specific gray matter changes in primary dystonia. *Mov Disord*. 15 août 2007;22(11):1538-42.
42. Brighina F, Romano M, Giglia G, Saia V, Puma A, Giglia F, et al. Effects of cerebellar TMS on motor cortex of patients with focal dystonia: a preliminary report. *Exp Brain Res*. févr 2009;192(4):651-6.
43. Neumann WJ, Horn A, Ewert S, Huebl J, Brücke C, Slentz C, et al. A localized pallidal physiomerker in cervical dystonia. *Ann Neurol*. déc 2017;82(6):912-24.
44. Nelson AJ, Blake DT, Chen R. Digit-specific aberrations in the primary somatosensory cortex in Writer's cramp. *Ann Neurol*. août 2009;66(2):146-54.
45. Ribot B, Aupy J, Vidailhet M, Mazère J, Pisani A, Bezard E, et al. Dystonia and dopamine: From phenomenology to pathophysiology. *Progress in Neurobiology*. 1 nov 2019;182:101678.
46. Berardelli A, Rothwell JC, Hallett M, Thompson PD, Manfredi M, Marsden CD. The pathophysiology of primary dystonia. *Brain*. juill 1998;121 ( Pt 7):1195-212.
47. Danti FR, Galosi S, Romani M, Montomoli M, Carss KJ, Raymond FL, et al. GNAO1 encephalopathy. *Neurol Genet*. 21 mars 2017;3(2):e143.
48. Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song W, Snyder GL, Nishi A, et al. DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science*. 7 août 1998;281(5378):838-42.
49. Wirth T. Disruption of striatal dopaminergic pathway: A new plot twist in dystonia genetic story. *Rev Neurol (Paris)*. oct 2022;178(8):751-3.
50. Fuchs T, Saunders-Pullman R, Masuho I, Luciano MS, Raymond D, Factor S, et al. Mutations in GNAL cause primary torsion dystonia. *Nat Genet*. janv 2013;45(1):88-92.
51. Carecchio M, Mencacci NE, Iodice A, Pons R, Panteghini C, Zorzi G, et al. ADCY5-related movement disorders: Frequency, disease course and phenotypic variability in a cohort of paediatric patients. *Parkinsonism & Related Disorders*. 1 août 2017;41:37-43.
52. Asanuma K, Ma Y, Okulski J, Dhawan V, Chaly T, Carbon M, et al. Decreased striatal D2 receptor binding in non-manifesting carriers of the DYT1 dystonia mutation. *Neurology*. 25 janv 2005;64(2):347-9.
53. Black KJ, Snyder AZ, Mink JW, Tolia VN, Revilla FJ, Moerlein SM, et al. Spatial reorganization of putaminal dopamine D2-like receptors in cranial and hand dystonia. *PLoS One*. 2014;9(2):e88121.

54. Karimi M, Moerlein SM, Videen TO, Su Y, Flores HP, Perlmutter JS. Striatal dopamine D1-like receptor binding is unchanged in primary focal dystonia. *Mov Disord.* déc 2013;28(14):2002-6.
55. Kang UJ, Burke RE, Fahn S. Natural history and treatment of tardive dystonia. *Movement Disorders.* 1986;1(3):193-208.
56. Natasa Cerovac, Petrović I, Klein C, Kostić VS. Delayed-onset dystonia due to perinatal asphyxia: a prospective study. *Mov Disord.* déc 2007;22(16):2426-9.
57. Meijer IA, Pearson TS. The Twists of Pediatric Dystonia: Phenomenology, Classification, and Genetics. *Seminars in Pediatric Neurology.* 1 avr 2018;25:65-74.
58. Baertling F, Rodenburg RJ, Schaper J, Smeitink JA, Koopman WJH, Mayatepek E, et al. A guide to diagnosis and treatment of Leigh syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* mars 2014;85(3):257-65.
59. Park CW, Kim NY, Kim YJ, Song SK, Lyoo CH. A Patient with Neuroferritinopathy Presenting with Juvenile-Onset Voice Tremor. *J Mov Disord.* janv 2020;13(1):66-8.
60. Mu W, Tochen L, Bertsch C, Singer HS, Barañano KW. Intracranial calcifications and dystonia associated with a novel deletion of chromosome 8p11.2 encompassing SLC20A2 and THAP1. *BMJ Case Rep.* 27 mai 2019;12(5):e228782.
61. Edvardson S, Hama H, Shaag A, Gomori JM, Berger I, Soffer D, et al. Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia. *Am J Hum Genet.* nov 2008;83(5):643-8.
62. Stamelou M, Tuschl K, Chong WK, Burroughs AK, Mills PB, Bhatia KP, et al. Dystonia with brain manganese accumulation resulting from SLC30A10 mutations: a new treatable disorder. *Mov Disord.* 1 sept 2012;27(10):1317-22.
63. Beck D. Dystonia musculorum deformans with another case in the same family. *Proc R Soc Med.* août 1947;40(10):551.
64. Ozelius L, Kramer PL, Moskowitz CB, Kwiatkowski DJ, Brin MF, Bressman SB, et al. Human gene for torsion dystonia located on chromosome 9q32-q34. *Neuron.* mai 1989;2(5):1427-34.
65. Ozelius LJ, Hewett JW, Page CE, Bressman SB, Kramer PL, Shalish C, et al. The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet.* sept 1997;17(1):40-8.
66. Olgiati S, Quadri M, Bonifati V. Genetics of movement disorders in the next-generation sequencing era. *Mov Disord.* avr 2016;31(4):458-70.
67. Iqbal Z, Koht J, Pihlstrøm L, Henriksen SP, Cappelletti C, Russel MB, et al. Missense

mutations in DYT-TOR1A dystonia. *Neurol Genet.* août 2019;5(4):e343.

68. Cif L, Demailly D, Lin JP, Barwick KE, Sa M, Abela L, et al. KMT2B-related disorders: expansion of the phenotypic spectrum and long-term efficacy of deep brain stimulation. *Brain.* 5 déc 2020;143(11):3242-61.
69. Zech M, Boesch S, Maier EM, Borggraefe I, Vill K, Laccone F, et al. Haploinsufficiency of KMT2B, Encoding the Lysine-Specific Histone Methyltransferase 2B, Results in Early-Onset Generalized Dystonia. *Am J Hum Genet.* 1 déc 2016;99(6):1377-87.
70. Meyer E, Carss KJ, Rankin J, Nichols JME, Grozeva D, Joseph AP, et al. Mutations in the histone methyltransferase gene KMT2B cause complex early-onset dystonia. *Nat Genet.* févr 2017;49(2):223-37.
71. Charlesworth G, Bhatia KP, Wood NW. The genetics of dystonia: new twists in an old tale. *Brain.* juill 2013;136(Pt 7):2017-37.
72. Haack TB, Hogarth P, Kruer MC, Gregory A, Wieland T, Schwarzmayer T, et al. Exome sequencing reveals de novo WDR45 mutations causing a phenotypically distinct, X-linked dominant form of NBIA. *Am J Hum Genet.* 7 déc 2012;91(6):1144-9.
73. Makino S, Kaji R, Ando S, Tomizawa M, Yasuno K, Goto S, et al. Reduced neuron-specific expression of the TAF1 gene is associated with X-linked dystonia-parkinsonism. *Am J Hum Genet.* mars 2007;80(3):393-406.
74. Tranchant C, Anheim M. Movement disorders in mitochondrial diseases. *Rev Neurol (Paris).* sept 2016;172(8-9):524-9.
75. Jinnah HA, Sun YV. Dystonia genes and their biological pathways. *Neurobiol Dis.* sept 2019;129:159-68.
76. Marras C, Lang A, Warrenburg BP van de, Sue CM, Tabrizi SJ, Bertram L, et al. Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Movement Disorders.* 1 avr 2016;31(4):436-57.
77. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* déc 1977;74(12):5463-7.
78. Mardis ER. DNA sequencing technologies: 2006-2016. *Nat Protoc.* févr 2017;12(2):213-8.
79. Sun Y, Ruivenkamp CAL, Hoffer MJV, Vrijenhoek T, Kriek M, van Asperen CJ, et al. Next-generation diagnostics: gene panel, exome, or whole genome? *Hum Mutat.* juin 2015;36(6):648-55.
80. Morey M, Fernández-Marmiesse A, Castiñeiras D, Fraga JM, Couce ML, Cocho JA.

A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Mol Genet Metab.* oct 2013;110(1-2):3-24.

81. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:387-402.
82. Wirth T. Analyses génétiques et mouvements anormaux : du savon sur la planche de salut. *Pratique Neurologique - FMC.* 1 mars 2022;13(1):40-5.
83. Lu Y, Shen Y, Warren W, Walter R. Next Generation Sequencing in Aquatic Models [Internet]. *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges.* IntechOpen; 2016 [cité 23 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.intechopen.com/chapters/49419>
84. Magi A, Benelli M, Gozzini A, Girolami F, Torricelli F, Brandi ML. Bioinformatics for next generation sequencing data. *Genes (Basel).* 14 sept 2010;1(2):294-307.
85. Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B, Solomonson M, Ruderfer DM, Kavanagh D, et al. The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Res.* 4 janv 2017;45(D1):D840-5.
86. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* oct 2015;526(7571):68-74.
87. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* août 2016;536(7616):285-91.
88. Cooper DN, Ball EV, Krawczak M. The human gene mutation database. *Nucleic Acids Res.* 1 janv 1998;26(1):285-7.
89. Riggs ER, Wain KE, Riethmaier D, Savage M, Smith-Packard B, Kaminsky EB, et al. Towards a Universal Clinical Genomics Database: the 2012 International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium Meeting. *Hum Mutat.* juin 2013;34(6):915-9.
90. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* avr 2014;11(4):361-2.
91. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 1 juill 2003;31(13):3812-4.
92. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* janv 2013;Chapter 7:Unit7.20.
93. Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet.* mars 2014;46(3):310-5.
94. Geoffroy V, Pizot C, Redin C, Piton A, Vasli N, Stoetzel C, et al. VaRank: a simple



and powerful tool for ranking genetic variants. *PeerJ*. 2015;3:e796.

95. Pant S, Weiner R, Marton MJ. Navigating the Rapids: The Development of Regulated Next-Generation Sequencing-Based Clinical Trial Assays and Companion Diagnostics. *Frontiers in Oncology*. 2014;4:78.
96. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. mai 2015;17(5):405-24.
97. Nambot S, Thevenon J, Kuentz P, Duffourd Y, Tisserant E, Bruel AL, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of rare disorders with congenital anomalies and/or intellectual disability: substantial interest of prospective annual reanalysis. *Genetics in Medicine*. 1 juin 2018;20(6):645-54.
98. Sobreira N, Schiettecatte F, Valle D, Hamosh A. GeneMatcher: A Matching Tool for Connecting Investigators with an Interest in the Same Gene. *Hum Mutat*. oct 2015;36(10):928-30.
99. Montaut S, Tranchant C, Drouot N, Rudolf G, Guissart C, Tarabeux J, et al. Assessment of a Targeted Gene Panel for Identification of Genes Associated With Movement Disorders. *JAMA Neurology*. 1 oct 2018;75(10):1234-45.
100. van Egmond ME, Lugtenberg CHA, Brouwer OF, Contarino MF, Fung VSC, Heiner-Fokkema MR, et al. A post hoc study on gene panel analysis for the diagnosis of dystonia. *Mov Disord*. avr 2017;32(4):569-75.
101. Ma J, Wang L, Yang YM, Wan XH. Targeted gene capture sequencing in diagnosis of dystonia patients. *J Neurol Sci*. 15 juill 2018;390:36-41.
102. Dimassi S, Labalme A, Ville D, Calender A, Mignot C, Boutry-Kryza N, et al. Whole-exome sequencing improves the diagnosis yield in sporadic infantile spasm syndrome. *Clin Genet*. févr 2016;89(2):198-204.
103. Feng H, Khalil S, Neubig RR, Sidiropoulos C. A mechanistic review on GNAO1-associated movement disorder. *Neurobiol Dis*. août 2018;116:131-41.
104. Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, et al. De Novo mutations in GNAO1, encoding a G $\alpha$  subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am J Hum Genet*. 5 sept 2013;93(3):496-505.
105. Ananth AL, Robichaux-Viehoever A, Kim YM, Hanson-Kahn A, Cox R, Enns GM, et al. Clinical Course of Six Children With GNAO1 Mutations Causing a Severe and Distinctive Movement Disorder. *Pediatric Neurology*. 1 juin 2016;59:81-4.

106. Salpietro V, Perez-Dueñas B, Nakashima K, San Antonio-Arce V, Manole A, Efthymiou S, et al. A homozygous loss-of-function mutation in PDE2A associated to early-onset hereditary chorea. *Mov Disord.* mars 2018;33(3):482-8.
107. Mencacci NE, Kamsteeg EJ, Nakashima K, R'Bibo L, Lynch DS, Balint B, et al. De Novo Mutations in PDE10A Cause Childhood-Onset Chorea with Bilateral Striatal Lesions. *Am J Hum Genet.* 7 avr 2016;98(4):763-71.
108. Carecchio M, Invernizzi F, González-Latapi P, Panteghini C, Zorzi G, Romito L, et al. Frequency and phenotypic spectrum of KMT2B dystonia in childhood: A single-center cohort study. *Mov Disord.* oct 2019;34(10):1516-27.
109. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.* 1 avr 2008;79(4):368-76.
110. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 23 mars 2017;3(1):1-21.
111. Shetty AS, Bhatia KP, Lang AE. Dystonia and Parkinson's disease: What is the relationship? *Neurobiology of Disease.* 1 déc 2019;132:104462.
112. Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, et al. Association between Early-Onset Parkinson's Disease and Mutations in the Parkin Gene. *N Engl J Med.* 25 mai 2000;342(21):1560-7.
113. Schneider SA, Alcalay RN. Neuropathology of genetic synucleinopathies with parkinsonism: Review of the literature. *Mov Disord.* nov 2017;32(11):1504-23.
114. Kupke KG, Graeber MB, Müller U. Dystonia-parkinsonism syndrome (XDP) locus: flanking markers in Xq12-q21.1. *Am J Hum Genet.* avr 1992;50(4):808-15.
115. Anselm IA, Sweadner KJ, Gollamudi S, Ozelius LJ, Darras BT. Rapid-onset dystonia-parkinsonism in a child with a novel atp1a3 gene mutation. *Neurology.* 4 août 2009;73(5):400-1.
116. Brüggemann N, Hagenah J, Reetz K, Schmidt A, Kasten M, Buchmann I, et al. Recessively inherited parkinsonism: effect of ATP13A2 mutations on the clinical and neuroimaging phenotype. *Arch Neurol.* nov 2010;67(11):1357-63.
117. Wirth T, Weibel S, Montaut S, Bigaut K, Rudolf G, Chelly J, et al. Severe early-onset impulsive compulsive behavior and psychosis in PLA2G6-related juvenile Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* août 2017;41:127-9.
118. Hartig MB, Hörtnagel K, Garavaglia B, Zorzi G, Kmiec T, Klopstock T, et al. Genotypic and phenotypic spectrum of PANK2 mutations in patients with neurodegeneration with brain iron accumulation. *Ann Neurol.* févr 2006;59(2):248-56.

119. Wirth T, Jacques Namer I, Monga B, Bund C, Iosif AV, Gebus O, et al. Progression of Nigrostriatal Denervation in Cerebellar Multiple System Atrophy: A Prospective Study. *Neurology*. 8 déc 2021;10.1212/WNL.0000000000013172.
120. Mongin M, Mezouar N, Dodet P, Vidailhet M, Roze E. Paroxysmal Exercise-induced Dyskinesias Caused by GLUT1 Deficiency Syndrome. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2016;6:371.
121. Bruno MK, Lee HY, Auburger GWJ, Friedman A, Nielsen JE, Lang AE, et al. Genotype-phenotype correlation of paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia. *Neurology*. 22 mai 2007;68(21):1782-9.
122. Méneret A, Grabli D, Depienne C, Gaudebout C, Picard F, Dürr A, et al. PRRT2 mutations: a major cause of paroxysmal kinesigenic dyskinesia in the European population. *Neurology*. 10 juill 2012;79(2):170-4.
123. Li HF, Chen YL, Zhuang L, Chen DF, Ke HZ, Luo WJ, et al. TMEM151A variants cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Cell Discov*. 13 sept 2021;7:83.
124. Tian WT, Zhan FX, Liu ZH, Liu Z, Liu Q, Guo XN, et al. TMEM151A Variants Cause Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia: A Large-Sample Study. *Mov Disord*. 24 nov 2021;
125. Chen YL, Chen DF, Li HF, Wu ZY. Features Differ Between Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia Patients with PRRT2 and TMEM151A Variants. *Mov Disord*. 27 janv 2022;
126. Lloyd-Smith Sequeira A, Rizzo JR, Rucker JC. Clinical Approach to Supranuclear Brainstem Saccadic Gaze Palsies. *Front Neurol*. 2017;8:429.
127. Höglinger GU, Respondek G, Stamelou M, Kurz C, Josephs KA, Lang AE, et al. Clinical diagnosis of progressive supranuclear palsy: The movement disorder society criteria. *Mov Disord*. juin 2017;32(6):853-64.
128. Nadjar Y, Hütter-Moncada AL, Latour P, Ayrignac X, Kaphan E, Tranchant C, et al. Adult Niemann-Pick disease type C in France: clinical phenotypes and long-term miglustat treatment effect. *Orphanet J Rare Dis*. 1 oct 2018;13(1):175.
129. Kumar KR, Davis RL, Tchan MC, Wali GM, Mahant N, Ng K, et al. Whole genome sequencing for the genetic diagnosis of heterogenous dystonia phenotypes. *Parkinsonism Relat Disord*. déc 2019;69:111-8.
130. Powis Z, Towne MC, Hagman KDF, Blanco K, Palmaer E, Castro A, et al. Clinical diagnostic exome sequencing in dystonia: Genetic testing challenges for complex conditions. *Clin Genet*. févr 2020;97(2):305-11.
131. Reale C, Panteghini C, Carecchio M, Garavaglia B. The relevance of gene panels in

- movement disorders diagnosis: A lab perspective. *Eur J Paediatr Neurol.* mars 2018;22(2):285-91.
132. Zech M, Boesch S, Jochim A, Weber S, Meindl T, Schormair B, et al. Clinical exome sequencing in early-onset generalized dystonia and large-scale resequencing follow-up. *Mov Disord.* avr 2017;32(4):549-59.
133. Zech M, Jech R, Wagner M, Mantel T, Boesch S, Nocker M, et al. Molecular diversity of combined and complex dystonia: insights from diagnostic exome sequencing. *Neurogenetics.* déc 2017;18(4):195-205.
134. Tucci V, Kleefstra T, Hardy A, Heise I, Maggi S, Willemsen MH, et al. Dominant  $\beta$ -catenin mutations cause intellectual disability with recognizable syndromic features. *J Clin Invest.* 1 avr 2014;124(4):1468-82.
135. Schottmann G, Sarpong A, Lorenz C, Weinhold N, Gill E, Teschner L, et al. A movement disorder with dystonia and ataxia caused by a mutation in the HIBCH gene. *Movement Disorders.* 2016;31(11):1733-9.
136. Torkamani A, Bersell K, Jorge BS, Bjork RL, Friedman JR, Bloss CS, et al. De novo KCNB1 mutations in epileptic encephalopathy. *Ann Neurol.* oct 2014;76(4):529-40.
137. Hickman RA, O'Shea SA, Mehler MF, Chung WK. Neurogenetic disorders across the lifespan: from aberrant development to degeneration. *Nat Rev Neurol.* févr 2022;18(2):117-24.
138. Groen JL, Ritz K, Jalalzadeh H, van der Salm SMA, Jongejan A, Mook OR, et al. RELN rare variants in myoclonus-dystonia. *Mov Disord.* mars 2015;30(3):415-9.
139. Riboldi GM, Monfrini E, Stahl C, Frucht SJ. *NUS1* and Epilepsy-myoclonus-ataxia Syndrome: An Under-recognized Entity? *Tremor and Other Hyperkinetic Movements.* 15 juin 2022;12(1):21.
140. Hamdan FF, Myers CT, Cossette P, Lemay P, Spiegelman D, Laporte AD, et al. High Rate of Recurrent De Novo Mutations in Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Am J Hum Genet.* 2 nov 2017;101(5):664-85.
141. Guo J feng, Zhang L, Li K, Mei J pu, Xue J, Chen J, et al. Coding mutations in NUS1 contribute to Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 6 nov 2018;115(45):11567-72.
142. Ananth AL, Robichaux-Viehoever A, Kim YM, Hanson-Kahn A, Cox R, Enns GM, et al. Clinical Course of Six Children With GNAO1 Mutations Causing a Severe and Distinctive Movement Disorder. *Pediatr Neurol.* juin 2016;59:81-4.
143. Charlesworth G, Plagnol V, Holmström KM, Bras J, Sheerin UM, Preza E, et al.

Mutations in ANO3 cause dominant craniocervical dystonia: ion channel implicated in pathogenesis. *Am J Hum Genet.* 7 déc 2012;91(6):1041-50.

144. Corvol JC, Muriel MP, Valjent E, Féger J, Hanoun N, Girault JA, et al. Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease. *J Neurosci.* 4 août 2004;24(31):7007-14.

145. Muntean BS, Masuho I, Dao M, Sutton LP, Zucca S, Iwamoto H, et al. Gαo is a major determinant of cAMP signaling in the pathophysiology of movement disorders. *Cell Rep.* 2 févr 2021;34(5):108718.

146. Krenn M, Sommer R, Sycha T, Zech M. GNAO1 Haploinsufficiency Associated with a Mild Delayed-Onset Dystonia Phenotype. *Mov Disord.* 23 oct 2022;

147. Reuter MS, Krumbiegel M, Schlüter G, Ekici AB, Reis A, Zweier C. Haploinsufficiency of NR4A2 is associated with a neurodevelopmental phenotype with prominent language impairment. *Am J Med Genet A.* août 2017;173(8):2231-4.

148. Ramos LLP, Monteiro FP, Sampaio LPB, Costa LA, Ribeiro MDO, Freitas EL, et al. Heterozygous loss of function of NR4A2 is associated with intellectual deficiency, rolandic epilepsy, and language impairment. *Clin Case Rep.* août 2019;7(8):1582-4.

149. Liu W, Gao Y, Chang N. Nurr1 overexpression exerts neuroprotective and anti-inflammatory roles via down-regulating CCL2 expression in both in vivo and in vitro Parkinson's disease models. *Biochem Biophys Res Commun.* 22 janv 2017;482(4):1312-9.

150. Spathis AD, Asvos X, Ziavra D, Karampelas T, Topouzis S, Cournia Z, et al. Nurr1:RXRα heterodimer activation as monotherapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 avr 2017;114(15):3999-4004.

151. Sun C, Wang Y, Mo M, Song C, Wang X, Chen S, et al. Minocycline Protects against Rotenone-Induced Neurotoxicity Correlating with Upregulation of Nurr1 in a Parkinson's Disease Rat Model. *Biomed Res Int.* 2019;2019:6843265.

152. Jiang C, Wan X, He Y, Pan T, Jankovic J, Le W. Age-dependent dopaminergic dysfunction in Nurr1 knockout mice. *Exp Neurol.* janv 2005;191(1):154-62.

153. Singh S, Gupta A, Zech M, Sigafos AN, Clark KJ, Dincer Y, et al. De novo variants of NR4A2 are associated with neurodevelopmental disorder and epilepsy. *Genet Med.* août 2020;22(8):1413-7.

154. Winter B, Krämer J, Meinhardt T, Berner D, Alt K, Wenzel M, et al. NR4A2 and Dystonia with Dopa Responsiveness. *Mov Disord.* sept 2021;36(9):2203-4.

155. Jesús S, Hinarejos I, Carrillo F, Martínez-Rubio D, Macías-García D, Sánchez-Monteagudo A, et al. NR4A2 Mutations Can Cause Intellectual Disability and Language

- Impairment With Persistent Dystonia-Parkinsonism. *Neurol Genet.* févr 2021;7(1):e543.
156. Song X, Xu W, Xiao M, Lu Y, Lan X, Tang X, et al. Two novel heterozygous truncating variants in NR4A2 identified in patients with neurodevelopmental disorder and brief literature review. *Front Neurosci.* 2022;16:956429.
157. Fitzgerald TW, Gerety SS, Jones WD, van Kogelenberg M, King DA, McRae J, et al. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature.* mars 2015;519(7542):223-8.
158. Loveday C, Tatton-Brown K, Clarke M, Westwood I, Renwick A, Ramsay E, et al. Mutations in the PP2A regulatory subunit B family genes PPP2R5B, PPP2R5C and PPP2R5D cause human overgrowth. *Hum Mol Genet.* 1 sept 2015;24(17):4775-9.
159. Houge G, Haesen D, Vissers LELM, Mehta S, Parker MJ, Wright M, et al. B56δ-related protein phosphatase 2A dysfunction identified in patients with intellectual disability. *J Clin Invest.* 3 août 2015;125(8):3051-62.
160. Shang L, Henderson LB, Cho MT, Petrey DS, Fong CT, Haude KM, et al. De novo missense variants in PPP2R5D are associated with intellectual disability, macrocephaly, hypotonia, and autism. *Neurogenetics.* 1 janv 2016;17(1):43-9.
161. Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem.* 30 avr 2004;279(18):18614-22.
162. Walker IM, Riboldi GM, Drummond P, Saade-Lemus S, Martin-Saavedra JS, Frucht S, et al. PPP2R5D Genetic Mutations and Early-Onset Parkinsonism. *Ann Neurol.* janv 2021;89(1):194-5.
163. Hetzelt KLML, Kerling F, Kraus C, Rauch C, Thiel CT, Winterholler M, et al. Early-onset parkinsonism in PPP2R5D-related neurodevelopmental disorder. *Eur J Med Genet.* janv 2021;64(1):104123.
164. Ning P, Li K, Ren H, Yang H, Xu Y, Yang X. Rare missense variants in the PPP2R5D gene associated with Parkinson's disease in the Han Chinese population. *Neuroscience Letters.* 4 mars 2022;136564.
165. Zech M, Jech R, Boesch S, Škorvánek M, Weber S, Wagner M, et al. Monogenic variants in dystonia: an exome-wide sequencing study. *Lancet Neurol.* nov 2020;19(11):908-18.
166. Morais S, Bastos-Ferreira R, Sequeiros J, Alonso I. Genomic mechanisms underlying PARK2 large deletions identified in a cohort of patients with PD. *Neurol Genet.* 3 mai 2016;2(3):e73.

167. Konno T, Ross OA, Puschmann A, Dickson DW, Wszolek ZK. Autosomal dominant Parkinson's disease caused by SNCA duplications. *Parkinsonism Relat Disord.* janv 2016;22(Suppl 1):S1-6.
168. Dremsek P, Schwarz T, Weil B, Malashka A, Laccone F, Neesen J. Optical Genome Mapping in Routine Human Genetic Diagnostics—Its Advantages and Limitations. *Genes.* déc 2021;12(12):1958.
169. Depienne C, Mandel JL. 30 years of repeat expansion disorders: What have we learned and what are the remaining challenges? *Am J Hum Genet.* 6 mai 2021;108(5):764-85.
170. Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, Theilmann J, Telenius H, Zeisler J, et al. A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med.* 19 mai 1994;330(20):1401-6.
171. Hensman Moss DJ, Poulter M, Beck J, Hehir J, Polke JM, Campbell T, et al. C9orf72 expansions are the most common genetic cause of Huntington disease phenocopies. *Neurology.* 28 janv 2014;82(4):292-9.
172. Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet.* oct 2020;21(10):597-614.
173. Belkadi A, Bolze A, Itan Y, Cobat A, Vincent QB, Antipenko A, et al. Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 avr 2015;112(17):5473-8.
174. Zhi X, Ai Q, Sheng W, Yu Y, Shu J, Yu C, et al. Identification of a Novel Deep Intronic Variant by Whole Genome Sequencing Combined With RNA Sequencing in a Chinese Patient With Menkes Disease. *Front Genet.* 2022;13:852764.
175. Ibañez K, Polke J, Hagelstrom RT, Dolzhenko E, Pasko D, Thomas ERA, et al. Whole genome sequencing for the diagnosis of neurological repeat expansion disorders in the UK: a retrospective diagnostic accuracy and prospective clinical validation study. *The Lancet Neurology.* 1 mars 2022;21(3):234-45.

## **Annexe 1**

# **Reply to : GNAO1 Haploinsufficiency Associated with a Mild Delayed-Onset Dystonia Phenotype**

Thomas Wirth\*, Giacomo Garone\*, Manju A. Kurian, Amélie Piton, Emmanuel Roze, Jean Pierre Lin, Christine Tranchant, Laura Cif+, Diane Doummar+, Mathieu Anheim+

\* Thomas Wirth and Giacomo Garone contributed equally to this work and should be considered co-first authors

+ Laura Cif, Diane Doummar and Mathieu Anheim contributed equally to this work and should be considered co-last authors

**Accepté pour publication dans Movement Disorders, 2022**



# Reply to: *GNAO1* Haploinsufficiency Associated with a Mild Delayed-Onset Dystonia Phenotype

Thomas Wirth (MD)<sup>1,2,3</sup>, Giacomo Garone (MD)<sup>4,5</sup>, Manju A. Kurian (MD)<sup>6</sup>, Amélie Piton (PhD)<sup>2,3,7</sup>, Emmanuel Roze (MD)<sup>8,9</sup>, Jean Pierre Lin (MD)<sup>10</sup>, Christine Tranchant (MD)<sup>1,2,3</sup>, Laura Cif (MD)<sup>11</sup>, Diane Doummar (MD)<sup>12</sup>, Mathieu Anheim (MD)<sup>1,2,3</sup>

1 Département de Neurologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg.

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

3 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France.

4 University Hospital Pediatric Department, IRCCS Bambino Gesù Children's Hospital, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy.

5 Movement Disorders Clinic, Department of Neurosciences, Bambino Gesù Children's Hospital, Rome, Italy.

6 Molecular Neurosciences, Developmental Neurosciences, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, London, United Kingdom.

7 Laboratoire de diagnostic génétique, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

8 Sorbonne Université/Inserm U1127/CNRS UMR 7225/Institut du Cerveau, Paris, France

9 Service de neurologie, Hôpital la Pitié Salpêtrière, Sorbonne Université, Paris, France

10 Children's Neurosciences Department, Evelina London Children's Hospital, Guy's and St Thomas NHS Foundation Trust, London, United Kingdom.

11 Département de Neurochirurgie, Unité des Pathologies Cérébrales Résistantes, Unité de Recherche sur les Comportements et Mouvements Anormaux, Hôpital Gui de Chauliac, Centre Hospitalier Régional Montpellier, Montpellier, France.

12 Sorbonne Université, Service de Neuropédiatrie-Pathologie du développement, centre de référence neurogénétique, Hôpital Trousseau AP-HP.SU, FHU I2D2, Paris, France.

Thomas Wirth and Giacomo Garone should be considered as co-first authors.

Laura Cif, Diane Doummar, and Mathieu Anheim should be considered as co-last authors.

## Corresponding author:

Dr Thomas Wirth (MD)  
Neurology department, Strasbourg University Hospital  
Hôpital de Hautepierre, 1 avenue Molière, 67200 Strasbourg, France  
Tel.: +33 (0)388128919  
E-mail: [thomas.wirth@etu.unistra.fr](mailto:thomas.wirth@etu.unistra.fr)

## Funding

No specific fundings was used for this work.

## Word Count

494

With great interest, we read the letter written by Krenn et al. (1) regarding our recent paper focusing on mild dystonic phenotype associated with *GNAO1* heterozygous variants (2). In this manuscript, the authors report on two first degree relatives (mother and daughter) presenting with delayed-onset dystonia and carrying copy number variant (CNV) in *GNAO1*. The mother exhibited from the age of 40 focal cervical dystonia associated with head tremor, then developing segmental dystonia with additional myoclonus. No encephalopathic features nor intellectual disability (ID) was reported. Her daughter showed non-progressive focal cervical dystonia from the age of 16 associated with learning difficulties in childhood and generalized tonic-clonic seizure. By re-assessing the whole-exome sequencing (WES) datasets of a cohort of patients affected with dystonia, the authors finally identified a heterozygous interstitial deletion at 16q12.2 including the exons 4-8 of *GNAO1* (NM\_020988.3). Interestingly, this finding was initially ranked as a variant of unknown significance (VUS) then reclassified following the publication of our work (2). These results have several important consequences, both for movement disorders clinical practice and from a pathophysiological perspective.

For clinical practice, this work highlights the importance of *GNAO1* CNV assessment facing patients presenting with autosomal dominantly inherited focal dystonia. This finding is indeed echoed by the very recent publication from Lasa-Aranzasti and colleagues, who identified a larger 16q deletion in a patient showing mild ID associated with generalized dystonia (3). Taken together, these two separated works suggest *GNAO1* CNV are a non-uncommon cause of prominent dystonic phenotypes, which should be carefully searched for in patients exhibiting such clinical presentations. Second, it confirms our findings that delayed-onset dystonia with no or little additional neurodevelopmental and neurological symptoms can be the main phenotype of *GNAO1*-related disorder. As highlighted by the authors, autosomal dominantly inherited dystonia is not rare in movement disorder clinics. Our findings, taken together with Krenn et al.'s, suggest that a substantial number of those cases could potentially be related to *GNAO1* likely pathogenic or pathogenic variants, which has important implications for genetic testing and counselling. For instance, *GNAO1* variants should be searched for when the phenotype is compatible with the newly described *GNAO1*-related spectrum, including when targeted gene panel sequencing (which did not include *GNAO1*) was

negative or when WES previously identified *GNAO1* variant that was discarded since considered as VUS.

From a pathophysiological perspective, it further demonstrates the relationship between *GNAO1* haploinsufficiency and milder dystonic phenotypes with no encephalopathic features. This reinforces that genotype–phenotype correlations are nuanced in *GNAO1*-related disorders, and that the hypothesis of loss-of-function variants causing epileptic encephalopathy and gain-of-function variant causing a neurodevelopmental syndrome with prominent dystonia is probably oversimplistic (4,5). It also raises the question of the factors determining intrafamilial phenotypic variability and the differences in the clinical presentation between patients carrying loss-of-function variants. Further functional works assessing the peculiar impact of each mutation, as well as neuroimaging study of *GNAO1*-carriers might lead to a better understanding of these factors and to the refinement of genotype-phenotype correlations.

## References

1. Krenn M, Sommer R, Sycha T, Zech M. *GNAO1* Haploinsufficiency Associated with a Mild Delayed-Onset Dystonia Phenotype. *Movement Disorders*. In press
2. Wirth T, Garone G, Kurian MA, Piton A, Millan F, Telegrafi A, et al. Highlighting the Dystonic Phenotype Related to *GNAO1*. *Movement Disorders*. 2022;37(7):1547-54.
3. Lasa-Aranzasti A, Cazurro-Gutiérrez A, Bescós A, González V, Ispierto L, Tardáguila M, et al. 16q12.2q21 deletion: A newly recognized cause of dystonia related to *GNAO1* haploinsufficiency. *Parkinsonism & Related Disorders*. 1 oct 2022;103:112-4.
4. Feng H, Khalil S, Neubig RR, Sidiropoulos C. A mechanistic review on *GNAO1*-associated movement disorder. *Neurobiol Dis*. août 2018;116:131-41.
5. Muntean BS, Masuho I, Dao M, Sutton LP, Zucca S, Iwamoto H, et al. Gao is a major determinant of cAMP signaling in the pathophysiology of movement disorders. *Cell Rep*. 2 févr 2021;34(5):108718.

## **Author contribution**

TW drafted the manuscript.

GG, MK, AP, JPL, CT, LC, DD and MA provided review and critique.

## **Study funding**

No targeted funding reported.

## **Disclosures**

All authors report no disclosures related to this work

## **Annexe 2**

# **Reply to “PPP2R5D Genetic Mutations and Early-Onset Parkinsonism”**

Christine Y Kim\*, Thomas Wirth\*, Cécile Hubsch, Andrea H Németh, Volkan Okur, Mathieu Anheim, Nathalie Drouot, Christine Tranchant, Gabrielle Rudolf, Jamel Chelly, Katrina Tatton-Brown, Cornelis Blauwendraat, Jean Paul G Vonsattel, Ety Cortes, Roy N Alcalay, Wendy K Chung

\*These authors contributed equally to this work

**Publié dans *Annals of Neurology*, 2020**

## Reply to “*PPP2R5D* genetic mutations and early-onset parkinsonism”

Christine Y. Kim, MD \*<sup>1,2</sup>; Thomas Wirth, MD, MS \*<sup>3,4,5</sup>; Cécile Hubsch, MD, PhD <sup>6</sup>; Andrea H. Németh, MB.BS, DPhil <sup>7</sup>; Volkan Okur, MD <sup>8</sup>; Mathieu Anheim, MD, PhD <sup>4,5,9</sup>; Nathalie Drouot, MS <sup>5</sup>; Christine Tranchant, MD, PhD <sup>4,5,9</sup>; Gabrielle Rudolf, PhD <sup>4,5,9</sup>; Jamel Chelly, MD, PhD <sup>4,5,10</sup>; Katrina Tatton-Brown, MD <sup>11</sup>; Cornelis Blauwendraat, PhD <sup>12</sup>; Jean Paul G. Vonsattel, MD <sup>13</sup>; Ety Cortes, MD <sup>14</sup>; Roy N. Alcalay, MD, MS <sup>15, 16</sup>; Wendy K. Chung, MD, PhD <sup>8, 17</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurology, Yale School of Medicine, Yale University, New Haven, CT, USA.

<sup>2</sup> Center for Neuroepidemiology and Clinical Neurological Research, Yale School of Medicine, Yale University, New Haven, CT, USA.

<sup>3</sup> Unit of Functional Neurosurgery, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, University College London Hospital, London, UK.

<sup>4</sup> Service de Neurologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

<sup>5</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM-U964/CNRS-UMR7104/Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France.

<sup>6</sup> Fondation Ophtalmologique A. de Rothschild, Paris, France.

<sup>7</sup> Oxford University Hospitals NHS Trust and University of Oxford, Oxford, UK.

<sup>8</sup> Department of Pediatrics, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY, USA.

<sup>9</sup> Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Strasbourg, France.

<sup>10</sup> Laboratoire de diagnostic génétique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

<sup>11</sup> St. George's University Hospitals NHS Foundation Trust, London, UK.

<sup>12</sup> Laboratory of Neurogenetics, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

<sup>13</sup> Department of Pathology and Cell Biology, Columbia University Medical Center and the New York Presbyterian Hospital, New York, NY, USA.

<sup>14</sup> Department of Pathology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, USA.

<sup>15</sup> Department of Neurology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY, USA.

<sup>16</sup> Taub Institute for Research on Alzheimer's Disease and the Aging Brain, Columbia University, New York, NY, USA.

<sup>17</sup> Department of Medicine, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY, USA.

\*These authors contributed equally to this work.

### **Corresponding author:**

Wendy K. Chung

College of Physicians and Surgeons, Columbia University

1150 St. Nicholas Avenue, Room 620

New York, NY 10032

Email: [wkc15@cumc.columbia.edu](mailto:wkc15@cumc.columbia.edu)

Phone: (212) 305-5890

**Word count: 385 words**

**References: 5**

We thank Walker et al., for their valuable comments. They report an interesting patient whose clinical picture included moderate intellectual disability (ID), macrocephaly and hydrocephalus related to aqueduct stenosis. He presented around the age of 20 with bradykinesia and rest tremor leading to the diagnosis of early-onset parkinsonism. His symptoms were notably characterized by a robust benefit with dopaminergic therapy, although his disease course was complicated by severe motor fluctuations. I-123 FP-CIT SPECT demonstrated reduced dopamine uptake in the right basal ganglia. Exome sequencing identified the de novo missense variant NM\_006245.3:c.748G>A (p.E250K) in *PPP2R5D*.

While this variant was neither reported in Clinvar nor the public version of HGMD, several arguments support its pathogenicity. It is predicted as Probably Damaging by Polyphen (score=1.0) and deleterious by PROVEAN. The variant is de novo, absent from public databases, located in the vicinity of a previously reported mutation NM\_006245.4(*PPP2R5D*):c.752A>T (p.D251V) and affects a highly conserved residue in a gene intolerant to missense. In addition, very few genetic causes of syndromes associating ID to early-onset parkinsonism have been reported besides *PPP2R5D*<sup>1,2</sup>. According to the American College of Medical Genetics and Genomics criteria<sup>3</sup>, this variant would be classified as likely pathogenic (Criteria PS2+PM2+PP2+PP3+PP4).

This new report of early-onset parkinsonism in a patient carrying a mutation in *PPP2R5D* provides important confirmation of the gene's association with early-onset parkinsonism. The most important finding in this observation is probably the association of parkinsonism with a different mutation than the p.E200K<sup>4</sup>. This suggests that early-onset parkinsonism is more likely to be a general consequence of mutations in *PPP2R5D* rather than the expression of a mutational effect. This finding has important practical consequences as it suggests that all *PPP2R5D* mutation carriers are potentially at risk of developing early-onset parkinsonism. Careful follow-up of the already identified patients with a focus on movement disorders and

parkinsonian features should be encouraged and levodopa introduction should be considered when parkinsonism is clinical suspected.

We agree with Walker et al. on the potential merits of screening for *PPP2R5D* mutations in individuals with early-onset parkinsonism (particularly those with intellectual disability). Increased screening will indeed be important in identification of other implicated *PPP2R5D* mutations and genotype-phenotype correlation. In accordance with the task force for the nomenclature of genetic movement disorders recommendations<sup>5</sup>, we propose to name this confirmed new cause of early-onset parkinsonism PARK-PPP2R5D.

## References

1. Saitsu H, Nishimura T, Muramatsu K, et al. De novo mutations in the autophagy gene *WDR45* cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat. Genet.* 2013;45(4):445–449, 449e1.
2. Wirth T, Mariani LL, Bergant G, et al. Loss-of-function mutations in *NR4A2* cause dopa-responsive dystonia Parkinsonism. *Mov. Disord.* 2020;
3. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405–424.
4. Kim CY, Wirth T, Hubsch C, et al. Early-Onset Parkinsonism Is a Manifestation of the *PPP2R5D* p.E200K Mutation. *Ann. Neurol.* 2020;
5. Marras C, Lang A, van de Warrenburg BP, et al. Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Mov. Disord.* 2016;31(4):436–457.



Thomas WIRTH

# Identification des causes génétiques manquantes de syndromes dystoniques par séquençage de l'exome

## Résumé

Les dystonies d'origine génétique forment un groupe de pathologies rares à l'origine de mouvements anormaux et/ou de prises de postures anormales. Le séquençage ciblé d'un panel de gènes de mouvements anormaux permet un diagnostic moléculaire dans moins d'un quart des cas, suggérant qu'un grand nombre de causes génétiques de dystonie reste à découvrir. L'objectif de cette thèse était d'identifier ces causes génétiques manquantes de syndromes dystoniques en utilisant le séquençage de l'exome.

Au travers de ce travail de thèse, nous avons pu identifier une architecture génétique commune entre pathologies neurodéveloppementales et syndromes dystoniques génétiquement déterminés. Nous avons contribué à élargir le spectre phénotypique associé aux variants pathogènes dans *GNAO1* en les rattachant à des dystonies de sévérité moindre. Nous avons identifié deux nouvelles causes de syndromes dystonie-parkinsonisme de début précoce, les mutations perte de fonction dans *NR4A2* et la mutation récurrente p.Glu200Lys dans *PPP2R5D*. Enfin nous avons confirmé l'implication des variants rares dans *TMEM151A* dans l'apparition de dystonies paroxystiques kinésigéniques.

Mots clés : dystonie, séquençage haut débit de l'ADN, *GNAO1*, *NR4A2*, *PPP2R5D*, *TMEM151A*

## Résumé en anglais

Inherited dystonia is a group of rare neurogenetic conditions causing abnormal movements and/or abnormal postures. Targeted sequencing of a movement disorders gene panel yields a molecular diagnosis in less than 25 % of cases, suggesting several genetic causes of dystonia remain to be discovered. Our objective was to identify the missing genetic causes of dystonic syndromes using whole exome sequencing.

We were able to identify a common genetic architecture between neurodevelopmental disorders and genetically determined dystonic syndromes. We also expanded the phenotypic spectrum associated with *GNAO1* pathogenic variants to autosomal dominant and non-progressive focal or segmental dystonia. Then, we identified two new causes of early-onset dystonia-parkinsonism syndromes, namely the loss-of-function mutations in *NR4A2* and the p.Glu200Lys mutation in *PPP2R5D*. We also confirmed the association between rare variants in *TMEM151A* and paroxysmal kinesigenic dyskinesia.

Key words: dystonia, high throughput DNA sequencing, *GNAO1*, *NR4A2*, *PPP2R5D*, *TMEM151A*