

Université de Montréal

Identification des mutations responsables de la NHSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

par
Katel Roddier B.Sc.

Programme de biologie moléculaire
Faculté des Études Supérieures (FES)

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention d'une Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

mai, 2005



©, Katel Roddier, 2005

QH

506

U54

2006

v.021

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures (FES)

Ce mémoire intitulé :

Identification des mutations responsables de la NHSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

Présenté par :

Katel Roddier B.Sc.

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Patrick Cossette, M.D., M.Sc.
Président-rapporteur

Dr Bernard Brais, M.D., M.Phil., Ph.D.
Directeur de recherche

Dr Grant Mitchell, M.D.
Membre du jury

Résumé

La névrite héréditaire sensitive et autonome de type 2 (NHSA2) et l'ataxie avec apraxie oculaire de type 2 (AOA2) sont deux maladies neurodégénératives rares dont la prévalence est plus élevée au Québec. Les gènes *HSN2* et *SETX* ont récemment été identifiés comme en étant responsables. Les phénotypes relativement homogènes et la distribution géographique particulière des patients laissent présager que ces deux maladies étaient le fruit d'effets fondateurs québécois. Nous avons pour objectifs de réaliser des études de liaison génétique et de séquencer les gènes afin d'identifier les mutations canadiennes-françaises. Nous décrivons 16 et 24 patients canadiens-français souffrant de NHSA2 et d'AOA2 respectivement. Nous avons démontré que toutes les familles sont liées aux loci 12p13.33 et 9q34 décrits. Le séquençage des gènes a permis d'identifier deux mutations dans *HSN2* et quatre mutations dans *SETX* dont deux nouveaux faux sens. L'identification des mutations responsables permettra un diagnostic plus précis et un meilleur conseil génétique. Ces études ont permis de caractériser deux nouvelles maladies à effet fondateur au Québec.

Mots clés

Génétique, autosomique récessif, étude de liaison, effet fondateur, Québec, névrite sensitive, ataxie cérébelleuse, *HSN2*, *SETX*.

Abstract

Hereditary sensory autonomic neuropathy type 2 (HSAN2) and ataxia oculomotor apraxia type 2 (AOA2) are two rare neurodegenerative diseases more frequent in the Quebec population. The *HSN2* and *SETX* genes were recently identified as being responsible. The relatively homogeneous phenotypes and the particular geographical distribution of cases led to the hypothesis that their higher prevalences in Quebec were due to regional founder effects. Our goals were to carry out linkage analyses and to sequence both genes in order to identify the French Canadian mutations. We describe 16 NNSA2 and 24 AOA2 French Canadian patients. Linkage analysis demonstrated that all families are linked to the described HSAN2 12p13.33 and AOA2 9q34 loci. Two mutations were identified in the *HSN2* gene and four were uncovered in the *SETX* gene, including two novel missense mutations. The identification of the responsible mutations will lead to more precise diagnostic and better genetic counselling. These studies led to the description of two novel Quebec founder effects diseases.

Key words

Genetic, autosomal recessive, linkage analysis, founder effect, Quebec, sensitive neuropathy, cerebellar ataxia, *HSN2*, *SETX*.

Table des matières

Résumé.....	iii
Mots clés	iii
Abstract.....	iv
Key words.....	iv
Table des matières	v
Liste des figures	ix
Liste des tables	xii
Liste des sigles et abréviations.....	xiv
Épigramme	xviii
Dédicace	xix
Remerciements.....	xx
Avant propos.....	xxii
INTRODUCTION : Les effets fondateurs au Québec	1
A. La naissance du Nouveau Monde.....	2
B. Les maladies à effet fondateur au Québec.....	5
C. L'exemple de l'ARSACS.....	8
D. Hypothèses de travail	9
E. Objectifs.....	10
CHAPITRE I : Étude génétique de la NHSA2.....	12
A. Introduction.....	13
1. Historique	13
2. Classification des NHSA	13
B. La névrite héréditaire sensitive et autonome de type 2 (NHSA2)...	16
1. Historique.....	16
2. Mode de transmission.....	16
3. Phénotype.....	17

C. Publication du locus et du gène pour la NHSA2.....	18
D. Article scientifique.....	20
1. Contribution des coauteurs.....	22
2. Acknowledgments.....	24
3. Abstract.....	25
4. Introduction.....	26
5. Methods.....	27
6. Results.....	29
7. Discussion.....	40
8. Informations complémentaires.....	44
CHAPITRE II : Étude génétique de l'AOA2.....	46
A. Introduction aux ataxies.....	47
1. Définition.....	47
2. Classification.....	47
B. Exclusion de gènes candidats dans la région 9q34.....	50
1. Introduction.....	50
2. Matériel et méthodes.....	51
3. Résultats et conclusion.....	52
C. La publication du locus et du gène pour l'AOA2.....	52
D. Article scientifique.....	53
1. Contribution des coauteurs.....	55
2. Acknowledgments.....	57
3. Abstract.....	58
4. Introduction.....	59
5. Subjects and methods.....	60
6. Results.....	62
7. Discussion.....	67
8. Informations complémentaires.....	72

CHAPITRE III : Une leçon à tirer du deux-points.....	80
A. Introduction.....	81
B. Matériel et méthodes.....	85
1. Méthode deux-points.....	85
2. Méthode multipoints	86
C. Résultats.....	87
1. Analyse de la première série de données pour l'AOA2	87
2. Analyse de la deuxième série de données pour l'AOA2.....	90
3. Analyse des données pour la NHSA2.....	94
D. Discussion.....	98
1. Analyse des données pour l'AOA2	98
2. Analyse des données pour la NHSA2.....	101
3. Conclusions de l'étude comparative.....	102
DISCUSSION : Deux nouveaux exemples d'effets fondateurs au Québec	108
A. Effet fondateur et origine des mutations	109
1. Pourquoi pensons-nous que la NHSA2 et L'AOA2 sont le fruit d'effets fondateurs ?.....	109
2. Comment et quand ont été introduites les différentes mutations responsables et qu'est-ce qui explique que ces maladies soient plus présentes au Québec ?.....	111
3. Qu'est-ce que ces études amènent en retour à la population ?.....	114
B. Rôle des protéines et pathologie moléculaire.....	115
1. Quel est le rôle présumé de la protéine HSN2 ?	115
2. Quelles sont les caractéristiques et l'impact biologique des différentes mutations dans la NHSA2 ?.....	117
3. Quel est le rôle présumé de la protéine SETX ?	118
4. Quelles sont les caractéristiques et l'impact biologique des différentes mutations dans l'AOA2 ?	125
C. Conclusion et perspectives.....	139

BIBLIOGRAPHIE	141
ANNEXES.....	xxiv
Annexe 1 : Article scientifique « Two Mutations in the <i>HSN2</i> Gene Explain the High Prevalence of HSN2 in French Canadians » <i>Neurology</i> 2005 may, 64(10) : 1762-1767 sous sa forme originale.....	xxv
Annexe 2 : Article scientifique « Mutations in <i>Senataxin</i> Responsible for Quebec Cluster of Ataxia with Neuropathy » <i>Annals of Neurology</i> 2005 march, 57 : 408-414 sous sa forme originale.....	xxxii
Annexe 3 : Pedigrees et haplotypes générés par GENEHUNTER pour dix familles de patients atteints d'AOA2.....	xl
Annexe 4 : Pedigrees et haplotypes générés par GENEHUNTER pour douze familles de patients atteints de NHSA2	xlv
Annexe 5 : Accords des coauteurs pour les deux articles.....	lii

Liste des figures

Figure 1 :	Carte géographique du Sud-Est du Canada.....	4
Figure 2 :	Représentation selon l'échelle physique de la région entre les marqueurs D12S352 et D12S100.....	18
Figure 3 :	Thirteen French Canadian HSN2 pedigrees.....	31
Figure 4 :	Regional origin and mutation distribution for 13 French-Canadian hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2 (HSAN2) families.....	32
Figure 5 :	Progression of amputations in 16 hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2 patients according to age.....	39
Figure 6 :	Mutations canadiennes-françaises identifiées dans le gène <i>HSN2</i>	44
Figure 7 :	Trois mutations non-sens conduisent à une troncation de la protéine.....	45
Figure 8 :	Représentation selon l'échelle physique de la région entre les marqueurs D9S179 et D9S66.....	51
Figure 9 :	Pedigrees of ten French-Canadian AOA2 families without oculomotor apraxia.....	63
Figure 10 :	Villes de mariage des parents pour les dix familles canadiennes-françaises.....	74
Figure 11 :	Quatre mutations ont été identifiées dans le gène <i>SETX</i> chez des individus canadiens-français atteints d'AOA2.....	75
Figure 12 :	Quatre mutations conduisent à des modifications majeures de la protéine.....	76
Figure 13 :	Autoradiographies des hybridations réalisées pour tester la mutation L1976R.....	78

Figure 14 :	Représentation graphique des LOD scores obtenus par Antoine Duquette pour la première série de données avec la méthode de calcul deux-points du logiciel MLINK de la suite FASTLINK à un $\theta=0$	88
Figure 15 :	Représentation graphique des LOD scores totaux obtenus pour la première série de données avec la méthode de calcul multipoints MAXPROB de la suite GENEHUNTER à un $\theta=0$	90
Figure 16 :	Représentation graphique des LOD scores totaux obtenus avec la méthode de calcul deux-points du logiciel MLINK de la suite LINKAGE à un $\theta=0$ avec les nouvelles données.....	92
Figure 17 :	Représentation graphique des LOD scores totaux obtenus avec la méthode de calcul multipoints MAXPROB de la suite GENEHUNTER à un $\theta=0$ avec les nouvelles données.....	94
Figure 18 :	Représentation graphique des LOD scores totaux obtenus avec la méthode de calcul deux-points du logiciel MLINK de la suite LINKAGE à un $\theta=0$ pour les haplotypes des familles des patients atteints de NHSA2.....	96
Figure 19 :	Représentation graphique des LOD scores totaux obtenus avec la méthode de calcul multipoints MAXPROB de la suite GENEHUNTER à un $\theta=0$ pour les haplotypes des familles des patients atteints de NHSA2.....	98
Figure 20 :	Illustration des intervalles candidats suite à l'analyse des haplotypes, deux-points et multipoints de la première et de la deuxième série de données pour l'AOA2.....	103

Figure 21 : Illustration des intervalles candidats suite à l'analyse des haplotypes, deux-points et multipoints des données pour la NHSA2.....	103
Figure 22 : Cinq mutations non-sens ont été décrites dans le gène HSN2.....	118
Figure 23 : Représentation linéaire de la protéine SETX.....	120
Figure 24 : Les huit motifs conservés de la famille des protéines DExxQ-box.....	121
Figure 25 : Formule semi-développée plane de quatre acides aminés ...	126
Figure 26 : Alignements des séquences à l'aide du programme CLUSTALW.....	127
Figure 27 : Structure tridimensionnelle du domaine hélicase de la protéine PcrA de la bactérie <i>Bacillus stearothermophilus</i>	130
Figure 28 : Alignement des séquences du domaine hélicase des protéines SETX, PcrA, gi 1723131, gi 2688535, gi 4033461, gi 2983362, gi 1169572, gi 119668 et gi 8134452 selon le "Conserved domain database".....	132
Figure 29 : Vue rapprochée du domaine hélicase de la protéine PcrA de la bactérie <i>Bacillus stearothermophilus</i>	133
Figure 30 : Vingt mutations ont été décrites dans le gène SETX.....	136

Liste des tables

Table I :	Maladies héréditaires spécifiques observées au Québec.....	6
Table II :	Maladies héréditaires non-spécifiques observées au Québec.	7
Table III :	Classification des névrites sensitives et autonomiques.....	15
Table IV :	Haplotypes of 26 French Canadian HSAN2 carrier chromosomes in the <i>HSN2</i> 12p13.33 region.....	35
Table V :	Clinical phenotype of 16 French Canadian HSAN2 patients with HSAN2.....	38
Table VI :	Quelques ataxies récessives présentes au Québec.....	49
Table VII :	Clinical features in 24 French Canadian patients with a similar ataxic phenotype.....	64
Table VIII :	Haplotypes pour 10 marqueurs du locus de l'AOA2 sur le chromosome 9q34.....	73
Table IX :	LOD scores obtenus par Antoine Duquette pour la première série de données avec la méthode de calcul deux-points du logiciel MLINK de la suite FASTLINK à un $\theta=0$	87
Table X :	LOD scores totaux obtenus pour la première série de données avec la méthode de calcul multipoints MAXPROB de la suite GENEHUNTER à un $\theta=0$	89
Table XI :	LOD scores obtenus avec la méthode de calcul deux-points du logiciel MLINK de la suite LINKAGE à un $\theta=0$ avec les nouvelles données.....	91
Table XII :	LOD scores obtenus avec la méthode de calcul multipoints MAXPROB de la suite GENEHUNTER à un $\theta=0$ avec les nouvelles données.....	93

Table XIII : LOD scores obtenus avec la méthode de calcul deux-points du logiciel MLINK de la suite LINKAGE à un $\theta=0$ pour les haplotypes des familles des patients atteints de NHSA2.....	95
Table XIV : LOD scores obtenus avec la méthode de calcul multipoints MAXPROB de la suite GENEHUNTER à un $\theta=0$ pour les haplotypes des familles des patients atteints de NHSA2.....	97
Table XV : Vingt mutations ont été décrites dans le gène <i>SETX</i>	135

Liste des sigles et abréviations

aa:	Résidus d'acide aminé
ACC:	Agenesis of the corpus callosum
ADN:	Acide désoxyribonucléique
AF:	Ataxie de Friedreich
AFP:	Alpha foetoprotéine/fetoprotein
ALS4:	Amyotrophy lateral sclerosis
AOA1:	Ataxia oculomotor apraxia type 1
AOA2:	Ataxia oculomotor apraxia type 2
APTX:	Aprataxin
ARN:	Acide ribonucléique
ARNr:	Acide ribonucléique ribosomal
ARNsno:	Acide ribonucléique "small nuclear and nucleolar"
ARNt:	Acide ribonucléique de transfert
ARSACS:	Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay
A.S.O:	Allele specific oligonucleotide
AT:	Ataxie télangiectasique
ATM:	Ataxia-telangiectasia mutated gene
CATF1:	Cardiac transcription factor 1
CDD:	Conserved domain database
CEL:	Carboxyl ester lipase
CFTR:	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHUM:	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CIHR:	Canadian Institutes of Health Research
cM:	Centi Morgan
CMT:	Charcot-Marie-Tooth
CYP27B1:	Cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1
D.A.S.O:	Dynamic allele specific oligonucleotide
dATP:	deoxy-adenosine triphosphate
dATP35S:	deoxy-adenosine triphosphate marqué au soufre 35
Del:	Deletion
DMOP:	Dystrophie musculaire oculopharyngée
DNA:	Desoxyribonucleic acid
DNA2L:	DNA replication helicase 2-like
dNTP:	deoxy-nucleotide triphosphate
DOS:	Disk operating system
EMG:	Electromyography
FAH:	Fumarylacetoacetate hydrolase
FES:	Faculté des Études Supérieures
FRDA:	Friedreich's ataxia

FRSQ:	Fonds de recherche en santé du Québec
FS:	Forssman glycolipid synthetase
Fs:	Frameshift (changement de cadre de lecture)
GFI1B:	Growth factor independent 1B
GTF3C5:	General transcription factor IIIC, polypeptide 5
HMSN:	Hereditary motor sensory neuropathy
HSAN1:	Hereditary sensory autonomic neuropathy type 1
HSAN2:	Hereditary sensory autonomic neuropathy type 2
HSAN3:	Hereditary sensory autonomic neuropathy type 3
HSAN4:	Hereditary sensory autonomic neuropathy type 4
HSAN5:	Hereditary sensory autonomic neuropathy type 5
HSN:	Hereditary sensory neuropathy
HSN2:	Hereditary sensory neuropathy type 2
IGHMBP2:	Immunoglobulin mu binding protein 2
IKBKAP:	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells, kinase complex-associated protein
IKK:	I kappa B kinase
Ins:	Insertion
Kbp:	Kilobase
LITAF:	Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor
LOD:	Logarithm of odds
LRPPRC:	Leucine-rich PPR motif-containing protein
Mb:	Megabase
MDC:	Muscular dystrophy Canada
MIM:	Mendelian inheritance in man
MRI:	Magnetic resonance imaging
NAM7:	Nuclear accommodation of mitochondria 7
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
NGF:	Nerve growth factor
NGFB:	Nerve growth factor beta subunit
NHS:	Névrite héréditaire sensitive
NHSA:	Névrite héréditaire sensitive et autonome
NHSA1:	Névrite héréditaire sensitive et autonome de type 1
NHSA2:	Névrite héréditaire sensitive et autonome de type 2
NHSA3:	Névrite héréditaire sensitive et autonome de type 3
NHSA4:	Névrite héréditaire sensitive et autonome de type 4
NHSA5:	Névrite héréditaire sensitive et autonome de type 5
NLS:	Nuclear localization signal
NMD:	Non-sense mediated RNA decay
nmd:	Neuromuscular degeneration
NPC1:	Niemann-Pick C1
NTRK1:	Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1
ORF:	Open reading frame

PABPN1:	Poly(A) binding protein nuclear 1
PCR:	Polymerase chain reaction
PcrA:	(per)chlorate reductase
RALGDS:	Ras-related guanine nucleotide dissociation stimulator
RENT1:	Regulator of nonsense transcripts 1
RMGA:	Réseau de Médecine Génétique Appliquée
RNA:	Ribonucleic acid
SACS:	Sacsin
SCAN1:	Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1
SCAN2:	Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-2
SEN1:	Senescence-associated protein
SETX:	Senataxin
SIMPLE:	Small integral membrane protein of lysosome/late endosome
SLA4:	Sclérose latérale amyotrophique de type 4
SLC12A6:	Solute carrier family 12, member 6
SMA:	Spinal muscular atrophy
SMARD1:	Spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1
SNAP:	Sensory nerve action potentials
SPTLC1:	Serine palmitoyltransferase, long chain-base subunit 1
TDP1:	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1
Tm:	Melting temperature
TRKA:	Tyrosine kinase receptor A
tRNA:	Transfert ribonucleic acid
UCSC:	University of California Santa Cruz
Ufp1:	Up-frameshift suppressor 1
WNT5B:	Wingless-related MMTV integration site 5B

Nucléotides

A:	Adénine
T:	Thymine
C:	Cytosine
G:	Guanine
U:	Uracile

Code génétique

1 ^{ère} position	2 ^{ème} position				3 ^{ème} position
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Acides aminés

A : Ala : Alanine	M : Met : Méthionine
C : Cys : Cystéine	N : Asn : Asparagine
D : Asp : Aspartate	P : Pro : Proline
E : Glu : Glutamate	Q : Gln : Glutamine
F : Phe : Phénylalanine	R : Arg : Arginine
G : Gly : Glycine	S : Ser : Sérine
H : His : Histidine	T : Thr : Thréonine
I : Ile : Isoleucine	V : Val : Valine
K : Lys : Lysine	W : Trp : Tryptophane
L : Leu : Leucine	Y : Tyr : Tyrosine

" En essayant continuellement on finit par réussir.
Donc : plus ça râte, plus on a de chances que ça marche. "

Devise Shadok

À mes deux amours :
à Christophe,
à cet enfant qui grandit en moi,
c'est ici que tout commence...

Remerciements

Je remercie le Dr Bernard Brais pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Il a su se montrer à la fois patient, indulgent et motivant. Il a su adopter un rôle de pédagogue, d'éducateur et parfois paternel et m'aider à traverser les quelques turbulences que j'ai eu à surmonter.

Je remercie sincèrement les patients et leurs familles qui ont accepté de se joindre à ces projets. Il ne faut jamais oublier que c'est pour eux et par eux que nous avançons.

Je remercie les assistants de recherche qui ont séjourné parmi nous. Anik St-Denis pour m'avoir formée et initiée aux techniques de biologie moléculaire. Martin Pagé pour son dynamisme et sa bonne humeur. Josée Poirier pour sa bienveillance. Je voudrais rendre un hommage particulier à notre "maman de labo", Marie-Josée Dicaire. Elle a su être présente à chaque instant, me guider et me soutenir dans mes choix et être une oreille attentive. Sans elle et son savoir nous serions perdus. Je la remercie également pour avoir été une courageuse correctrice d'épreuves.

Je remercie tous les étudiants du laboratoire que j'ai côtoyés ou parfois juste croisés au cours de ces années.

Je remercie Damian Labuda, Stéphane Bourgeois, Claudia Moreau et Vania Yotova ainsi que toutes les autres personnes que j'ai pu rencontrer au Centre de Recherche de l'hôpital Sainte-Justine. Grâce à leur collaboration, leur accueil chaleureux et leur patience, ce fut un réel plaisir d'être leur hôte durant ce trop court séjour.

Je remercie mes parents pour m'avoir soutenue tout au long de mes études et du long et exigeant parcours préparatif à cette belle aventure au Canada.

Je remercie la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal, le Centre de Recherche du CHUM et l'Association pour les Bénéficiaires des Cliniques de la Douleur (ABC Douleur) pour les bourses et les prix de présentation qu'ils m'ont décernés.

Je remercie le personnel de la Faculté des Études Supérieures et en particulier Mme Vivianne Jodoin pour avoir toujours trouvé réponse à mes nombreuses interrogations.

Et finalement, mon plus grand merci - et ce mot est bien trop petit - va à Christophe. Plus qu'un mari, il est aussi mon meilleur ami. Son amour n'a d'égal que celui que je lui porte en retour. Je le remercie du fond du cœur pour m'avoir soutenue tout au long de ce parcours, pour avoir cru en moi, pour avoir partagé mes doutes et mes craintes, pour être toujours là. Je le remercie également pour avoir installé les programmes de la suite GENEHUNTER et nous avoir initiés à UNIX, pour m'avoir aidée dans la réalisation et l'interprétation des figures de structure tridimensionnelle et pour avoir été un attentif relecteur.

Avant propos

Les Sciences ont toujours constitué pour moi un monde fascinant, regorgeant de mystères que ses adeptes s'efforcent de percer. Les matières scientifiques ont, dès le début de ma scolarité, compté parmi les plus attrayantes. Au sein du grand nombre de champs que regroupent les Sciences, c'est d'abord vers l'étude du vivant et par la suite vers cette vaste et toujours grandissante discipline qu'est la génétique que mon intérêt s'est dirigé.

Plusieurs événements sont à l'origine de cette orientation. Je n'oublierai jamais les cours si captivants et éducatifs de mon premier professeur de sciences naturelles, Mr. Pierre Pélissier. Mon penchant pour la génétique s'est d'abord développé lors de l'enseignement des bases de l'hérédité. On nous parlait alors des travaux minutieux et déterminants menés il y a plus de 140 ans par le moine morave Grégor Mendel, personnage dont l'ingéniosité m'émerveillait. Par la suite, on nous enseignait la génétique morganienne basée sur la découverte de la structure de l'ADN il y a plus de 50 ans. Le fait qu'un code universel si simple puisse engendrer autant de complexité se reflétant dans le monde vivant éveillait d'autant plus mon intérêt pour cette discipline. Plus récemment, en 2001, le décès à 21 ans de mon cousin Matthew qui souffrait de fibrose kystique a confirmé cette vocation et a révélé ma préférence pour la génétique médicale.

C'est donc sans hésiter que j'ai accepté de me joindre à l'équipe qui constituait le laboratoire du Dr Bernard Brais et de me consacrer aux deux projets de recherche qu'il m'a offerts. L'étude génétique de ces maladies m'a permis non seulement d'acquérir des techniques nouvelles, mais aussi de trouver dans le travail expérimental une façon différente d'assouvir mon

appétence artistique et créatrice. J'ai pu également éprouver la grande satisfaction de pouvoir apporter des réponses aux attentes des patients et de leurs familles, ce qui a comblé mon besoin d'entraide auquel j'accorde une profonde importance. Le laboratoire du Dr Bernard Brais se consacre aux maladies neurogénétiques dont la particularité réside dans le fait qu'elles sont issues d'effets fondateurs. Cette singularité m'a amenée à découvrir l'histoire captivante de la colonisation du Québec et du peuple québécois.

Ces années passées au sein de ce groupe de recherche m'auront permis de développer de nouvelles habiletés tout en découvrant un nouveau continent, une nouvelle population et sa culture.



INTRODUCTION

Les effets fondateurs au Québec

Un effet fondateur est un phénomène qui se produit lorsqu'un groupe restreint extrait d'une population mère constitue le noyau fondateur d'une population fille soumise à une isolation géographique (pour des raisons linguistiques, religieuses, géographiques ou autres) (Gagnon 2001; Scriver 2001). Les membres de la population se seront alors mariés entre eux et toute leur descendance aura hérité uniquement du bagage génétique du groupe fondateur. Du fait de sa petite taille, la population fille aura été soumise au phénomène de dérive génétique propre à l'effet fondateur. C'est-à-dire que certains allèles se seront fixés, même s'ils étaient rares au sein de la population mère. Si l'une des personnes de la population fondatrice était porteuse d'une mutation génétique, la fréquence de cette mutation pourra se trouver augmentée sous l'effet du phénomène de dérive génétique (Gagnon 2001; Scriver 2001).

Ainsi, on ne peut pas parler d'effet fondateur et essayer d'étudier une ou plusieurs maladies dont on soupçonne qu'un tel phénomène est à l'origine de leur apparition dans une population sans se pencher sur l'histoire de cette population.

A. La naissance du Nouveau Monde

La province du Québec compte sur ses 7,5 millions d'habitants environ 6 millions de Canadiens français descendants de quelques 8500 à 12000 pionniers français qui auraient laissé une descendance en Nouvelle France entre 1608 et 1759 (Gagnon 2001; Scriver 2001).

La naissance de la population québécoise remonte à 400 ans environ. C'est l'émigration de pionniers originaires de plusieurs régions de France aux 17^{ème} et 18^{ème} siècles qui en fut à l'origine. Ces pionniers donnèrent par la suite deux populations distinctes, celle du Québec et celle de l'Acadie (Figure 1). En 1608, Samuel de Champlain, mandaté par Henri IV fonda la ville de Québec. En 1634, il établit la ville de Trois-Rivières. À cette époque, environ 200 pionniers étaient établis. En 1642, la ville de Montréal fut fondée par Sieur de Maisonneuve et Sœur Jeanne Mance (Figure 1). Entre 1608 et 1680, 3380 pionniers seraient arrivés au Canada dont 2600 auraient contribué aux deux tiers du patrimoine génétique des Canadiens français. Suite à la guerre de sept ans (1756-1763) ponctuée en 1759 par la prise de possession de la colonie par les Britanniques et en 1763 par le traité de Paris, la démographie du Québec changea. L'immigration française cessa au profit de l'arrivée d'immigrants venus de Grande-Bretagne et de Loyalistes venus des Etats-Unis suite à la révolution américaine. La saturation des parcelles agricoles des basses terres du Saint-Laurent au début du 19^{ème} siècle mena à l'ouverture de nouvelles régions de colonisation. Parmi ces nouveaux "arrières-pays", la région du Saguenay Lac-St-Jean fut la plus importante en terme de démographie. Une partie importante de la population de cette région fut originaire de la région voisine de Charlevoix (Figure 1), ce qui a eu un impact important sur la fréquence de certaines maladies génétiques. Durant les trois décennies suivant la deuxième guerre mondiale, une nouvelle vague d'immigrants beaucoup plus hétérogène s'établit au Québec (Gagnon 2001; Scriver 2001).

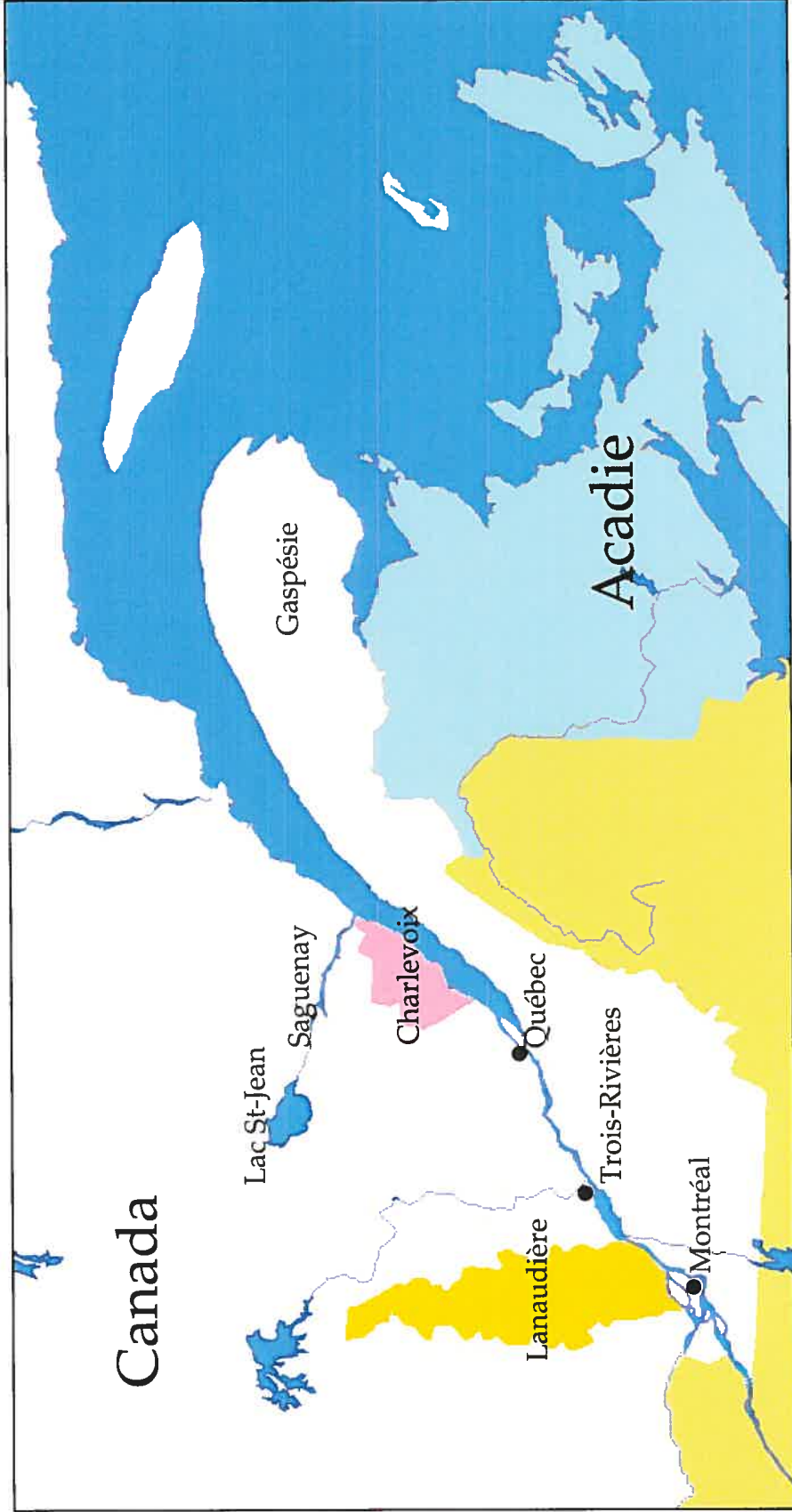


Figure 1 : Carte géographique du Sud-Est du Canada.

B. Les maladies à effet fondateur au Québec

La colonisation, l'immigration, les migrations internes et l'expansion démographique sont à l'origine de la formation de sous-populations régionales au sein du territoire québécois. Plus de 22 maladies génétiques mendéliennes ont été associées à certaines de ces régions (Scriver 2001).

Au Québec les maladies à effet fondateur peuvent être divisées en trois catégories. La première comprend les maladies spécifiques au Québec qui sont pratiquement inconnues ailleurs dans le monde et qui ont une prévalence élevée dans la population canadienne-française (l'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay, la polynévrite avec ou sans agénésie du corps calleux, le syndrome de Leigh, l'atrésie intestinale multiple) (Table I). Dans la deuxième, on retrouve des maladies non-spécifiques au Québec qui sont répandues ailleurs dans le monde mais pour lesquelles la fréquence est particulièrement élevée chez les Canadiens français (l'ataxie de Friedreich, la tyrosinémie, la dystrophie musculaire oculopharyngée, la fibrose kystique, le rachitisme vitamino-dépendant) (Table II). Finalement dans la troisième catégorie sont regroupées les maladies spécifiques aux populations amérindiennes. Cette dernière catégorie ne sera pas discutée dans ce mémoire.

Table I : Maladies héréditaires spécifiques observées au Québec.

Maladie	MIM	Caractéristiques cliniques	Gène muté	Nombre de mutations connues au Québec	Région touchée	Incidence dans la région (1/naissances)	Taux de porteurs dans la région	Références
Ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay	270 550	Ataxie à la marche, dysarthrie, spasticité, nystagmus, amyotrophie, troubles de la poursuite oculaire, striation rétinienne	SACS	2 (92,6% pour la plus fréquente)	Charlevoix-Saguenay	1/1519 (Charlevoix) 1/1952 (Saguenay)	1/22	(Bouchard 1978; Engert 2000; Laberge 2005)
Polynévrite avec ou sans Agénésie du corps calleux	218 000	Faiblesse musculaire (hypotonie), dysmorphie, incapacité à développer la marche, retard mental, crises d'épilepsie	SLC12A6	2 (99,4% pour la plus fréquente)	Charlevoix-Saguenay	1/2117	1/23	(Andermann 1972; Howard 2002; Laberge 2005)
Syndrome de Leigh	220 111	Hypotonie, retard de développement, décès dans l'enfance	LRPPRC	2 (98% pour la plus fréquente)	Charlevoix-Saguenay	1/2178	1/28	(Mootha 2003; Laberge 2005)
Atrésie intestinale multiple	243 150	Obstruction intestinale, calcification intraabdominale, décès avant 4 mois	-	-	Saguenay	Très rare	-	(Bouchard 1990; Laberge 2005)

- : L'information n'est pas connue

Table II : Maladies héréditaires non-spécifiques observées au Québec.

Maladie	MIM	Caractéristiques cliniques	Gène muté	Nombre de mutations plus fréquentes au Québec	Région touchée	Incidence dans la région (1/naissances)	Taux de porteurs dans la région	Références
Ataxie de Friedreich	229 300	Ataxie à la marche, incoordination, dysarthrie, scoliose, cardiomyopathie	<i>FRDA</i>	-	Rimouski	-	-	(Bouchard 1990; Laberge 2005)
Tyrosinémie	276 700	Retard de développement, troubles intestinaux, distension intestinale, jaunisse, cirrhose	<i>FAH</i>	1 (95,4%)	Charlevoix-Saguenay	1/1846	1/22	(Bouchard 1990; Laberge 2005)
Syndrome de Tay Sachs	272 800	Apathie, perte des fonctions motrices, cécité	<i>HEXA</i>	1 (75%)	Gaspésie-Bas-St-Laurent (Juifs Ashkénazes)	Diminué de 90% depuis les années 70	-	(Bouchard 1990; Laberge 2005)
Dystrophie* musculaire oculopharyngée	164 300	Ptose (chute des paupières), dysphagie	<i>PABPN1</i>	1 (98,6%)	Charlevoix-Saguenay	1/1000	-	(Laberge 2005)
Fibrose kystique	219 700	Troubles respiratoires, insuffisance pancréatique, cirrhose, aspermie	<i>CFTR</i>	3 (70% pour la plus fréquente)	Charlevoix-Saguenay	1/936 (1/2500 au Québec)	-	(Bouchard 1990; Scriver 2001)
Rachitisme vitamino-dépendant	264 700	Fontanelle déprimée, irritabilité, léthargie, hypotonie, convulsions, faiblesse osseuse	<i>CYP27B1</i>	2 (91,7% pour la plus fréquente)	Charlevoix-Saguenay	1/2916	1/27	(Bouchard 1990; Laberge 2005)

- : L'information n'est pas connue; * Contrairement aux autres, cette maladie est autosomique dominante

C. L'exemple de l'ARSACS

L'ataxie spastique récessive de Charlevoix-Saguenay (ARSACS) est probablement une des maladies récessives à effet fondateur les plus étudiées au Québec. Cette maladie a été décrite pour la première fois par Jean-Pierre Bouchard en 1978 (Bouchard 1978). Cette affection neurodégénérative qui est presque exclusive au Charlevoix-Saguenay-Lac-St-Jean présente une fréquence très élevée dans cette région (Table I). En 1978, Jean-Pierre Bouchard a suggéré que l'ARSACS pourrait être le fruit d'un effet fondateur et qu'elle serait originaire d'un couple français établi à Québec dans les années 1650 (Bouchard 1978). La migration dont découle la population de la région du Saguenay Lac-St-Jean (330 000 habitants) a joué un rôle essentiel dans la prévalence élevée de l'ARSACS. De plus, au sein des familles présentant des cas atteints, la consanguinité est légèrement plus élevée (13%) (De Braekeleer 1993).

En 2000, le gène muté *SACS* a été identifié et deux mutations qui tronquent la protéine ont été découvertes. La première (g.6594delT) est responsable de 92,6% des cas tandis que la seconde (g.5254C→T) n'en explique que 3,7%. Plusieurs autres mutations ont été rapportées dans ce gène chez des patients italiens (Criscuolo 2004; Grieco 2004), japonais (Ogawa 2004; Hara 2005) et tunisiens (El Euch-Fayache 2003) présentant un phénotype similaire.

La liste des maladies présentées ci-dessus n'est pas exhaustive. D'autres maladies héréditaires sont présentes au Québec, mais seules celles qui ont une fréquence plus élevée ont été retenues.

Parmi les maladies citées, plusieurs sont des maladies neurogénétiques : l'ataxie spastique récessive de Charlevoix-Saguenay, la polynévrite avec ou sans agénésie du corps calleux, le syndrome de Leigh, l'ataxie de Friedreich et

la maladie de Tay Sachs. Il existe donc plusieurs maladies neurogénétiques qui sont le fruit d'effets fondateurs régionaux.

D. Hypothèses de travail

Nous avons formulé les deux hypothèses suivantes : les deux maladies que nous souhaitons étudier, à savoir la névrite héréditaire sensitive et autonome de type 2 (NHSA2) et l'ataxie avec apraxie oculaire de type 2 (AOA2) sont le fruit d'effets fondateurs et une mutation est à l'origine d'une grande majorité des cas.

Ces hypothèses de travail se sont basées sur plusieurs observations. D'un côté sur les particularités des données que nous avons pu accumuler sur ces deux maladies ainsi que sur les cohortes de patients atteints. D'un autre côté sur les connaissances tirées de l'expérience de l'ARSACS et sur la découverte du gène responsable de cette maladie.

Pour la NHSA2 comme pour l'AOA2, les patients présentaient un phénotype relativement homogène. De plus, la distribution géographique semblait restreindre l'incidence de chacune des maladies à une région particulière du Québec. Ces caractéristiques n'étaient pas sans rappeler les particularités associées au cas de l'ARSACS pour laquelle le phénotype est assez homogène et l'incidence presque exclusive aux régions de Charlevoix et du Saguenay.

Comme nous l'avons mentionné, l'ARSACS est l'exemple le plus connu de maladie à effet fondateur au Québec. Cette maladie faisant en plus partie des maladies neurogénétiques, cela en fait une référence de choix pour notre étude. André Barbeau (1931-1986) a développé un concept permettant de différencier les diverses formes d'ataxies en intégrant les observations cliniques et la distribution régionale des cas. C'est en marchant dans ses pas que Jean-Pierre Bouchard a, en 1978, pu identifier une nouvelle forme

d'ataxie : l'ARSACS. Cette expérience nous montre que l'intégration des caractéristiques cliniques et du contexte géographique est importante lors de l'étude de nouvelles maladies au Québec. Une étude de liaison fructueuse a permis la découverte du gène *SACS* muté dans l'ARSACS confirmant que cette méthode d'analyse serait appropriée pour identifier les gènes mutés pour ces deux nouvelles maladies.

Ainsi, tout portait à croire que nous étions une fois de plus face à deux maladies issues d'effets fondateurs au Québec.

E. Objectifs

Pour l'étude de la NHSA2, nous avons pour objectifs :

1. De faire une étude de liaison dans la région candidate.
2. De séquencer les gènes candidats afin d'identifier les mutations responsables de la maladie chez les Canadiens français.
3. D'estimer le taux de porteurs pour les mutations identifiées.
4. De proposer un test diagnostique afin d'offrir un dépistage aux patients et aux membres de leurs familles et de déterminer de quelle mutation ils sont porteurs.

Pour l'étude de l'AOA2, nous avons pour objectifs :

1. De séquencer les gènes candidats de l'intervalle défini afin d'identifier les mutations responsables de la maladie chez les Canadiens français.
2. D'évaluer le taux de porteurs pour les mutations identifiées.
3. De proposer un test diagnostique afin d'offrir un dépistage aux patients et aux membres de leurs familles et de déterminer de quelle mutation ils sont porteurs.

Nous avons choisi de présenter les deux articles scientifiques publiés qui rapportent les résultats que nous avons obtenus au cours des études génétiques de la NHSA2 et de l'AOA2. Un premier chapitre traitera de l'étude génétique de la NHSA2. Il sera suivi d'un deuxième chapitre où sera exposé l'étude génétique de l'AOA2. Un troisième chapitre présentera une étude comparative entre différentes méthodes d'analyse de liaison. Et, finalement, une discussion clôturera ce mémoire.



CHAPITRE I

Étude génétique de la NHSA2

A. Introduction

1. Historique

Les Névrites Héréditaires Sensitives et Autonomiques (NHSA) constituent un groupe de maladies cliniquement et génétiquement hétérogènes causées par une dégénérescence primaire de neurones sensitifs et autonomiques (Dyck 1983).

De nombreux cas de NHSA ont été décrits depuis plus de 150 ans; les premières descriptions remontent à 1846 par Leplat (Dyck 1993). Historiquement, les maladies étaient nommées selon leurs symptômes ou leurs complications. Ainsi, les NHSA ont arboré plusieurs noms tels que « l'acropathie mutilante », « l'acro-ostéolyse », « le mal perforant du pied » et « la maladie de Morvan » (Dyck 1993). Le mal perforant du pied a été décrit en 1846 par Leplat; considérant la description clinique de ses cas, ils étaient probablement atteints de la NHSA de type 1 (voir Table III). Les cas décrits par Morvan en 1883 (Morvan 1883) présentaient des caractéristiques cliniques des NHSA mais aussi des caractéristiques qui ne font pas partie du phénotype tel que décrit par Dyck (Dyck 1983), ces cas étaient vraisemblablement atteints de syringomyélie. Ainsi, plusieurs maladies dont les NHSA et la syringomyélie ont été regroupées dans la même catégorie malgré des caractéristiques différentes.

2. Classification des NHSA

Les NHSA ont été classifiées pour la première fois par Ohta et Dyck en 1973 (Ohta 1973). Ils proposèrent de les diviser en quatre types de Névrites

Héréditaires et Sensitives (NHS 1 à 4). En 1984, Dyck suggéra de modifier le nom pour Névrite Héréditaire Sensitive et Autonome (NHSA) considérant que des manifestations autonomes étaient présentes dans ces maladies. Plus tard, il ajouta un cinquième type de NHSA à la classification (Dyck 1993) (Table III). Il définit que les maladies regroupées sous le terme (NHSA) partagent les caractéristiques suivantes : elles sont héréditaires et les neurones primaires sensitifs et autonomes ne se développent pas ou dégénèrent (Dyck 1993).

Table III : Classification des névrites sensitives et autonomiques.

Nom	MIM	Mode de transmission	Caractéristiques cliniques	Locus	Gène	Nombre de mutations connues	Références
NHSA1	162 400	Autosomique dominant	Neuropathie sensorimotrice, ulcères aux pieds, douleurs lancinantes, surdité bilatérale	9q22.1-q22.3	<i>SPTLC1</i>	5	(Hicks 1922; Silverman 1959; Ervin 1960; Nicholson 1996; Bejaoui 2001; Dawkins 2001)
NHSA2	201 300	Autosomique récessif	Neuropathie sensitive, fractures et ulcères non douloureux, diminution des réflexes ost�otendinaux, anhidrose	12p13.33	<i>HSN2</i>	5	(Heller 1955; Hould 1967; Ohta 1973; Dyck 1983; Lafreniere 2004; Roddier 2005)
NHSA3	223 900	Autosomique récessif	Acrylamie, absence de papilles linguales, instabilité vasomotrice et cardiovasculaire, hypertension, hypotension, diminution de réflexes ost�otendinaux, indifférence aux variations de température	9q31	<i>IKBKAP</i>	3	(Riley 1949; Blumenfeld 1993; Blumenfeld 1999; Slaugenhaupt 2001)
NHSA4	256 800	Autosomique récessif	Insensibilité à la douleur entraînant des automutilations, anhidrose, hyperpyrexie pouvant conduire à la mort, retard mental	1q21-q22	<i>NTRK1</i> <i>TRKA</i>	37	(Swanson 1963; Swanson 1965; Sneyne 1994; Indo 1996; Indo 2001)
NHSA5	608 654	Autosomique récessif	Insensibilité à la douleur entraînant des automutilations, anhidrose, indifférence aux variations de température	1p11.2-p13.2	<i>NGFB</i>	1	(Dyck 1983; Einarsdottir 2004)

B. La névrite héréditaire sensitive et autonome de type 2 (NHSA2)

1. Historique

D'abord appelée Maladie de Morvan, la NHSA2 est une maladie rare à l'échelle mondiale dont la première description remonte à 1973, quand Ohta *et al.* (Ohta 1973) décrivent une famille canadienne-française précédemment décrite par Hould et Verret en 1967 (Hould 1967). En 1970, Haddow *et al.* (Haddow 1970) décrivent le cas d'un frère et d'une sœur et conclurent qu'ils étaient atteints de la même forme de neuropathie que les cas décrits par Hould et Verret en 1967. C'est dans l'article publié par Ohta en 1973 que les auteurs attribuèrent le nom de NHSA2 à cette neuropathie et définirent les caractéristiques cliniques associées. Par la suite, plusieurs nouveaux cas furent décrits, mais 50% des cas de la littérature sont d'origine canadienne-française, tels que la famille issue de la région de Lanaudière décrite par Heller et Robb en 1955 (Heller 1955).

2. Mode de transmission

Heller et Robb (Heller 1955) pensaient que leur famille présentait un mode de transmission autosomique dominant avec une pénétrance variable, mais il a été confirmé suite à l'étude des différentes cohortes décrites dans la littérature que la NHSA2 présente un mode de transmission autosomique récessif. Dans la famille décrite par Heller et Robb (Heller 1955), les parents et les grands-parents n'étaient pas atteints, quatre enfants sur sept étaient atteints, dont trois garçons et une fille, et deux autres individus qui étaient les neveux de leur grand-mère maternelle étaient eux aussi atteints. D'autres familles décrites dans la littérature sont aussi compatibles avec un mode de

transmission autosomique récessif (Parks 1945; Ogryzlo 1946; Lessard 1953; Murray 1973).

3. Phénotype

Les caractéristiques cliniques, électromyographiques et pathologiques ont été clairement décrites pour la première fois par Ohta et Dyck en 1973 (Ohta 1973). La NHSA2 est diagnostiquée dans l'enfance lorsque les jeunes patients se présentent avec des fractures ou des ulcères indolores au niveau des extrémités. Les personnes atteintes présentent une perte de sensibilité distale des membres et développent des ulcères et des fractures non douloureux des pieds et des mains. À l'examen pathologique de nerfs périphériques, on observe une diminution marquée des petites fibres myélinisées associée cliniquement à des pertes de toutes les modalités sensibles distales. Les déficits sensitifs augmentent avec l'âge, mais tendent à se stabiliser à l'âge adulte. Les infections, l'automutilation et les traumatismes répétés mènent à des hospitalisations nombreuses et à des pertes de parties des extrémités par amputation chirurgicale ou nécrose.

Les critères établis en 1983 par Dyck (Dyck 1983) pour la NHSA2 sont :

1. Mode de transmission autosomique récessif.
2. Début de la maladie durant l'enfance.
3. Présence d'infection des tissus mous des extrémités, avec fractures et une arthropathie neurogène secondaire.
4. Déficit sensitif incluant toutes les modalités et concernant surtout les parties distales des membres inférieurs et supérieurs et éventuellement le tronc.
5. Diminution ou abolition des réflexes ostéotendineux au niveau des membres.

6. Absence ou diminution sévère des fibres myélinisées ainsi qu'une diminution des fibres non myélinisées à la biopsie du nerf sural.
7. Absence d'hypotension orthostatique, de troubles sphinctériens ou d'impuissance.
8. Absence de potentiel sensitif à l'électromyogramme.
9. Anhidrose possible, surtout marquée au niveau des extrémités distales.

Une meilleure définition de cette maladie permet non seulement un diagnostic plus précis mais ouvre aussi la porte à l'étude des bases génétiques de la NHTA2.

C. Publication du locus et du gène pour la NHTA2

En 2004, Lafrenière *et al.* ont publié la description de deux grandes familles vivant à Terre-Neuve. Suite à un criblage entier du génome ("genome wide scan") dont la distance entre deux marqueurs était de 5 cM, une étude de liaison leur a permis de définir un intervalle candidat de 1,06 cM au locus 12p13.33 (avec un LOD score maximal de 8,4). Après avoir exclu les sept gènes connus dans leur intervalle, ils identifièrent trois mutations dans une séquence présumée codante (ORF) fortement conservée qu'ils nommèrent HSN2 (Lafreniere 2004) (Figure 2).



Figure 2 : Représentation de la carte physique de la région entre les marqueurs D12S352 et D12S100.

Suite à cette publication, nous avons entrepris une étude de liaison pour confirmer la liaison de nos familles au même locus et nous avons séquençé le gène *HSN2* dans le but d'identifier les mutations responsables de la NHSA2 chez les Canadiens français. Ces travaux ont mené à la publication de l'article qui suit.

D. Article scientifique

Two Mutations in the *HSN2* Gene Explain the High Prevalence of HSAN2 in French Canadians^{a,b}

K. Roddier, BSc^{1*}; T. Thomas, MD^{1*}; G. Marleau, BSc¹; A.M. Gagnon, BSc¹; M.J. Dicaire, BSc¹; A. St-Denis, MSc¹; I. Gosselin, BSc¹; A.M. Sarrazin, MD²; A. Larbrisseau, MD³; M. Lambert, MD³; M. Vanasse, MD³; D. Gaudet, MD PhD⁴, G.A. Rouleau MD, PhD⁵ and B. Brais, MD, PhD¹

*These authors have contributed equally to this work

Neurology 2005 may, 64(10) : 1762-1767

From the

¹ Laboratoire de neurogénétique, Centre de recherche du CHUM, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

² Centre Hospitalier Régional de Lanaudière, Saint-Charles-Borromée, Québec, Canada

³ Département de pédiatrie, Hôpital Sainte-Justine et Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

⁴ Centre de médecine génique communautaire de l'Université de Montréal, Centre Hospitalier de la Sagouamie, Saguenay, Québec, Canada

⁵ McGill Health Centre, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

^a L'article est présenté sous sa forme originale en annexe 1.

^b L'article qui suit est présenté sous une forme intégrale dans laquelle des informations complémentaires ajoutées à la suite de la discussion sont référencées. Il est à noter que les références à ces informations n'apparaissent pas dans la forme originale de l'article présentée en annexe 1.

Address correspondence to:

Dr. B. Brais, Centre de recherche du CHUM, Hôpital Notre-Dame-CHUM,
M4211-L3, 1560, rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada.

Tel. 1-514-890-8000 ext. 25560, Fax. 1-514-412-7525,



1. Contribution des coauteurs

Katel Roddier^c : Genotypage, haplotypage, étude de liaison au locus 12p13.33, prédiction du nombre de mutations distinctes, identification et caractérisation des mutations, rédaction de la version finale du manuscrit.

Tina Thomas : Recrutement des familles, évaluation et description clinique des patients, contribution à la rédaction d'une première version du manuscrit.

Geneviève Marleau : Analyse des résultats des deux criblages entiers du génome et cartographie fine pour les régions positives.

Anne-Marie Gagnon : Production et analyse des données pour le deuxième criblage entier du génome.

Marie-Josée Dicaire : Production et analyse des données pour le premier le criblage entier du génome (Weber 9 panel).

Anik St-Denis : Participation à l'analyse des résultats des deux criblages entiers du génome et à la cartographie fine pour les régions positives.

Isabelle Gosselin : Identification et caractérisation de la mutation chez le cas d'origine libanaise.

^c Les aspects de l'article auxquels seule Mme Tina Thomas a participé sont traités dans son mémoire de maîtrise en sciences neurologiques (Université de Montréal) et n'apparaissent pas dans notre discussion. Les travaux des deux candidats qui ont mené à la rédaction de cet article sont substantiels et suffisamment distincts pour mériter que l'article soit reproduit dans les deux mémoires.

Anne-Marie Sarrazin : Évaluation clinique de certains cas.

Albert Larbrisseau : Évaluation clinique de certains cas.

Marie Lambert : Évaluation clinique de certains cas.

Michel Vanasse : Évaluation clinique de certains cas.

Daniel Gaudet : Évaluation clinique de certains cas.

Guy A. Rouleau : Partage d'information sur le locus avant publication.

Bernard Brais : Recrutement des familles, évaluation et description clinique des patients, supervision lors des criblages entiers du génome, de l'étude de liaison et de la recherche de mutations, estimation du taux de porteurs, contribution à la rédaction et correction du manuscrit.

2. Acknowledgments

The authors thank the patients and their relatives for their participation in this study. They also thank the following colleagues: R. Bonin, J.-P. Bouchard, M.-P. Dubé, P.J. Dyck, M. Goulet, I.H. Heller, R. Lafrenière, B. Lemieux, S. Maari, J. Mathieu, C. Prévost, M. Samuels and S. Veret. This project was supported by the ECOGENE-21 Interdisciplinary CIHR team grant of the Centre de médecine génique communautaire de l'Université de Montréal, the Démogénique and Génétique communautaire axes of the Réseau de médecine génétique appliquée (RMGA) du Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ), and the Association de la Neuropathie sensorielle et autonome héréditaire de type 2. Dr. Brais is a chercheur-boursier of the FRSQ.

3. Abstract

Background: Hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2 (HSAN2; MIM 201300) is a rare recessive neuropathy typically diagnosed in the first decade. The 1973 study of a French Canadian family led to the definition of HSAN2. *Objectives:* To demonstrate that the apparent higher prevalence of HSAN2 in Quebec is due to the presence of two *HSN2* mutations and that carriers of different mutations appear to have a similar phenotype. *Methods:* Through attending physicians, the authors recruited French Canadian patients with HSAN2. Exclusion of linkage to the known HSAN loci and linkage to the HSAN2 was performed using standard methods. Sequencing of the *HSN2* gene was used to uncover the causal mutations. *Results:* A large cluster of HSAN2 patients comprising 16 affected individuals belonging to 13 families was identified. The mode of inheritance is clearly autosomal recessive. All patients originated from southern Quebec, and 75% are from the Lanaudière region. Whereas linkage to the HSAN1, 3 and 4 loci was excluded, linkage to the 12p13.33 HSAN2 locus was confirmed. Sequencing of the *HSN2* gene uncovered two French Canadian mutations and a novel nonsense mutation in a patient of Lebanese origin, all predicted to lead to truncations of the HSN2 protein. The comparison of clinical variables between patients with different genotypes does not suggest any difference in phenotype. *Conclusions:* Two founder mutations are responsible for the apparently higher prevalence of HSAN2 in French Canadians. Genotype-phenotype correlation does not suggest any significant clinical variability.

4. Introduction

Hereditary sensory and autonomic neuropathies (HSANs) are a group of clinically and genetically heterogeneous disorders associated with sensory dysfunction. During the last decade, through positional cloning and candidate gene screening strategies, the loci and mutated genes have been identified for HSAN1 (MIM 162400), HSAN3 (MIM 223900), HSAN4 (MIM 256800) and HSAN5 (Blumenfeld 1993; Indo 1996; Nicholson 1996; Blumenfeld 1999; Anderson 2001; Dawkins 2001; Slaugenhaupt 2001; Einarsdottir 2004). The mutated gene for HSAN2 (neurogenic acroosteolysis, MIM 201300) has only recently been identified (Lafreniere 2004). HSAN2 is a rare recessive disease that was first clearly described in 1973 in a French Canadian kinship (Hould 1967; Ohta 1973). In the literature, >50% of the patients described are of French Canadian background (Lessard 1953; Heller 1955; Dyck 1966; Hould 1967; Ohta 1973). The hallmarks of HSAN2 are an autosomal recessive mode of inheritance, onset of symptoms in infancy or early childhood, occurrence of distal extremity pathologies (paronychia, whitlows, ulcers and necrosis Charcot joints), frequent amputations, sensory loss that affects all modalities of sensation (lower and upper limbs and perhaps the trunk as well), absence or diminution of tendon reflexes (usually in all limbs), minimal autonomic dysfunction, absence of sensory nerve action potentials, and virtual absence of myelinated fibers with decreased numbers of unmyelinated fibers in sural nerves (Ohta 1973; Dyck 1983). Prior to this study, four loss-of-function mutations have been uncovered in the single exon *HSN2* gene encoding a 434 amino acid open reading frame (Lafreniere 2004; Riviere 2004). We have uncovered a large cohort of 16 HSAN2 patients belonging to 13 French Canadian families. We have confirmed that all affected individuals have mutations in the *HSN2* gene. We describe the relative clinical homogeneity of this disease despite the differences in genotype.

5. Methods

Patients recruitment and genealogies

Through attending physicians, we identified 18 patients with HSN2 belonging to 13 families living in southern Quebec. Sixteen subjects agreed to participate in this study following informed consent. Genealogical information was obtained at least up to grandparents in all families (except Family M). Blood samples were collected for the 16 subjects and their relatives. One Canadian patient of Lebanese origin was also recruited after informed consent.

Clinical evaluation and electromyography

All patients were evaluated with standardized questionnaire and examination. Patient medical charts were reviewed. Previous electromyography or nerve biopsy results done in different laboratories were compiled.

Genotype and haplotype analyses

DNA was extracted from blood samples using standard techniques (Sambrook 1989). Information about the 17 polymorphic markers analyzed was obtained from the Genome Database (<http://www.gdb.org/gdb>). PCR was performed in 13 μ L of a mixture containing 0.2 mM of dNTP-A, 0.025 mM of dATP, 0.16 μ L of dATP ³⁵S labelled at 12.5 μ Ci/ μ L, 1X of bovine serum albumin, Taq buffer 1X, 0.9 U of Taq polymerase, 1.15 μ M of each primer and 15 ng of DNA. The amplification procedure was performed with a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA), and it consisted of a hot start of 5 minutes at 94 °C followed by 35 cycles of

denaturing at 94 °C for 30 seconds, annealing at 52, 55 or 58 °C for 30 seconds and elongation at 72 °C for 30 seconds, and a final elongation at 72 °C for 5 minutes, 2.5 µL were loaded on 5% polyacrylamide denaturing gels. Following electrophoresis, the gels were dried and autoradiographs were obtained. The sizes of the different alleles were established by comparing with a standard M13 sequence prepared from the AmpliCycle sequencing Kit (Applied Biosystems). Haplotypes were deduced from family data. The haplotyped carrier chromosomes were studied for all affected individuals, except for three individuals for whom no other familial samples were available (Patients 3, 8 and the Lebanese patient). Some DNA samples were too limited to allow full genotyping (Patient 16).

Sequencing

PCR primers were designed using PrimerSelect 4.03 (DNASTAR) and synthesized by Alpha DNA (Montreal, Canada). Fragments were amplified using the same amplification mix as for genotyping. Amplification was performed in a GeneAmp PCR System 9700 using the following PCR protocol: hot start of 5 minutes at 94 °C followed by 35 cycles of denaturing at 94 °C for 30 seconds, annealing at 58 °C for 30 seconds and elongation at 72 °C for 30 seconds, and a final elongation at 72 °C for 5 minutes. PCR products were sequenced at the Montreal Genome Center (Montreal, Canada). Sequence traces were compared with the genomic sequence AB002342 from UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu>) using SeqMan 4.03 (DNASTAR).

Mutations carrier frequencies

To estimate the regional mutation carrier frequencies for the two mutations, we calculated based on the presence of five families with homozygotes for

mutation c.943C→T and one for the rarer mutation c.918-919insA living in Lanaudière. We relied on the 1996 Canadian Census for the population of the county of Joliette. We excluded the population of the administrative region of the Municipalité Régional de Comté des Moulins where no HSN2 patients are known to live, because it consists largely of an urban suburb of Montreal (population: 267141=370354-102008). For the small town east of Joliette from which five families originate (one homozygote for mutation c.918-919insA, two homozygotes for mutation c.943C→T, and two compound heterozygotes for mutations c.943C→T and c.918-919insA), the same Canadian 1996 Census gives a population of 2,987 inhabitants. We applied Hardy-Weinberg proportions to estimate carrier frequencies because no regional population samples are available. Combined HSN2 regional carrier frequencies for the two mutations were calculated by adding the individual frequencies for each mutation estimated by Hardy-Weinberg proportions.

6. Results

French-Canadian HSN2 cluster

Our cohort comprises 16 patients belonging to 13 families (Figure 3). The most striking feature of this cohort is that all families come from the southern part of the province of Quebec defined as southwest of an imaginary line along the Chaudière River that runs a few miles south of Quebec City (Figure 4A). No patients have been diagnosed in Quebec City or in the Saguenay-Lac-Saint-Jean region during the last 20 years (J. Mathieu and J.P. Bouchard, personal communications). Furthermore, 75% (12/16) of patients originate from the Lanaudière region (see Figure 4A). Joliette, the county town, is 75 km (47 miles) north of Montreal. The southeastern part of the county along the Saint Lawrence River was first settled by French pioneers during the second half of the 17th century (Tessier 1987). The majority of the population

is still French Canadian and lives in the agricultural southeastern part of the county.

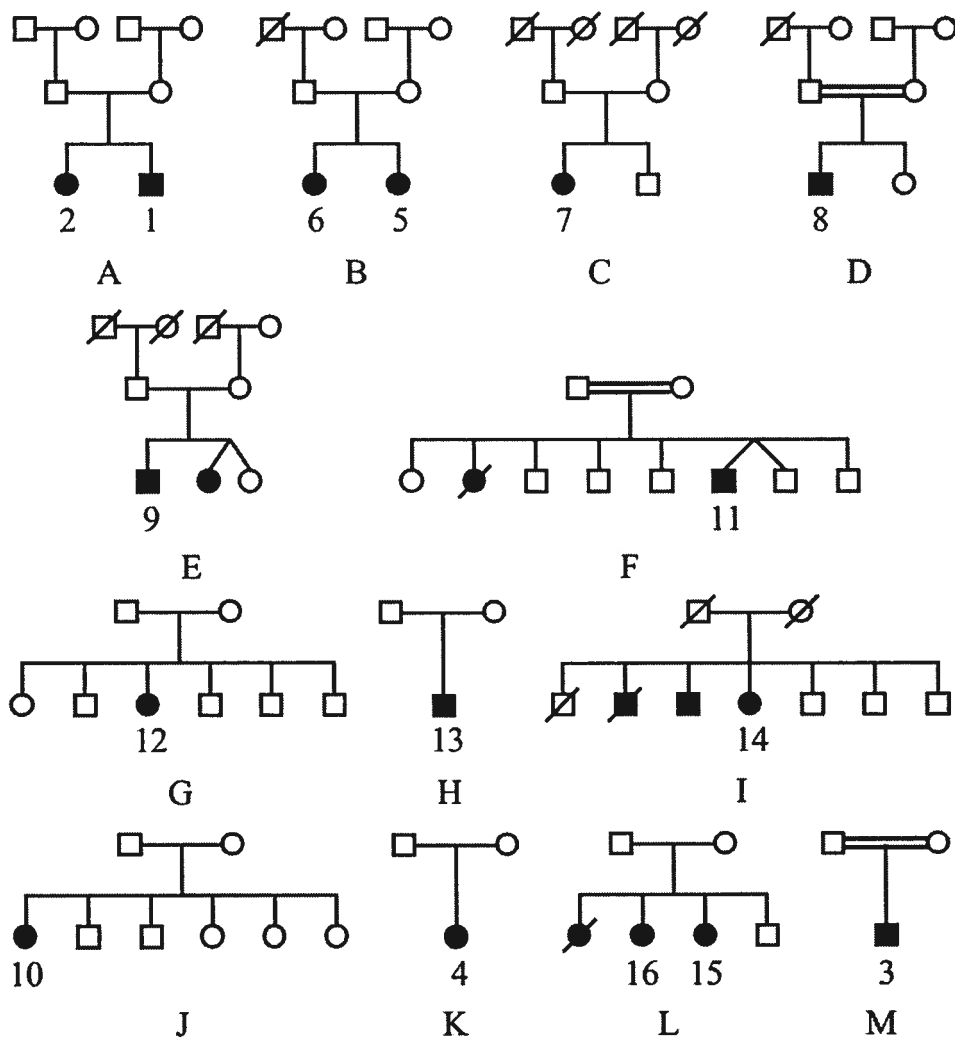


Figure 3 : Thirteen French Canadian hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2 (HSAN2) pedigrees. We identified and contacted 18 HSAN2 patients belonging to 13 families living in southern Quebec.

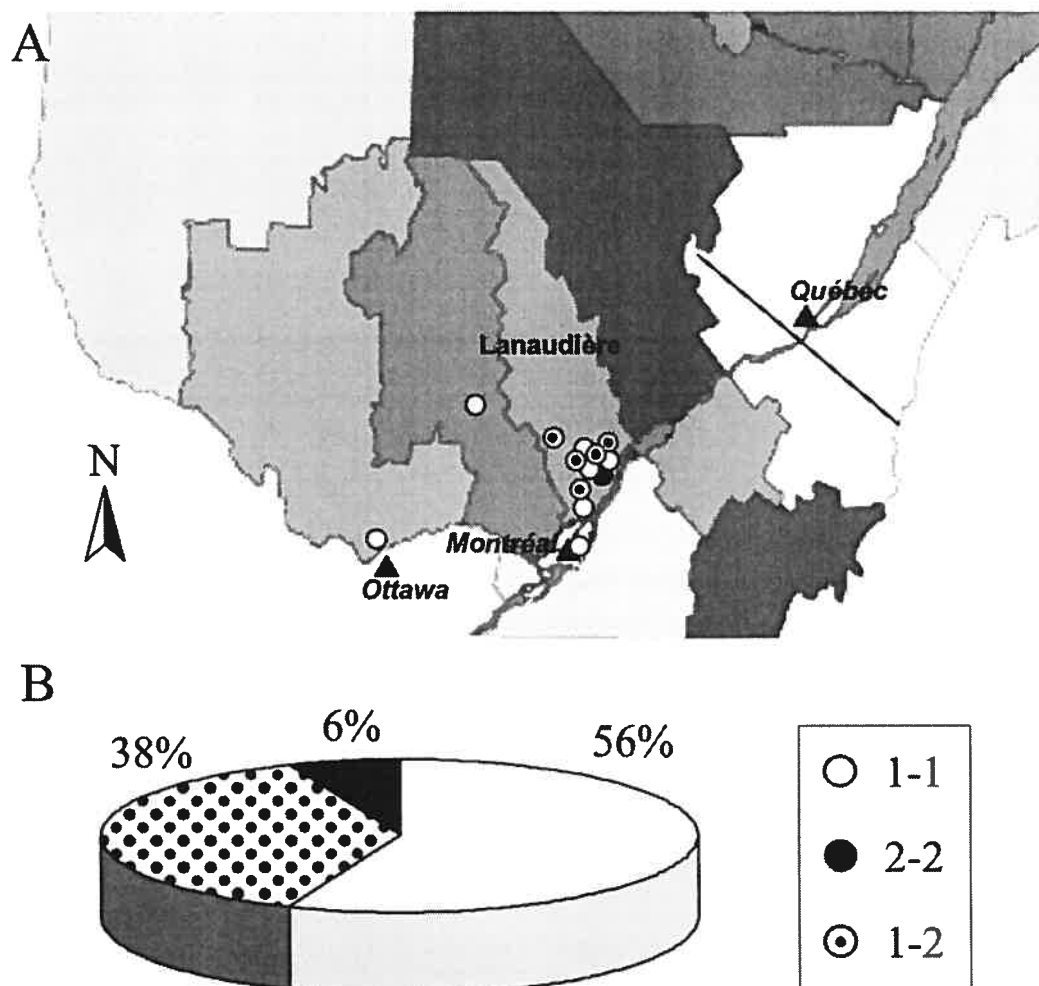


Figure 4 : Regional origin and mutation distribution for 13 French Canadian hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2 families. (A) Regional origins of patients. Circles represent the place of residence of the patients' parents and the genotype of the affected individuals. White circles stands for homozygotes for mutation c.943C→T, black circles for homozygotes for mutation c.918-919insA, and dotted circles for compound heterozygotes for both mutations. (B) Percentage of carriers of the two founder mutations. Symbols codes are identical to those in A.

Unfortunately, the regional origin of the family described in 1973 is unknown, and the family has been lost to follow-up (S. Verret and P.J. Dyck, personal communications). However, Family I, originally described by Heller and Robb in 1955, also originated from the Lanaudière region (Heller 1955). Of the 13 families, 6 have more than one affected member (see Figure 3). In Family F, one daughter died of septicemia at age 19. In two families, parents are first-degree cousins; in one they are uncle and niece. Three families are known to be distantly related by more than one ancestor (Families A, E and F, see Figure 3). Five of the families originate from a small village east of Joliette. Last, Patient 8 lives northwest of Lanaudière, but his parents are first-degree cousins and their shared grandparents came from Lanaudière. To our knowledge, no parents are affected. Men and women are equally affected. Pedigree analysis strongly supports an autosomal recessive mode of inheritance (see Figure 3).

Identification of two HSN2 mutations in the French-Canadian population

Linkage of the French Canadian families with HSN2 to the HSN1, 3 and 4 gene loci was excluded by performing linkage analyses to polymorphic makers previously reported to be in close proximity to the three mutated genes (data not shown). A first genome scan using the Weber 9 panel of markers and a pooling strategy failed to uncover the disease locus. A second genome scan using a homozygosity mapping strategy also failed to identify the locus. Through collaboration with Xenon Genetics (Vancouver, Canada) we confirmed that our families were linked to the same 12p13.33 locus as two large consanguineous Newfoundland families (Table IV) (Lafreniere 2004). Haplotype analysis determined that two distinct ancestral carrier chromosomes were present in our cohort. In retrospect, the presence of two mutations in our cohort and the absence of a close marker to the very

telomeric *HSN2* gene in the Weber 9 marker panel, the telomeric D12S372 being >8 cM from the gene, together were responsible for the failure of the two genome scans performed under the assumption that one founder mutation was likely responsible for HSN2 in most French Canadian patients.

The *HSN2* gene was sequenced in all 16 patients and two mutations were identified (Complementary information, see Figure 6). Mutations detected in each individual were consistent with the haplotype analysis (see Table IV). Mutation 1, c.943C→T, changes a CAG codon into a TAG stop codon and is predicted to truncate the protein to a 314 amino acid peptide. Mutations 2, c.918-919insA, consists of an insertion of an A at position 918, causing a frameshift that leads to a premature truncation to a 318 amino acid peptide (Complementary information, see Figures 6 and 7). Mutation 1 (c.943C→T) is the more frequent, being found on 75% (24/32) of mutation-carrying chromosomes. Fifty-six percent (9/16) of patients are c.943C→T homozygotes, 6% (1/16) are c.918-919insA homozygotes and 38% (6/16) of patients are compound heterozygotes (c.943C→T and c.918-919insA) (see Figure 4B). Interestingly, the two families that have no known Lanaudière origin are homozygotes for the common c.943C→T mutation, suggesting that HSN2 in patients outside the Lanaudière region will likely be caused by two copies of the common mutation. We also sequenced the DNA of a 13-year-old Canadian child of Lebanese origin clinically affected with HSN2 and identified that he was homozygote for a novel nonsense mutation: a 868C→T substitution at codon 290 of *HSN2*. This mutation is predicted to change a CGA coding for an arginine to a TGA stop codon that should lead to a 289-amino acid truncated protein (Complementary information, see Figures 6 and 7).

Table IV^d : Haplotypes of 26* French Canadian HSN2 carrier chromosomes in the *HSN2* 12p13.33 region. DNA was extracted through standard techniques for 16 HSN2 patients belonging to 13 families. Genotyping was done using standard techniques for 17 markers on chromosome 12p and haplotypes were deduced from family data and generated for 11 of the 17 markers analyzed. Haplotyped carrier chromosomes were studied for all affected patients, except for three individuals for whom no other familial samples were available (patients 3, 8 and the Lebanese patient). DNA sample for patient 16 was too limited to allow full genotyping. In the *HSN2* column, 1 stands for the c.943C→T mutation and 2 for the c.918-919insA mutation.

Markers	D12S352	D12S200	D12S1455	D12S91	HSN2	D12S389	D12S388	D12S1285	D12S1608	D12S1656	D12S1642	D12S100
Decode (cM)	0	-	-	1.03	-	1.69	-	-	3.65	4.12	-	4.76
UCSC July 2003 (Kbp)	532	652	711	817	847	984	1 099	1 404	1 629	1 677	1 904	2 047
Cases												
1	2	2	2	2	1	2	3	5	5	2	1	3
1	3	2	2	1	2	1	4	5	8	3	7	3
2	2	-	-	-	1	-	3	5	5	2	1	3
2	3	-	-	-	2	-	4	5	8	3	7	3
4	3	2	1	1	2	1	4	5	4	2	4	2
4	2	2	2	2	1	2	3	5	5	2	1	3
5	4	1	2	2	1	2	3	5	5	2	1	3
5	3	2	2	-	2	1	4	5	4	5	7	3
6	4	1	2	2	1	2	3	5	5	2	1	2
6	3	2	2	1	2	1	4	5	4	2	7	3
7	2	2	2	2	1	2	3	4	5	2	1	3
7	2	2	2	2	1	2	3	4	5	2	1	3
9	2	-	2	2	1	2	3	5	5	2	1	3
9	2	-	2	2	1	2	3	5	5	2	1	3
10	2	2	2	2	1	2	3	5	5	2	1	3
10	2	2	2	2	1	2	3	5	5	2	1	3
11	3	2	2	1	2	1	4	5	4	2	4	4
11	3	2	2	1	2	1	4	5	4	2	4	2
12	2	-	-	-	1	-	3	5	5	2	1	3
12	2	-	-	-	1	-	3	5	5	2	1	3
13	2	2	2	2	1	2	3	5	5	2	1	2
13	2	2	2	2	1	2	5	5	5	2	7	3
14	4	1	2	2	1	2	3	5	5	2	1	3
14	3	2	2	1	2	1	4	5	4	2	4	2
15	-	-	-	-	1	-	-	5	5	2	1	3
15	-	-	-	-	1	-	-	5	5	2	3	2

Bold: Flanking markers

* Haplotypes could not be not generated for cases 3, 8 and 16.

^d Figure supplémentaire à l'article original disponible à l'adresse:
<http://www.neurology.org>.

Estimation of the carrier frequencies in the Lanaudière region

We are confident to have identified all the living HSAN2 patients in the Lanaudière region. Based on the 267141 population of Lanaudière region, one can estimate the regional carrier frequencies to be in the order of 1:116 for mutation c.943C→T and 1:260 for mutation c.918-919insA based on Hardy-Weinberg proportions. In the 2,987 inhabitants village east of Joliette, where we observed the greatest concentration of patients, the carrier frequencies could be as high as 1:18 for the more common c.943C→T mutation and 1:28 for the rarer c.918-919insA mutation.

The phenotype of HSAN2 is relatively similar between carriers of different mutations

The clinical, electromyographic, and pathological characteristics of HSAN2 are well established (Ohta 1973; Dyck 1993). The 16 French Canadian patients present a relatively homogeneous HSAN2 phenotype, as summarized in Table V. The diagnosis of HSAN2 in these families was arrived at clinically because the mode of transmission is recessive as opposed to dominant in HSAN1 (Nicholson 1996), there was no major autonomic dysfunction as found in HSAN3 (Slaugenhaupt 2001), the intelligence of the patient was normal as opposed to that in HSAN4 (Indo 1996), and stretch reflexes are usually absent whereas they are present in HSAN5 (Dyck 1983; Einarsdottir 2004). All were diagnosed before age 14 (8 months to 13 years, mean 8 years old). Patient 1, at age 8 months, was the youngest to be diagnosed. His early neurological evaluation was prompted because his parents already had an older affected daughter. During his first evaluation, he demonstrated diminished sensitivity to pinprick and had no sensory nerve action potential. However, his deep tendon reflexes were present except at the ankles. At age 2, he has a history of many painless injuries including wounds that are slow to heal. The two larger genotype groups are the homozygote for mutations

c.943C→T (nine individuals) and compound heterozygotes for both mutations (six patients). There appears to be no striking differences in the age of diagnosis, first infection, and necrosis between these two groups (see Table V). Furthermore, if one compares the degree of amputations, though there is the expected increase with age, older patients of different genotypes appear as disabled (Figure 5).

Table V : Clinical phenotype of 16 French Canadian patients with HSN2.

No	Mutation genotype	Family	Sex	Age of diagnosis	Age when recruited	Age at first infection	Age at first necrosis	Reflexes	SNAP
1	1-2	A	M	8 mo	8 mo	-	-	Present except Achilles	-
2	1-2	A	F	4 y	4 y	-	-	-	-
3	1-1	M	M	9 y	9 y	-	-	-	-
4	1-2	K	F	6 y	12 y	6 (foot)	10	Absent except Achilles	-
5	1-2	B	F	10 y	19 y	10 (toes)	16	-	-
6	1-2	B	F	5 y	22 y	5 (tibia)	-	Absent except Achilles	-
7	1-1	C	F	8 y	25 y	7 (foot)	-	Absent except Achilles	-
8	1-1	D	M	8 y	28 y	6 (foot)	14	-	-
9	1-1	E	M	11 y	31 y	18 (foot)	20	-	-
10	1-1	J	F	9 y	33 y	5 (foot)	16	Absent except Achilles	-
11	2-2	F	M	11 y	35 y	12 (finger)	16	-	-
12	1-1	G	F	3 y	43 y	3 (foot)	7	Absent except Achilles	-
13	1-1	H	M	12 y	44 y	12 (finger)	10	Absent except Achilles	-
14	1-2	I	F	9 y	58 y	7 (toe)	11	-	-
15	1-1	L	F	10 y	71 y	10 (foot)	10	-	-
16	1-1	L	F	13 y	73 y	7 (hand)	13	-	-
Mean				8 y		8.4	13		

HSAN2= hereditary sensory autonomic neuropathy type 2; SNAP= sensory nerve action potential; mutations: 1=c.943C→T, 2=c.918-919insA; (-) = absent

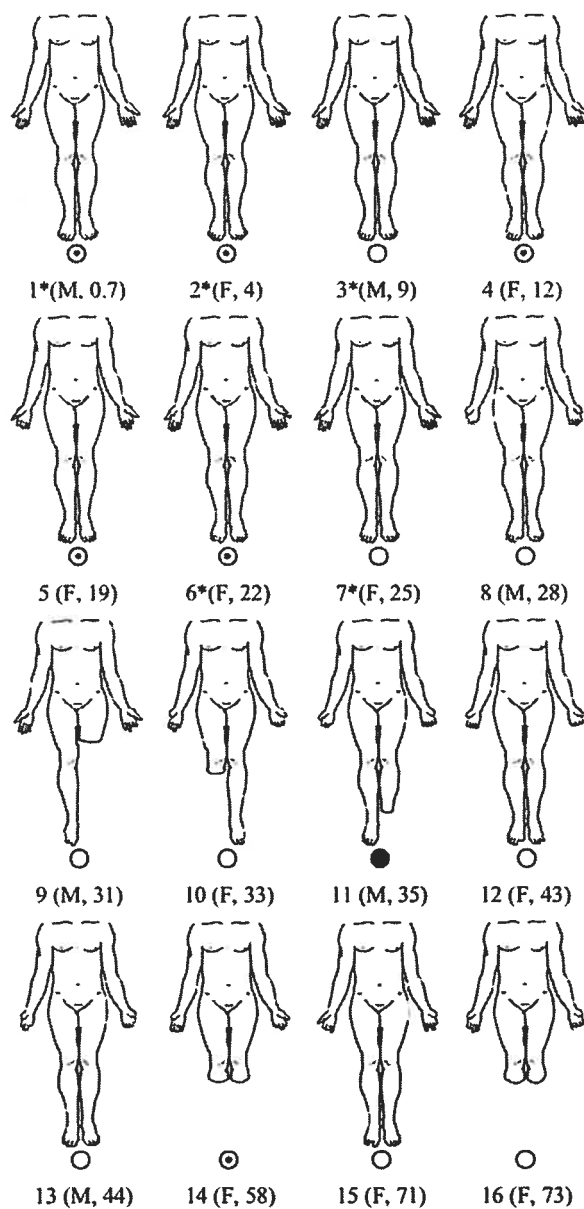


Figure 5 : Progression of amputations in 16 hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2 patients according to age. Genotype and individual legend: White circles represent homozygotes for mutation c.943C→T, black circles homozygotes for mutation c.918-919insA, and dotted circles compound heterozygotes for both mutations; patient number (gender, age at examination). * Patients 1, 2, 3, 6 and 7 have not been amputated.

7. Discussion

This study documents the existence of a large cluster of French Canadian families with HSAN2. We demonstrate that two ancestral chromosomes carrying two distinct *HSN2* mutations are responsible for HSAN2 in the French Canadian population. We also describe a novel homozygous nonsense mutation affecting an HSAN2 patient of Lebanese origin different from the one recently uncovered in another HSAN2-affected individual from Lebanon (Riviere 2004). The higher prevalence of two *HSN2* mutations in Quebec appears to be responsible for the fact that >50% of patients described in the literature prior to this study were of French Canadian background. This study suggests that the Lanaudière region of southern Quebec province may have a much higher prevalence of this disease than other region in the world. The higher prevalence of HSAN2 in this region is due to higher carrier frequencies for both French Canadians mutations but in particular for the apparently rarer c.918-919insA mutation. In fact, 58% (7/12) of patients in this region are compound heterozygotes. Furthermore, a higher carrier frequency for mutation c.918-919insA in the small village with affected individuals in five families (A, E, F, G and K) is probably responsible for this unfortunately higher local prevalence of the disease. The estimated combined frequencies for both mutations in the Joliette county based on the observed number of homozygotes for either mutations are in the order 1:80, whereas they are of 1:11 in the small village east of Joliette with the greater number of patients. The overall regional carrier frequencies are smaller than the ones for more studied Quebec recessive mutations found in the northeastern region of Saguenay-Lac-Saint-Jean, such as 1:22 for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix Saguenay (ARSACS, MIM 270550) (De Braekeleer 1993) and 1:23 for hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC, MIM 218000) (De Braekeleer 1993). However, in the small Lanaudière village the individual mutation frequencies are in the same

order of magnitude. Moreover, the estimated combined frequency is even higher, further increasing the risk for unrelated parents from the village to have affected children. The relative frequency of the most common mutation is also different between the more common southwestern founder mutation of HSN2 (75%) and diseases with northeaster Quebec founder effects such as ARSACS (94%) (Engert 2000) and HMSN/ACC (99%) (Howard 2002). A population base study is needed to establish more precisely the carrier frequencies in Quebec and in the Lanaudière region to determine if a regional base screening program for the *HSN2* mutations should be offered. However, the availability of mutation screening already allows accurate genetic counseling for future parents at risk of being carriers of these mutations.

The genotype-phenotype correlation for French Canadian HSN2 carriers of different mutations does not suggest that the two identified mutations influence the severity of the phenotype. Neither were there any significant clinical differences observed between the French Canadian patients and the individual of Lebanese origin homozygous for a different *HSN2* mutation. This is not entirely surprising considering the nature of the three mutations, all being predicted to lead to the formation of truncated proteins. Future comparisons with the phenotypes of carriers of other mutations may help establish if the mutations in French Canadian patients lead to partial or complete loss of function of the truncated mutated HSN2 proteins. *HSN2* is the fifth gene identified to date to cause a hereditary sensory and autonomic neuropathy. *HSN2* is a novel gene of unknown function. Highly conserved *HSN2* homologues are present in pig, mouse and rat (Lafreniere 2004). Functional bioinformatics analysis only identified a putative N-terminal domain signal peptide with a cleavage site that suggest that HSN2 is a secreted protein. Multitissue adult northern blot and reverse transcriptase-PCR analyses were not able to uncover significant expression in any tissue, suggesting that *HSN2* is probably expressed in a few tissues or at low levels

during development. However, the expression of *HSN2* has not yet been studied in fetal tissues. Serial examinations in our cohort demonstrate that the sensory deficit, as documented by sensory levels and loss of deep tendon reflexes, likely progresses with age. The examination of the 8-month-old Patient 1 with *HSAN2* demonstrates that sensation is likely abnormal from birth, suggesting that *HSN2* may play a role in the development of the peripheral sensory system.

Our present knowledge of the mutated genes in *HSANs* suggests that they are likely involved in different pathway in neuronal development or survival mechanisms. The *SPTLC1* gene (serine palmitotransferase long-chain base subunit 1) mutated in dominant *HSAN1* (Nicholson 1996) plays a role in sphingolipid biosynthesis by catalyzing the pyridoxal-5'-phosphate-dependent condensation of L-serine and palmitoyl-CoA to 3-oxosphinganine (Dawkins 2001). Four studies have suggested that the mutated *SPTLC1* through a dominant negative effect diminishes the function of the normal protein leading to a relative loss of function (Bejaoui 2001; Dawkins 2001; Bejaoui 2002; Dawkins 2002). The *IKBKAP* gene (IKB kinase complex-associated protein gene) is mutated in recessive *HSAN3* (Anderson 2001; Slaughaupt 2001). The *IKBKAP* protein is a scaffold protein important for the assembling of the *IKK* complex and a regulator for three kinases involved in pro-inflammatory cytokine signaling (Cohen 1998). In disease, *IKBKAP* is absent or dysfunctional. The *TRKA* (tyrosine kinase A) gene mutated in *HSAN4* was identified in 1996 using a candidate gene strategy (Indo 1996). The *TRKA* (tyrosine kinase A) gene (1q21-q22) (Greco 1999; Mardy 1999; Yotsumoto 1999; Miura 2000; Shatzky 2000; Bodzioch 2001; Indo 2001; Mardy 2001) is the human homologue of the neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 (*NTRPK1*) gene deleted in mice insensitive to pain with anhidrosis (Smeyne 1994; Mardy 1999). It is proposed that the nerve growth factor (NGF)-TRPK system plays a crucial role in the development and function of

the nociceptive sensory system and in the establishment of temperature regulation via sweating (Indo 2001). The *NGFB* (NGF- β) gene is mutated in HSAN5 (Einarsdottir 2004). NGF is a polypeptide involved in the regulation of growth and differentiation of certain sensory neurons. NGF is composed of three subunits, α , β , and γ which specifically interact to form a complex (Levi-Montalcini 1987). The five mutations described in *HSN2* gene are likely loss of function mutations, therefore suggesting that, as in the other HSAN, it is the loss of the protein or inactivation of its function that are responsible for the sensory neuropathies. Further study of the *HSN2* gene may provide important insights into the pathophysiology of these rare neuropathies and the development and preservation of the sensory and autonomic nervous systems.

8. Informations complémentaires

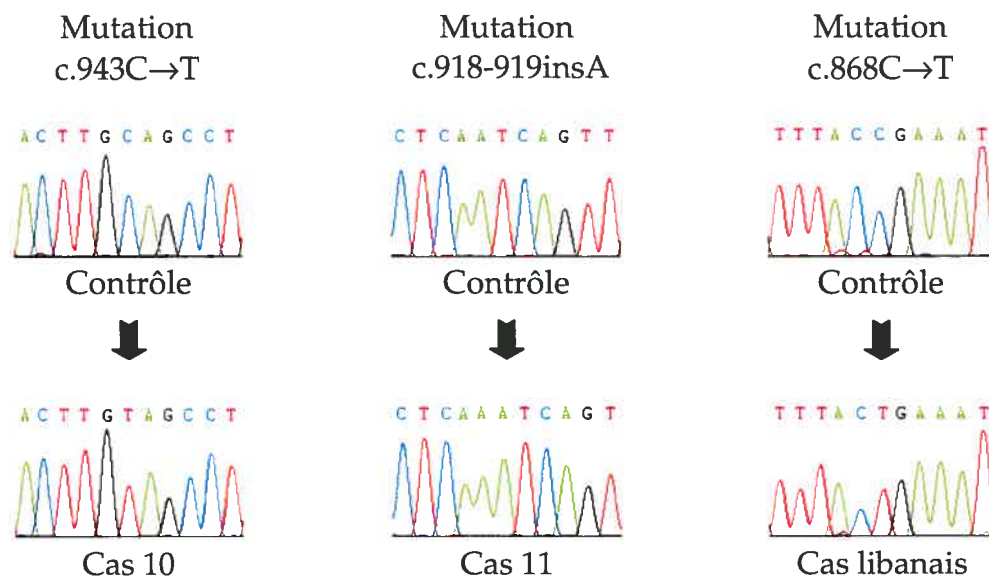


Figure 6 : Mutations canadiennes-françaises identifiées dans le gène *HSN2*. Le gène *HSN2* a été amplifié et séquencé pour les 16 patients de la cohorte ainsi que pour le patient d'origine libanaise. Les fragments ont été amplifiés par PCR selon le même protocole que pour le génotypage. Les amplicons obtenus ont été séquencés au Centre du Génome (Montréal). Les chromatogrammes ont été analysés à l'aide du logiciel SeqMan 4.03 (DNASTAR) et comparés à la séquence AB002342 déposée sur UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu>).

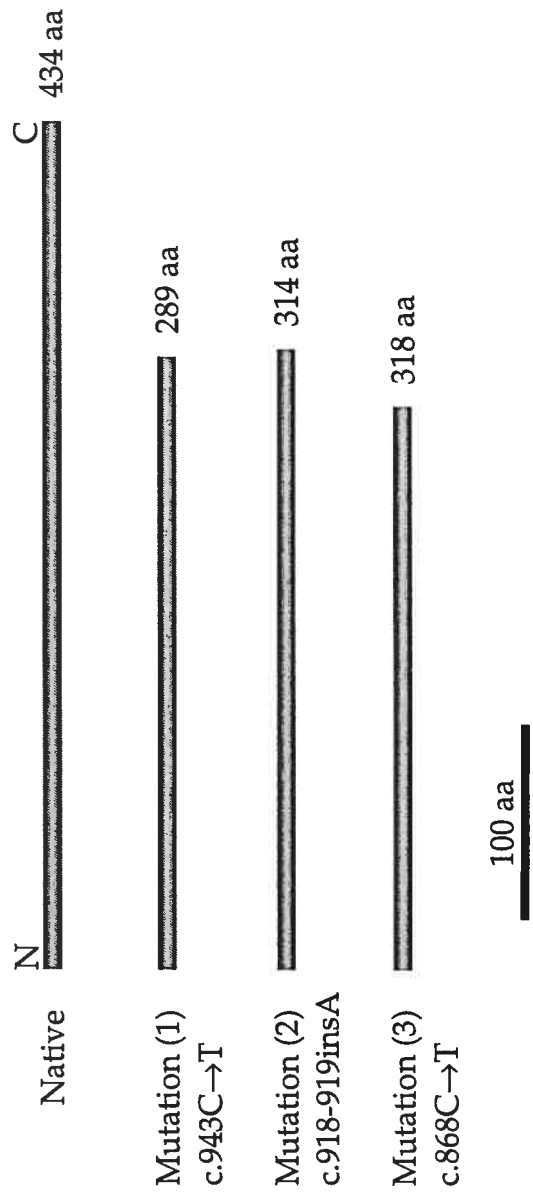


Figure 7 : Trois mutations non-sens conduisent à une troncation de la protéine.



CHAPITRE II

Étude génétique de l'AOA2

A. Introduction aux ataxies

1. Définition

L'ataxie, du grec ataxia « désordre », est une incoordination des mouvements volontaires causée par un problème touchant les centres nerveux (déficiência de la coordination musculaire). L'ataxie n'est pas une maladie en soi, mais un symptôme. Elle peut affecter les membres supérieurs, inférieurs, les mains, les pieds, le langage et les mouvements oculaires. Cette perte de coordination peut être due à de nombreuses affections neurologiques qui entraînent une détérioration progressive des cellules nerveuses dans la moelle épinière et le cervelet. Le cerveau et les nerfs périphériques peuvent être également atteints. Un examen médical et une évaluation neurologique sont donc nécessaires pour déterminer la nature d'un syndrome ataxique.

2. Classification

Les ataxies sont classées en deux grandes catégories : les ataxies sporadiques et les ataxies héréditaires. Les ataxies sporadiques sont des ataxies qui apparaissent chez des cas isolés dont aucun membre de la famille n'a souffert ou souffre de cette maladie. La plupart de ces ataxies se développent après les deux premières décennies de vie et il est estimé qu'environ 50% des ataxies sont de nature sporadique. Cette catégorie d'ataxie ne sera pas traitée dans ce mémoire. Les ataxies héréditaires sont quant à elles subdivisées en plusieurs groupes selon leur mode de transmission : autosomique récessif, autosomique dominant, lié au chromosome X ou mitochondrial. Nous ne traiterons ici que des ataxies à transmission autosomique récessive.

Les ataxies autosomiques récessives sont caractérisées par le fait que le gène responsable de la maladie est porté par un autosome et que l'allèle muté a un caractère récessif par rapport à l'allèle normal qui est dominant. Ainsi pour qu'un individu naisse atteint d'une ataxie autosomique récessive, il faut que ses deux parents soient porteurs d'au moins une copie de l'allèle muté. Des parents porteurs sains d'un allèle mutant ont 25% de risque d'avoir un enfant atteint d'ataxie. À ce jour, de nombreuses ataxies autosomiques récessives sont recensées (Table VI).

Table VI : Quelques ataxies récessives présentes au Québec.

Maladie	MIM	Caractéristiques cliniques	Locus	Gène	Nombre de mutations connues	Présence au Québec	Références
AF	229 300	Ataxie à la marche, dysarthrie, nystagmus, signes de Babinski, scoliose, pes cavus, troubles cardiaques	9q13	FRDA	>17	Oui	(Montermini 1995; Campuzano 1996; Delatycki 1999)
ARSACS	270 550	Ataxie à la marche, dysarthrie, spasticité, nystagmus, amyotrophie, troubles de la poursuite oculaire, striation rétinienne	13q12	SACS	>8	Oui	(Bouchard 1978; Richter 1999; Engert 2000)
AT	208 900	Ataxie, apraxie oculomotrice, dystonie, chorée, télangiectasie, taux d'alpha fétoprotéine élevé, susceptibilité au cancer	11q22.3	ATM	>71	Très rare	(Gatti 1988; Gatti 1993; Buzin 2003)
SCAN1	607 250	Ataxie cérébelleuse, dysarthrie, neuropathie sensitive, amyotrophie	14q31-q32	TDP1	1	Non	(Takashima 2002)
AOA1	208 920	Ataxie cérébelleuse, dysarthrie, chorée, apraxie oculaire, neuropathie sensitive, amyotrophie	9p13.3	APTX	14	Rare	(Aicardi 1988; Date 2001; Moreira 2001)
AOA2	606 002	Ataxie cérébelleuse, dysarthrie, apraxie oculaire, poursuite oculaire saccadée, neuropathie sensitive, taux d'alpha fétoprotéine élevé	9q34	SETX	20	Oui	(Bouchard 1980; Nemeth 2000; Chen 2004; Moreira 2004; Duquette 2005)

AF: Ataxie de Friedreich; ARSACS: Ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay; AT: Ataxie télangiectasique; SCAN1: Ataxie spinocérébelleuse avec neuropathie axonale de type 1; AOA1: Ataxie avec apraxie oculaire de type 1; AOA2: Ataxie avec apraxie oculaire de type 2

B. Exclusion de gènes candidats dans la région 9q34

1. Introduction

L'ataxie avec apraxie oculaire de type 2 (AOA2) est la troisième forme d'ataxie récessive pour laquelle des mutations québécoises ont été décrites. Une description clinique de la maladie est détaillée dans l'article scientifique qui suit.

En 2002, Antoine Duquette a réalisé une étude de liaison qui a permis de lier les dix familles de la cohorte canadienne-française présentant une ataxie récessive avec polyneuropathie et élévation du taux d'alpha-foetoprotéine au locus 9q34 de l'AOA2 proposé par Nemeth *et al.* en 2000 (Nemeth 2000). Une analyse des haplotypes lui a permis de définir un intervalle candidat de 1,64 Mb (moins de 7,23 cM) délimité par les marqueurs D9S179 et D9S66 (Figure 8). Il a calculé des LOD scores en utilisant le logiciel MLINK de la suite FASTLINK v3.0P et a obtenu une valeur maximale de 9,86 pour le marqueur D9S2157 à $\theta=0$ (Figure 8). Cela lui a permis de montrer que la cohorte est bien liée au locus 9q34 de l'AOA2.

L'intervalle défini comprenait plusieurs gènes connus. Antoine Duquette a, par séquençage des exons et des jonctions intron/exon et par l'absence de mutations, exclu le gène *RALGDS* comme responsable de l'AOA2 chez les Canadiens français. Pour ma part, j'ai, par la même approche, exclu les gènes *CEL*, *GTF3C5* et *GFI1B*.

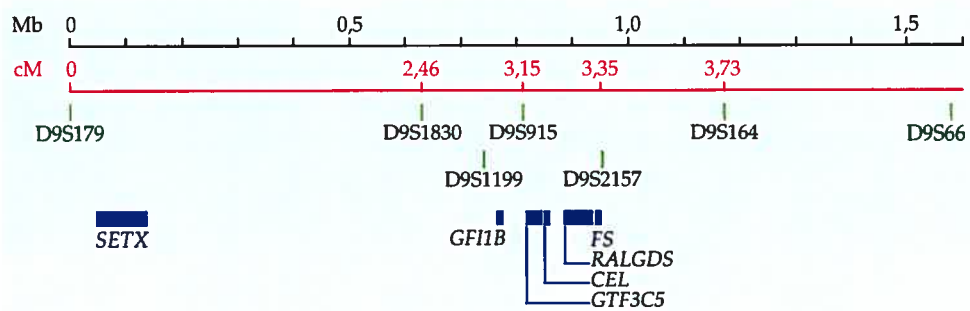


Figure 8 : Représentation de la carte physique de la région entre les marqueurs D9S179 et D9S66.

2. Matériel et méthodes

La recherche de mutations a été effectuée par amplification et séquençage des exons et des jonctions intron/exon. L'amplification génique a été faite par PCR. La séquence des amorces a été établie à l'aide du logiciel PrimerSelect v4.03 (DNASTAR) et elles ont été synthétisées par Invitrogen (Montréal, Canada). Le mélange réactionnel des PCR était composé de 0,2 mM de dNTP, 1X de BSA, 1X de tampon Taq contenant 15 mM de $MgCl_2$, 0,9 U de Taq polymérase, 1,15 μM de chaque amorce et 15,4 ng d'ADN génomique dans un volume final de 13 μL . L'amplification a été effectuée dans une machine GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) selon le protocole suivant : dénaturation de 5 min à 95°C suivie de 35 cycles de dénaturation de 30 sec à 95°C, hybridation de 30 sec à 55°C et élongation de 30 sec à 72°C et une élongation finale de 5 min à 72°C. Les amplicons obtenus ont été séquencés au Centre du Génome (Montréal, Canada). Les chromatogrammes ont été analysés à l'aide du logiciel SeqMan 4.03 (DNASTAR) et comparés à la séquence génomique déposée sur UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu>).

3. Résultats et conclusion

Nous avons séquencé les exons et les jonctions intron/exon des gènes *CEL*, *GTF3C5* et *GFI1B* pour cinq individus atteints (deux homozygotes pour la mutation commune et un hétérozygote pour chacune des trois autres mutations) et un individu contrôle. Aucune mutation n'a été identifiée dans les régions analysées (données non présentées).

Nous avons donc exclu en grande partie les gènes *CEL*, *GTF3C5* et *GFI1B* comme responsables de l'AOA2 chez les Canadiens français.

C. La publication du locus et du gène pour l'AOA2

En 2004, Moreira *et al.* (Moreira 2004) ont lié 9 familles au chromosome 9q34 par étude de liaison et ont pu restreindre la région candidate à un intervalle de 1.1 Mb contenant 13 gènes. Après n'avoir pu identifier de mutations dans ces 13 gènes, ils ont séquencé un ORF de 8031 nucléotides contenant 24 exons. Ils ont pu identifier 15 mutations différentes (pour 15 familles) dans cet ORF qu'ils ont nommé *senataxin* (*SETX*). Dix de ces 15 mutations causent une troncation de la protéine.

Suite à cette publication, nous avons entrepris de séquencer le gène *SETX* dans le but d'identifier les mutations responsables de l'AOA2 chez les Canadiens français. Ces travaux ont mené à la publication de l'article qui suit.

D. Article scientifique

Mutations in *Senataxin* Responsible for Quebec Cluster of Ataxia with Neuropathy^{e,f}

Antoine Duquette, MD,¹ Katel Roddier, BSc,¹ Julia Mc Nabb-Baltar,¹ Isabelle Gosselin,¹ Anik St-Denis, MSc,¹ Marie-Josée Dicaire, BSc,¹ Lina Loisel,¹ Damian Labuda, PhD,² Luc Marchand, MD, FRCPC,³ Jean Mathieu, MD, FRCPC,⁴ Jean-Pierre Bouchard, MD, FRCPC,⁵ and Bernard Brais, MD, MPhil, PhD^{1,3,4}

Annals of Neurology 2005 march, 57 : 408-414

¹ Laboratoire de neurogénétique, Centre de recherche du CHUM, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

² Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, Département de Pédiatrie, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

³ Clinique d'ataxie du CHUM, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

⁴ Clinique des maladies neuromusculaires, Carrefour de la Santé de Jonquière, Saguenay, Quebec, Canada

⁵ Service de Neurologie de l'Hôpital de l'Enfant-Jésus, Université Laval, Quebec, Quebec, Canada

^e L'article est présenté sous sa forme originale en annexe 2.

^f L'article qui suit est présenté sous une forme intégrale dans laquelle des informations complémentaires ajoutées à la suite de la discussion sont référencées. Il est à noter que les références à ces informations n'apparaissent pas dans la forme originale de l'article présentée en annexe 2.

Corresponding author:

Dr.Brais MD MPhil PhD, Laboratoire de neurogénétique, M4211-L3, Hôpital
Notre-Dame-CHUM, 1560 Sherbrooke est, Montréal, Québec, H2L 4M1,
Canada

Tel: 1-514-890-8000 (ext. 25560), Fax: 1-514-412-7525



1. Contribution des coauteurs

Antoine Duquette[§] (étudiant en maîtrise) : Revue de dossiers, identification et description clinique des cas, recrutement des familles, identification des maladies candidates, génotypage, haplotypage, études de liaison, définition de l'intervalle candidat, prédiction du nombre de mutations distinctes, rédaction du manuscrit.

Katel Roddier : Participation au génotypage et haplotypage, identification et caractérisation des mutations par séquençage du gène *SETX*, études de prévalence des mutations par D.A.S.O., contribution à la rédaction du manuscrit.

Julia Mc Nabb-Baltar (stagiaire) : Identification des dossiers des cas susceptibles d'être atteints de l'AOA2, participation technique au génotypage.

Isabelle Gosselin (stagiaire) : Participation technique au génotypage.

Anik St-Denis (assistante de recherche) : Participation technique au génotypage.

Marie-Josée Dicaire (assistante de recherche) : Participation technique au génotypage.

[§] Les aspects de l'article auxquels seul Mr Antoine Duquette a participé sont traités dans son mémoire de maîtrise en sciences neurologiques (Université de Montréal) et n'apparaissent pas dans notre discussion. Les travaux des deux candidats qui ont mené à la rédaction de cet article sont substantiels et suffisamment distincts pour mériter que l'article soit reproduit dans les deux mémoires.

Lina Loisel (infirmière de recherche) : Infirmière responsable du recrutement des familles et des prélèvements sanguins.

Damian Labuda (directeur de recherche) : Supervision de l'étude D.A.S.O de prévalence des mutations.

Luc Marchand (clinicien) : Évaluation clinique de certains cas.

Jean Mathieu (clinicien) : Évaluation clinique de certains cas.

Jean-Pierre Bouchard (clinicien) : Description originale, évaluation clinique de certains cas.

Bernard Brais (directeur de recherche) : Identification des cas, recrutement des familles, évaluation clinique, supervision lors des études de liaison et la recherche de mutations, correction du manuscrit.

2. Acknowledgments

This study was supported by the Association Canadienne des Ataxies Familiales and the Neuromuscular Research Partnership Program of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR 116842), Muscular Dystrophy Canada (MDC), the Canadian Amyotrophic Lateral Sclerosis Association and the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ, Salary Support Scholarship, B.B.).

We thank all the patients and their families for their essential participation in this study. We also thank our colleagues Serge Melançon, Massimo Pandolfo, and Andrea Richter for providing samples. We acknowledge the technical support of the Genome Quebec Innovation Centre in the sequencing.

3. Abstract

Senataxin recently was identified as the mutated gene in ataxia-oculomotor apraxia 2, which is characterized by ataxia, oculomotor apraxia and increased α -fetoprotein levels. In this study, we evaluated 24 ataxic patients from 10 French-Canadian families. All cases have a homogeneous phenotype consisting of a progressive ataxia appearing between 2 and 20 (mean age, 14.8) years of age with associated dysarthria, saccadic ocular pursuit, distal amyotrophy, sensory and motor neuropathy and increased α -fetoprotein levels but absence of oculomotor apraxia. Linkage disequilibrium was observed with markers in the ataxia-oculomotor apraxia 2 locus on chromosome 9q34. We have identified four mutations in *senataxin* in the French-Canadian population including two novel missense mutations: the 5927T→G mutation changes the leucine encoded by codon 1976 to an arginine in the helicase domain (L1976R), and the 193G→A mutation changes a glutamic acid encoded by codon 65 into a lysine in the N-terminal domain of the protein (E65K). The common L1976R mutation is shared by 17 of the 20 (85%) carrier chromosomes. The study of this large French-Canadian cohort better defines the phenotype of this ataxia and presents two novel mutations in *senataxin* including the more common founder mutation in the French-Canadian population.

4. Introduction

Ataxias are a heterogeneous group of diseases with considerable clinical overlap among the different forms (Harding 1983). The uncovering of population clusters of cases has accelerated the clinical characterization and positional cloning of genes for many ataxias (Brais 1998; Engert 2000; Howard 2002). In 1980, Jean-Pierre Bouchard (Bouchard 1980) described a new form of recessive ataxia (Charcot-Marie-Tooth disease, progressive ataxia and tremor, MIM 214 380). He documented the existence of a large French-Canadian family living in New-Brunswick in which 7 of the 20 children were affected by an ataxia with a distal amyotrophy (Bouchard 1980). This ataxia shares some features with ataxia-oculomotor apraxia syndrome (AOA1; 9p13.3, MIM 208 920) (Aicardi 1988; Barbot 2001; Shimazaki 2002) the spinocerebellar ataxia, autosomal recessive, with axonal neuropathy type I (SCAN1; 14q31-q32, MIM 607 250) (Takashima 2002); and the ataxia-oculomotor apraxia 2 (AOA2; 9q34, MIM 606 002) (Watanabe 1998; Bomont 2000; Nemeth 2000). Mutations responsible for AOA2 have recently been identified in the *senataxin* (*SETX*) gene that contains a domain found in superfamily 1 of helicases and is the human ortholog of yeast *Sen1p* gene (Moreira 2004). In this study, we describe 10 French-Canadian families segregating in a recessive mode the same ataxia as described by Bouchard (Bouchard 1980). We demonstrate that they are linked to the AOA2 locus on chromosome 9q34, and we describe four mutations in the *SETX* gene including two novel missense mutations. This is the largest regional cluster ever described of this recessive ataxia. This new French-Canadian founder effect allows a better description of the clinical phenotype and of the evolution of this recessive ataxia.

5. Subjects and methods

Clinical evaluation

This project was approved by the Centre de recherche du CHUM's institutional Ethics Committee. Patients were recruited through specialized ataxia clinics and treating neurologists. Informed consent was obtained from patients and all living family members. Detailed medical histories were obtained, and complete neurological examinations were performed on all living participants by experienced neurologists (B.B., J.-P.B., J.M. and L.M.). Electromyography (EMG) and nerve conduction studies results were collected from charts. Brain magnetic resonance images were available for 12 patients. Measurements of serum α -fetoprotein (AFP) levels were performed using standard methods on all 19 living patients in 10 different hospital diagnostic laboratories. The absolute increase of AFP levels was calculated by dividing the observed value by the different laboratories' greatest normal value.

Mutation analysis

DNA was isolated from blood samples using standard techniques (Sambrook 1989). Genomic DNA sequencing of the 26 exons and intron-exon junctions was performed to identify pathogenic mutations in the *SETX* gene. Polymerase chain reaction (PCR) primers were designed using PrimerSelect 4.03 (DNASTAR) and synthesized by Invitrogen (Montreal, Canada). The L1976R mutation was amplified using the primers 5'CTT TGG TGT CCT TGT CTT GTC TGA3' and 5'CTC CCT CTG CCA CCC TTT TCT3'. The R1363X mutation was amplified with the primers 5'CAG CGG TCT TTG GAT TAT GTA G3' and 5'GTT TTG CTT TTA TGG TTT CTG GTT3'. The frameshift after the Ins1690T mutation was amplified using the primers 5'CTT CAG

CAC TTT CAC CGT CTC TAA3' and 5'TCT CAT TTT CAC TCA GCA AGG TAA3'. The E65K mutation was amplified with the primers 5'GGC TTT CTA GGT CGT CAC ATT CAG3' and 5'CAC TTC GGC CTA GGA GAC ACA GC3'. PCR was performed in 13µL of a mixture containing 0.2 mM of deoxyribonucleoside triphosphate, 1X of bovine serum albumin, Taq buffer at 1X final containing 15mM of MgCl₂, 0.9 U of Taq polymerase, 1.15 µM of each primer and 15 ng of DNA. The amplification procedure performed with a GeneAmp PCR System 9700 consisted of a hot-start of 5 min at 94°C followed by 35 cycles of denaturing at 94°C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec, elongation at 72°C for 30 sec and a final elongation at 72°C for 5 min. PCR products were sequenced at the Montreal Genome Center. Sequence traces were compared to the genomic sequences Kiaa0625 and AK022902 from UCSC Genome Bioinformatics (information available online at: <http://genome.ucsc.edu>) using SeqMan 4.03 (DNASTAR).

Mutation prevalence analysis

L1976R and E65K mutation prevalence studies were done by typing 154 samples from the Gaspésie region, which included 82 French Canadian and 72 Anglo Norman control samples. Dynamic allele-specific oligonucleotide hybridization^h was performed using the method that by Bourgeois and Labuda (Bourgeois 2004) described. The oligonucleotides, 5'TGT TGG CCT CCT CTA TC3' (T_m=51.44°C) and 5'TGT TGG CCG CCT CTA TC3' (T_m=58.22°C) served as probes/competitor to type the 5927T→G polymorphism of the L1976R mutation, and 5'GGG AAT TAG AAA CCT TA3' (T_m=44.43°C) and 5'GGG AAT TAA AAA CCT TA3' (T_m=44.81°C) served as probes/competitor to type the 193G→A polymorphism of the E65K mutation. Control samples suspected of carrying mutations were sequenced.

^h Un complément d'information sur la méthode a été ajouté à la suite de cet article.

6. Results

Cluster of 10 families with a homogeneous ataxia-oculomotor apraxia 2 phenotype without oculomotor apraxia

This study describes the clinical features of 24 French-Canadian cases of ataxia accompanied by distal amyotrophy belonging to 10 families, including the 7 cases that Bouchard (Bouchard 1980) in 1980 (Figure 9). The 19 living cases were reexamined (mean age at examination, 41.4 years; age range, 22-55 years). They present a clinically homogeneous phenotype and similar evolution. All cases share the following characteristics: a progressive gait ataxia, cerebellar dysarthria, saccadic ocular pursuit, and progressive distal amyotrophy (Table VII). Only patient 19 retains deep tendon reflexes at the age of 22 years. Vibration sense is always impaired, whereas position sense is affected in 74% and touch in 57% of patients. Gaze nystagmus is present in 91% of patients and strabismus in 30%. None of the patients was found to have oculomotor apraxia as defined by the inability to generate volitional horizontal saccades with preserved reflex eye movements (Koeppen 2002). None has cardiomyopathy or telangiectasia. Scoliosis is present in five patients (22%). Tremor, which was part of Bouchard's original presentation, is an inconsistent feature present in 57% of cases, and it was not observed in the recent examination of the youngest member of the original family at age 43 years (Table VII).

Seven families originate from northeastern Quebec and one family originates from bordering New Brunswick (Figure 10). Interestingly, Families 4, 6 and 9 are found in a cluster of three isolated coastal villages at the tip of the Gaspésie peninsula. This geographical distribution further suggested that many, if not most, patients share a single historical mutation.

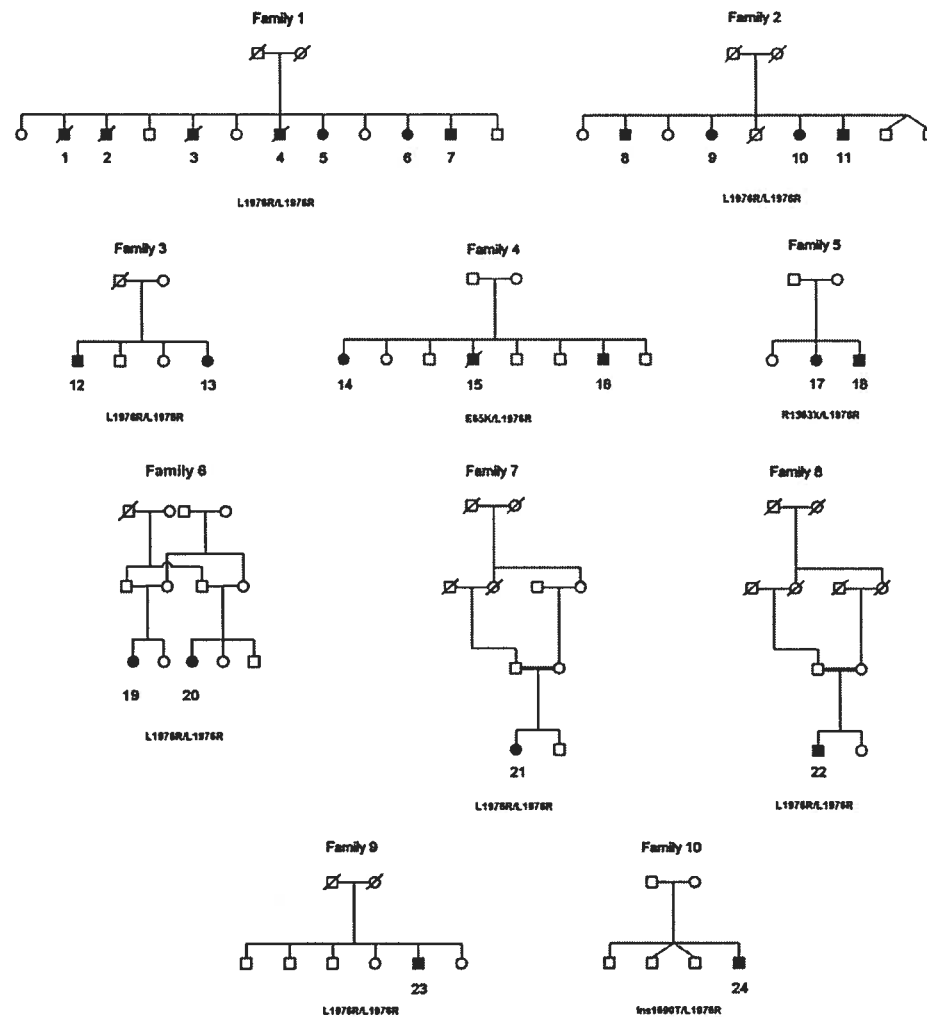


Figure 9 : Pedigrees of ten French-Canadian AOA2 families without oculomotor apraxia. Patients from families 4 (E65K/L1976R), 5 (R1363X/L1976R), and 10 (Ins1690T/L1976R) are heterozygous. Patients from other families are homozygous for the L1976R mutation.

Table VII : Clinical features in 24 French-Canadian patients with a similar ataxic phenotype.

Individual	Family																							
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gender	M	M	M	M	F	F	M	M	F	M	M	M	F	F	M	M	F	M	F	F	F	F	F	M
Age of death	67	50	56	49																				
Age at study					55	51	43	51	49	48	42	53	44	42	33	42	41	22	22	38	36	49	25	
Age at onset					16	11	15	15	16	12	14	17	15	18	15	16	20	17	2	17	15	16	14	15
Gait ataxia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Limb ataxia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tremor	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cerebellar dysarthria	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gaze nystagmus	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccadic smooth pursuit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Strabismus	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Oculomotor apraxia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Distal muscle weakness	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Distal amyotrophy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Deep tendon reflexes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Impaired vibration sense	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Impaired position sense	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Impaired touch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Telangiectasia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spasticity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Scoliosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cardiomegaly	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRI	CA				CA						CA	CA	CA		CA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	CA	PCA	PCA
Elevated AFP					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Elevated CK																								
Elevated total cholesterol																								
Abnormal vitamin E																								

AFP = Alpha-fetoprotein; CK = Creatine kinase; CA = Cerebellar atrophy; PCA = Pontocerebellar atrophy

Laboratory findings

The workup of all 19 patients showed an increase of serum AFP (5.1 times normal, 1.4 -18.2; Table VII). Measured creatine kinase (n=4), vitamin E (n=4) and albumin levels (n=8) were normal. Total serum cholesterol levels were measured in 10 patients and were found to be only mildly elevated in 4 patients (1.07-1.44 times upper limit of normal). Patient 19, who retained deep tendon reflexes, was the only patient to show no denervation on EMG at the age of 20 years. In the other 12 tested patients, denervation was severe in the lower limbs. Motor nerve conduction velocities were normal or slightly slowed and amplitudes were mildly diminished. No sensory action potentials were detected in all patients. Sural nerve biopsies in Patients 21 (at 22 years old) and 22 (at 20 years old) showed chronic axonal neuropathy with preferential loss of large myelinated fibers. Magnetic resonance imaging was performed on 12 patients and showed isolated cerebellar atrophy in 7 cases and more extensive pontocerebellar atrophy in 5. Lymphoblastoid cells of Patient 24 did not show increased radiosensitivity as observed in ataxia-telangiectasia (Gatti 2001).

Clinical evolution

The size of this cohort and the multiple chronological evaluations allow disease evolution to be better appraised. Intervals of more than 4 years between examinations were available for 16 patients. The earliest neurological evaluation was completed at age 7 years for Patient 19. It was requested because the child was believed to have an unsteady gait compared to her classmates and a possibly slightly slurred speech. Results of the neurological evaluation were considered entirely normal, and all deep-tendon reflexes were present. No EMG was performed at the time. This patient was later able to play high school volleyball, suggesting that the gait

clumsiness was indeed slight. Patients and parents report gait unsteadiness as the initial symptom at an average age of onset of 14.8 (age range, 2-20) years. AFP was not measured in this or any other patient before 21 years of age. Patients may have normal deep tendon reflexes until their 20s but eventually lose them progressively starting in the lower limbs. Distal amyotrophy usually becomes obvious only in the late 20s. The loss of vibration sense is progressive and probably accompanies the first symptoms. The evolution of the gait ataxia forced most patients to use a wheelchair for long distances by their mid-20s. However, many are still able to walk short distances with support even in their 40s. Intelligence appears to be normal and does not decline with age. Five deaths occurred among the 24 patients. One death was accidental. One patient died of lymphoma; another of intestinal cancer. Two causes of death were unspecified. Therefore, life expectancy is probably within the reference range. Denervation on EMG was documented to antedate atrophy in patients 7, 8 and 22. No serial magnetic resonance images were available for review.

Linkage and mutation analysis

During a preliminary screening of candidate loci, haplotype sharing was established among the 10 families for several markers mapped to the AOA2 locus on chromosome 9q34, and linkage analysis for these markers was performed. A maximum cumulative logarithm of odds score of 9.86 was established with marker D9S2157 at $\theta=0$ (data not shown). A detailed five-markers haplotype analysis predicted that four mutations should be found in our cohort (Complementary information, Table VIII). Once *SETX* was identified as the mutated gene in AOA2, we screened its 26 exons and introns-exons junctions for mutations by direct sequencing (Moreira 2004). On 17 of the 20 carrier chromosomes, we identified a novel 5927T→G (L1976R) mutation (Complementary information, Figures 11 and 12). Most

patients were homozygous for this mutation, but patients from Families 4 (Patients 14 and 16), 5 (Patients 17 and 18) and 10 (Patient 24) were heterozygous as predicted by haplotypes (Complementary information, Table VIII and Figure 11). On one carrier chromosome for Patients 17 and 18, we found a previously described heterozygous 4087C→T (R1363X) nonsense mutation predicted to truncate the protein to 1362 aa (Complementary information, Figures 11 and 12) (Moreira 2004). For patient 24, we found a previously described heterozygous 5070insT mutation causing a frameshift in codon 1690 and the truncation of the protein to 1698 aa (Ins1690T) (Complementary information, Figures 11 and 12) (Moreira 2004). Finally, we identified a novel heterozygous 193G→A (E65K) mutation for Patients 14 and 16 of Family 4 (Complementary information, Figures 11 and 12). The screening of control samples from Gaspésie uncovered a total of five carriers (three of Anglo-Norman and two of French-Canadian backgrounds) of the L1976R common French-Canadian mutation and no carriers of the rarer E65K mutation (Complementary information, Figure 13).

According to these results, we estimate the carrier rate for the L1976R mutation to be 3.5% (1:28) for Quebecois of Anglo-Norman origin and 2.1% (1:47) in the French-Canadian population of Gaspésie. No homozygote carrier of the mutations L1976R and E65K was uncovered, further supporting the argument that they are indeed causal mutations.

7. Discussion

This study describes a large cluster of AOA2 French-Canadian families linked to chromosome 9q34. The fairly homogeneous AOA2 phenotype is characterized in all patients by the onset in the early teenage years of a progressive gait ataxia, dysarthria, saccadic ocular pursuit, and impaired vibration sense. The progression by the mid-20s leads to the appearance of distal amyotrophy and complete loss of deep tendon reflexes. Life expectancy

is probably in the reference range, with patients living to their 60s without cardiomyopathy. Increased serum AFP is a good biological marker for the disease but is not specific because levels are also increased in ataxia-telangiectasia and some isolated cases with phenotypes similar to AOA2 that may represent variants of the disease (de Graaf 1995). As shown in the previous large international study by Le Ber and colleagues, (Le Ber 2004) oculomotor apraxia is not a universal finding in this ataxia. In that multiethnic cohort, oculomotor apraxia was observed in only 56% of patients. In French-Canadian patients, none had clear oculomotor apraxia, but ocular pursuit was saccadic in all patients.

Before the identification of the mutated gene, two studies had described the variable phenotype of recessive ataxia cases linked to 9q34. Five Pakistani brothers who experienced development of ataxia in late childhood or late teens were described to have a severe gait ataxia with mild ataxia of the limbs and trunk, absent lower limb deep tendon reflexes, abnormal ocular pursuit, and nerve conduction studies that showed absent sensory potentials (Nemeth 2000). They also had severe oculomotor apraxia, saccade palsy, and no nystagmus. Amyotrophy, AFP levels, and EMG findings were not described. Two Japanese families also linked to chromosome 9q33-34 were described with an overlapping phenotype (Bomont 2000). The four siblings from the first family were characterized by a truncal ataxia appearing around 20 years of age, decreased vibration and position sense and muscle weakness in the lower limbs. Ocular findings included gaze nystagmus and saccadic eye movements; however, as in the French-Canadian patients, no oculomotor apraxia was observed. They also had increased AFP levels and absent sensory action potential in the lower limbs with decreased motor conduction velocity. Interestingly, they had telangiectasia over the bulbar conjunctiva and increased creatine kinase and γ -globulin levels (Watanabe 1998). The patient

from the second Japanese family shared most of the clinical characteristics but did not have increased AFP, creatine kinase, or γ -globulin levels. In a recent study, 18 more ataxia patients from 6 families in France, the West Indies, Turkey, Morocco, and Portugal were linked to the 9q34 locus (Le Ber 2004). The mean age at onset was 15.1 years. Whereas all patients had increased AFP levels, 92% showed sensory motor neuropathy, and 56% had oculomotor apraxia. One of those patients was detailed further clinically with two others from a second family of Caucasian origin (Izatt 2004). The French-Canadian patients we studied appear to have a slightly more severe phenotype. In our study, the distal amyotrophy was a more striking feature, and patients used a wheelchair at an earlier age.

The patients evaluated in this study can be differentiated from other autosomal recessive ataxias based on the clinical presentation and its association with increased AFP levels. The slower progression and the absence of cardiomyopathy and, in most cases, of scoliosis help distinguish it from Friedreich's ataxia. Any clinical doubt involving autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay can be resolved clinically by the absence of spasticity and hypermyelinated fibers on retinal examination. AOA1 can be excluded because of its earlier age at onset (mean age, 4.7 years; age range 1-15 years) and the universal occurrence of oculomotor apraxia (Barbot 2001). Early-onset cerebellar ataxia with hypoalbuminemia can be easily differentiated also by its hypoalbuminemia (Date 2001). SCAN1 can be excluded because it is not associated with increased AFP levels (Takashima 2002). Except for isolated ataxia cases, ataxia-telangiectasia is the only other ataxia where increased AFP have been clearly described (Takashima 2002). However, it can be differentiated because AOA2 has a later age of onset and does not show telangiectasia in the majority of cases or any immunological deficit. Furthermore, there is no evidence that AOA2 patients have an

increased susceptibility to cancer, although in our study two cases died of cancer in their 50s.

The greater prevalence of AOA2 in northeastern Quebec and the sharing by 85% of carrier chromosomes of the same founder mutation defines this ataxia as a new disease with a French-Canadian founder effect. Because the phenotype observed in our population is homogeneous, we have not been able to identify a phenotype-genotype correlation despite having four different mutations. This might be because the L1976R mutation present in at least one copy in all cases might be the major determinant of severity. The L1976R common mutation lies in the helicase domain of *senataxin*. It has been demonstrated that loss of function associated with amino acid substitutions in the helicase domain of yeast ortholog *Sen1p* causes altered processing of different RNAs (Winey 1988; Ursic 1997; Rasmussen 1998; Ursic 1995). Also of interest is the novel E65K mutation in the N-terminal domain, which suggests that it may be situated in a functional region. Because French-Canadian patients appear to have a normal overall development and the disease phenotype appears in adolescence, we hypothesize that *SETX* may play a role in maintaining cerebellar, anterior horn, and dorsal root neuron survival. This possibility is further suggested by the finding that amyotrophic lateral sclerosis 4 (MIM 602 433) is allelic to AOA2 (Megarbane 1999; Saar 1999; Delague 2002). Amyotrophic lateral sclerosis 4 (Megarbane 1999; Delague 2002) was linked to chromosome 9q34 (Chance 1998) and the candidate region was further refined to a 3 cM interval on chromosome 9q34 that included *SETX*. It has an autosomal dominant transmission and is characterized by a juvenile age of onset (mean age, 23 years; age range, 1-63 years with asymptomatic carriers), a slow progression, distal limb amyotrophy, and pyramidal signs associated with severe loss of motor neurons in the brainstem and spinal cord (Rabin 1999). Three mutations

responsible for this disease have been identified in *SETX* (Chen 2004). They are L389S, R2136H and T3I substitutions with only the second being in the helicase domain.

The description of this new French-Canadian founder effect for AOA2 helps define its phenotype particularly by underlining that oculomotor apraxia is not a universal finding in this ataxia. This raises the concern that AOA2 may not be the best nosographic label for this condition. We would favor a name such as SCAN2 to distinguish it from SCAN1. Stressing the association between the ataxia and the neuropathy will help clinicians in their workup of these patients to distinguish them from the more common Friedreich's ataxia. In French Canada, the identification of four causal mutations will greatly improve diagnosis and genetic counseling. The high carrier rate of the common mutation in the Gaspésie region will require the design of better information programs for families and the local communities.

8. Informations complémentaires

Nous avons ici ajouté une table et des figures supplémentaires dont la publication n'a pas été jugée nécessaire. Cependant, nous voulions partager toute l'information dont nous disposons avec le lecteur.

Table VIII : Haplotypes pour 10 marqueurs du locus de l'AOA2 sur le chromosome 9q34.

Marqueurs		D9S1863	D9S179	D9S1830	D9S1199	D9S915	D9S2157	D9S164	D9S66	D9S1818	D9S1826
deCODE		140,35	143,19	145,65		146,34	146,54	146,92		150,42	157,73
UCSC Mai 2004 (Mb)		130,03	132,12	132,75	132,86	132,93	133,07	133,29	133,70	134,31	135,67
Patient	Mutation										
2	1	3	2	4	2	7	4	5	9	2	4
	1	3	6	4	2	7	4	5	9	2	3
3	1	6	2	4	2	7	4	5	9	2	4
	1	3	6	4	2	7	4	5	9	2	3
4	1	3	2	4	2	7	4	5	9	2	4
	1	3	6	4	2	7	4	5	9	2	3
5	1		2	4	2	7	4	5	9		
	1		6	4	2	7	4	5	9		
6	1	3	2	4	2	7	4	5	9	2	4
	1	3	6	4	2	7	4	5	9	2	3
7	1	3	2	4	2	7	4	5	9	2	3
	1	3	6	4	2	7	4	5	9	2	3
8	1	4	6	4	2	7	4	-	9	2	3
	1	4	6	4	2	7	4	-	9	2	3
9	1	4	6	4	2	7	4	5	9	2	3
	1	4	6	4	2	7	4	5	9	2	3
10	1	4	6	4	2	7	4	5	9	2	3
	1	4	6	4	2	7	4	5	9	2	3
11	1	4	6	4	2	7	4	5	9		3
	1	4	6	4	2	7	4	5	9		3
12	1	3	6	4	2	7	4	5	9	2	3
	1	4	6	4	2	7	4	5	3	5	3
13	1	3	6	4	2	7	4	5	9	2	3
	1	4	6	4	2	7	4	5	3	5	2
14	1	3	6	4	2	7	4	5	3	2	2
	4	4	6	5	5	7	7	7	9	3	3
16	1	3	6	4	2	7	4	5	3	2	3
	4	4	6	5	5	7	7	7	9	3	3
17	2	5	2	3	1	7	3	8	8	4	1
	1	3	2	4	2	7	4	5	9	2	3
18	2	5	2	3	1	7	3	8	8	4	1
	1	3	2	4	2	7	4	5	9	2	3
19	1	4	2	4	2	7	4	5	-	2	3
	1	3	6	4	2	7	4	5	-	2	3
20	1	4	2	4	2	7	4	5	-	2	3
	1	3	6	4	2	7	4	5	-	2	3
21	1	4	6	4	2	7	4	5	9	2	3
	1	4	6	4	2	7	4	5	9	2	3
22	1	3	6	4	2	7	4	5	1	5	1
	1	3	6	4	2	7	4	5	4	5	3
23	1	3	6	4	2	7	4	5	9	2	3
	1	4	2	4	2	7	4	5	9	2	3
24	1	3	6	4	2	7	4	4	9	2	3
	3	4	3	4	2	7	3	5	3	3	3

Gras: Marqueurs flanqueurs

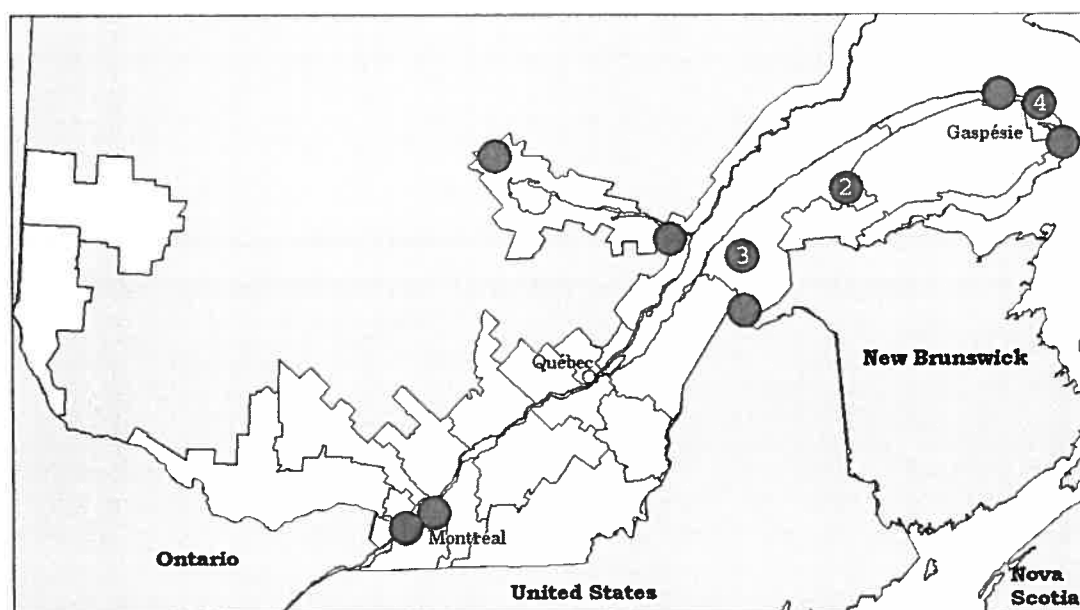


Figure 10 : Villes de mariage des parents pour les 10 familles canadiennes-françaises. Les chiffres correspondant aux numéros des mutations identifient les familles hétérozygotes. Le chiffre 2 indique que la famille est porteuse de la mutation c.4087C→T, 3 indique la famille porteuse de la mutation c.5070insT et 4 indique la famille porteuse de la mutation c.193G→A. Les points non numérotés représentent les familles homozygotes pour la mutation fondatrice commune c.5927T→G.

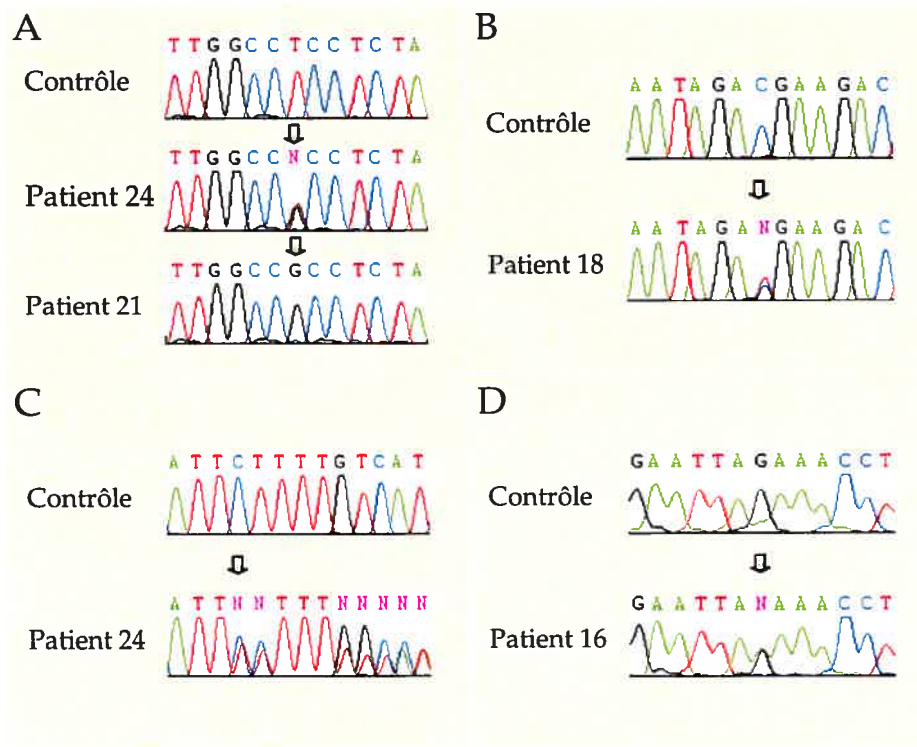


Figure 11 : Quatre mutations ont été identifiées dans le gène *SETX* chez des individus canadiens-français atteints d'AOA2. Pour identifier les mutations dans le gène *SETX*, des amorces oligonucléotidiques ont été définies à l'aide du programme Primer3 (<http://www-genome.wi.mit.edu>, Whitehead Institute for Biomedical Research) et synthétisées par Invitrogen (Montréal). Les amplicons obtenus ont été séquencés au Centre du Génome (Montréal). Les chromatogrammes ont été analysés à l'aide du logiciel SeqMan 4.03 (DNASTAR) et comparés aux séquences Kiaa0625 et AK022902 déposées sur UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu>). (A) Patients 24 (hétérozygote) et 21 (homozygote) porteurs de la mutation 1 (c.5927T→G) changeant le codon 1976 (CTC) encodant une leucine pour un codon CGC codant pour une arginine. (B) Patient 18 hétérozygote porteur de la mutation non-sens 2 (c.4087C→T) changeant le codon 1363 (CGA) codant pour une arginine en un codon Stop (TGA) et entraînant une troncation de la protéine à 1362 aa. (C) Patient 24 hétérozygote pour la mutation 3 (c.5070insT) causant un changement de cadre de lecture après le codon 1690 et une troncation de la protéine à 1698 aa. (D) Patient 16 hétérozygote porteur de la mutation 4 (c.193G→A) changeant le codon 65 (GAA) encodant un acide glutamique pour un codon AAA codant pour une lysine.

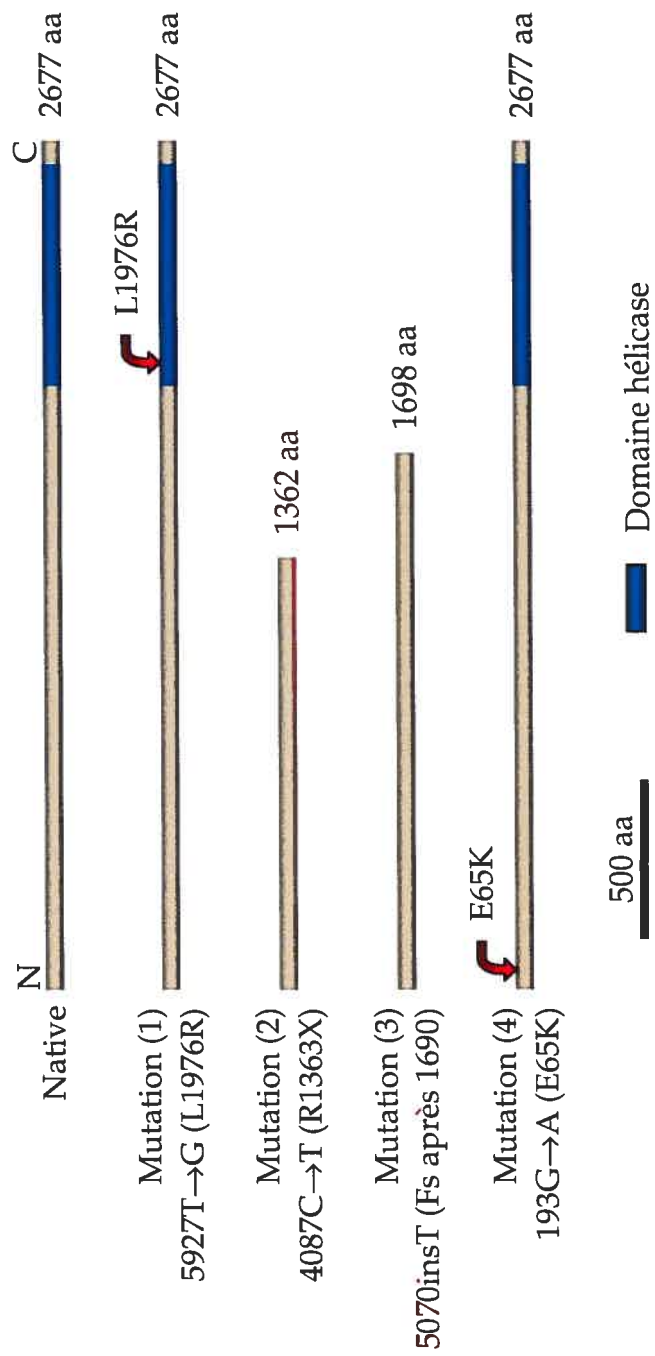


Figure 12 : Quatre mutations conduisent à des modifications majeures de la protéine.

L'estimation du taux de porteurs des mutations L1976R et E65K a été réalisée à l'aide de la méthode D.A.S.O. selon le protocole décrit par Bourgeois et Labuda (Bourgeois 2004). Les oligonucléotides utilisés et leurs caractéristiques sont énoncés dans l'article ci-dessus.

Dynamic Allele Specific Oligonucleotide (D.A.S.O) hybridization

Cette technique dérivée de l'hybridation A.S.O. (Allele specific oligonucleotide) permet de détecter une mutation ponctuelle sur un fragment d'ADN simple brin amplifié par PCR et fixé sur un support solide. La détection est faite par hybridation dynamique d'une courte sonde oligonucléotidique marquée dont la séquence est spécifique à l'allèle testé. L'hybridation est dite dynamique car un gradient de température est utilisé plutôt qu'une température statique (Bourgeois 2004).

Pour la mutation L1976R, 399 individus demeurant en Gaspésie ont été testés ainsi que quatre individus contrôles dont le génotype était connu (puits C1, C2, C3 et C4 de la plaque 5, C1, C3 et C4 sont hétérozygotes pour la mutation L1976R tandis que C2 est homozygote sauvage). Trois contrôles négatifs sans ADN ont été distribués dans les puits C5 sur la plaque 2, B5 sur la plaque 3 et F12 sur la plaque 4. L'amplification a échoué pour les puits A7, A10, A11 et A12 de la plaque 5. Cinq des 399 ADN testés se sont révélés porteurs de la mutation L1976R (puits C9, D2 et H3 de la plaque 2 et puits D4 et E10 de la plaque 3) dont trois individus d'origine anglo-normande et deux d'origine canadienne-française. Parmi les 399 personnes testées, 72 étaient d'origine anglo-normande et 82 d'origine canadienne-française (soit un total de 154 pris en considération pour cette étude).

Pour la mutation E65K, parmi les 399 individus testés, aucun n'est porteur de cette mutation (résultats non présentés).

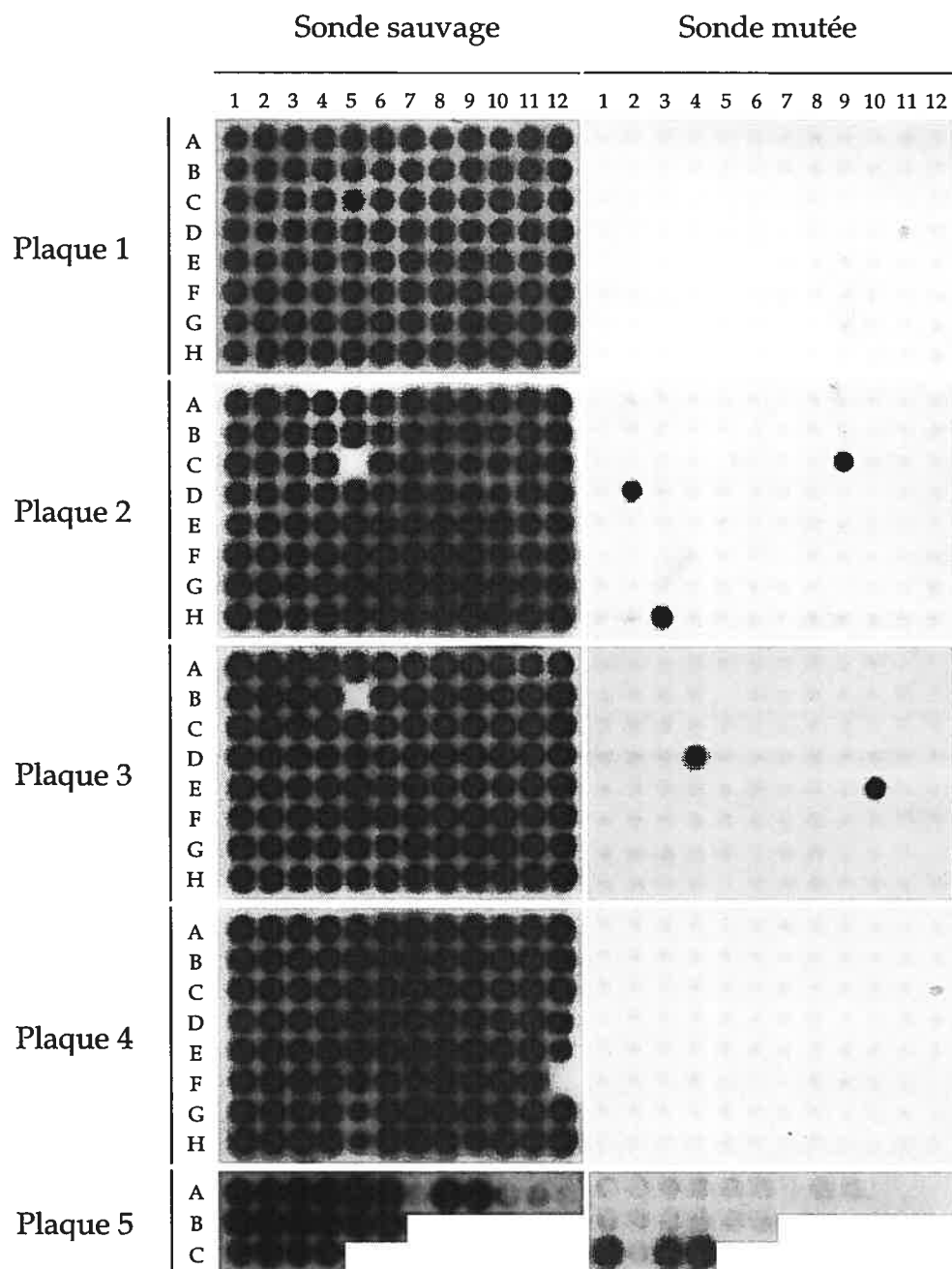


Figure 13: Autoradiographies des hybridations réalisées pour tester la mutation L1976R.

Suite à la publication des loci et des gènes associés à la NHSA2 et à l'AOA2, nous nous sommes aperçus que les gènes candidats que nous avons séquencés étaient assez éloignés des gènes responsables. Les régions candidates que nous avons définies à partir de nos données comprenaient bien les gènes *SETX* et *HSN2* mais n'étaient pas assez précises pour une recherche optimale. Nous avons donc entrepris une révision des données de nos haplotypes et procédé à de nouvelles analyses de liaison génétique afin de comprendre les raisons qui nous avaient induits en erreur. De plus, nous avons effectué ces nouvelles analyses de liaison à l'aide d'un programme de calcul multipoints auquel nous n'avions jusque là pas eu accès.

Dans le chapitre qui suit sont exposés les résultats et les conclusions de ces études rétrospectives ainsi qu'une étude comparative entre les programmes de calculs deux-points et multipoints.



CHAPITRE III

Une leçon à tirer du deux-points

A. Introduction

Lorsque l'on souhaite identifier le gène responsable d'une maladie que l'on a caractérisée comme étant mendélienne et dont on a déterminé le mode de transmission, plusieurs approches sont possibles. Parmi celles-ci on retrouve l'étude de liaison.

L'étude de liaison permet d'identifier statistiquement des régions candidates pour une maladie lors d'un criblage du génome. Chez l'humain, cette étude nécessite le typage de marqueurs. Les marqueurs microsatellites offrent l'avantage d'être facilement amplifiables par PCR. Cependant, ils doivent être suffisamment polymorphiques pour qu'un individu pris au hasard ait de fortes chances d'être hétérozygote. Cette étude permet de suivre la transmission de marqueurs d'une génération à l'autre au sein des familles d'individus atteints par la maladie. Aussi, l'étude de liaison ne peut être faite que sur des observations concernant des individus apparentés.

L'analyse de liaison génétique permet l'analyse des données collectées lors de l'étude de liaison. Elle teste la co-ségrégation entre un ou plusieurs marqueurs et le locus de la maladie. L'analyse de liaison repose sur le fait que les recombinaisons homologues survenant lors des méioses entre deux loci génétiques se produisent à une fréquence proportionnelle à la distance les séparant. En d'autres termes, des loci qui sont physiquement proches ont tendance à ségréguer ensemble plutôt que séparément. Cette notion d'indépendance se traduit également par un taux de recombinaison θ . En cas d'indépendance, on attend autant de gamètes recombinés que de gamètes parentaux et on a $\theta=0,5$. Dans le cas contraire, les gamètes parentaux se

transmettent préférentiellement aux gamètes recombinés et on a $0 \leq \theta < 0,5$, où θ est directement lié à la distance séparant les loci. Dans ce dernier cas, on dit que les loci sont génétiquement liés. Le but de l'analyse de liaison est de déterminer si deux loci tendent à co-ségréguer plus souvent qu'ils ne le devraient s'ils n'étaient pas physiquement proches sur le même chromosome (Terwilliger 1994).

Plusieurs méthodes d'analyse permettent d'évaluer l'hypothèse d'une liaison génétique entre des marqueurs génétiques et le gène de la maladie étudiée.

Ces méthodes se divisent en trois groupes :

- les méthodes paramétriques
- les méthodes paramétriques indépendantes du modèle génétique
- les méthodes non paramétriques

Dans le cas d'études de maladies monogéniques, ce sont les méthodes paramétriques qui prédominent. Parmi celles-ci, la méthode des LOD scores décrite par Morton en 1955 (Morton 1955) est la plus utilisée. Le LOD score est le logarithme décimal du rapport de la vraisemblance de la liaison entre deux loci pour une distance génétique donnée et de la vraisemblance de la non liaison. Si on note $L(\theta_1)$ la vraisemblance d'un taux de recombinaison $0 \leq \theta_1 < 0,5$ sous l'hypothèse H_1 d'une liaison génétique entre les loci et $L(0,5)$ la vraisemblance d'un taux de recombinaison $\theta=0,5$ sous l'hypothèse H_0 d'une indépendance génétique, le LOD score (Z) en θ_1 est :

$$Z(\theta_1) = \log [L(\theta_1)/L(0,5)]$$

La procédure du test dans la méthode des LOD scores est de type séquentiel (Wald 1977). C'est-à-dire que le LOD score est calculé pour chaque famille de l'échantillon et que le LOD score de l'échantillon est la somme des LOD scores de chaque famille. On accumule de l'information, c'est-à-dire qu'on

augmente le nombre de familles de l'échantillon jusqu'au moment où il sera possible de trancher entre les hypothèses H1 et H0.

Les seuils de décision sont habituellement fixés à -2 et $+3$ (pour des loci autosomiques), c'est-à-dire que si :

$Z(\theta_1) \geq 3$ on rejette H0 et on conclut à la liaison génétique des loci

$Z(\theta_1) \leq -2$ on accepte H0 et on conclut à l'indépendance génétique des loci

$-2 < Z(\theta_1) < 3$ on ne peut pas trancher entre H0 et H1. Il faut alors accumuler plus d'information.

Un LOD score de 3 signifie que la probabilité que la liaison génétique existe est 999 fois plus grande que la probabilité d'une indépendance génétique.

Pour les différents θ testés, la valeur du LOD score obtenu la plus haute marque la localisation la plus probable du marqueur par rapport au locus.

Très rapidement, il est apparu que les calculs n'étaient pas réalisables sans l'aide de la capacité de calcul des ordinateurs. Le premier programme d'analyse de liaison appelé LIPED a été introduit en 1974. Ce programme utilise l'algorithme d'Elston-Stewart et génère des LOD scores selon la méthode deux-points paramétrique. Par la suite, plusieurs autres programmes ont fait leur apparition dont LINKAGE, FASTLINK et VITESSE. Ces programmes utilisent aussi l'algorithme d'Elston-Stewart (Gudbjartsson 2000).

L'analyse de liaison effectuée entre un marqueur et le locus de la maladie est appelée méthode deux-points. C'est sur cette méthode que le programme MLINK des suites LINKAGE et FASTLINK est basé, il utilise l'algorithme d'Elston-Stewart. Cet algorithme peut effectuer l'analyse de grandes familles, mais il est limité par le nombre de loci. Pour que l'analyse de liaison soit pertinente, il faut que chaque famille soit informative. C'est-à-dire que le nombre d'enfants soit supérieur à 1 (sinon le LOD score est indépendant de

θ), et que par ailleurs, au moins l'un des parents soit double hétérozygote pour le marqueur et le locus.

L'analyse de liaison peut être plus efficace si les données pour plus de deux loci sont analysées et comparées simultanément, ce qui est fait par la méthode appelée multipoints. En effet, lorsque l'on utilise la méthode deux-points et que le LOD score est positif, on ne peut pas déterminer si le locus de la maladie est à gauche ou à droite du marqueur. La méthode multipoints, qui est une extension de la méthode deux-points permet de localiser le locus de la maladie à l'intérieur d'un intervalle génomique ponctué par plusieurs marqueurs. L'algorithme des programmes multipoints calcule les LOD scores de chaque famille pour un grand nombre de positions au travers de l'intervalle génomique. Ce type d'analyse permet d'établir entre quels marqueurs se trouve le locus de la maladie et ainsi de délimiter un intervalle candidat. Les programmes LINKAGE, FASTLINK et VITESSE peuvent aussi calculer des LOD scores selon la méthode multipoints, mais ils sont très rapidement limités par le nombre de marqueurs. Le programme GENEHUNTER introduit en 1996 utilise l'algorithme de Lander-Green et peut exécuter des analyses multipoints avec un nombre illimité de loci, mais il se trouve limité par la taille des pedigrees.

Hormis l'augmentation de l'efficacité de l'analyse, la méthode multipoints offre un autre avantage. Elle permet de passer outre les problèmes liés au manque d'information des marqueurs. En effet, il se peut qu'une famille soit informative pour un marqueur, et que d'autres ne soit pas informatives pour ce marqueur, mais le soient pour un autre marqueur proche du premier. Seule la méthode multipoints permet de tirer toute l'information de ces familles.

Nous avons ici voulu comparer la fiabilité des résultats obtenus avec les deux méthodes de calcul en utilisant pour chaque analyse la même série de données. Nous avons effectué cette comparaison avec les informations recueillies pour les deux maladies que nous avons étudiées : l'AOA2 et la NHSA2.

B. Matériel et méthodes

1. Méthode deux-points

Les analyses par la méthode deux-points ont été faites avec le programme MLINK de la suite LINKAGE version 5.2 pour DOS. (Lathrop 1984)

Pour l'analyse des données obtenues par Antoine Duquette en 2002, le nombre d'allèles et leur fréquence pour chaque marqueur ont été évaluées selon les données de génotypage et étaient les suivantes :

Marqueurs	D9S1830	D9S1199	D9S915	D9S2157	D9S164
Nombre d'allèles	7	5	8	11	10
Fréquences	0,185	0,001	0,054	0,018	0,020
	0,112	0,308	0,018	0,105	0,020
	0,185	0,499	0,018	0,140	0,080
	0,331	0,154	0,161	0,158	0,219
	0,185	0,038	0,001	0,018	0,180
	0,001		0,071	0,070	0,200
	0,001		0,641	0,262	0,100
			0,036	0,123	0,160
				0,018	0,020
				0,070	0,001
				0,018	

Pour les autres analyses par la méthode deux-points, le nombre d'allèles a été fixé à 10 et leurs fréquences à 0,1 pour tous les marqueurs.

2. Méthode multipoints

Les analyses par la méthode multipoints ont été effectuées à l'aide du programme MAXPROB de la suite GENEHUNTER v2.1_r5 beta (Whitehead Institute for Biomedical Research). Le nombre d'allèles a été fixé à 10 et leur fréquence à 0,1 pour tous les marqueurs. La distance entre les marqueurs a été définie selon les positions en cM de la carte DeCode. Lorsque la distance séparant deux marqueurs était inconnue, elle a été évaluée en fonction des positions des marqueurs les plus proches. Les distances utilisées ont été les suivantes :

Marqueur	Position en cM	Distance entre les marqueurs en cM	Marqueur	Position en cM	Distance entre les marqueurs en cM
D9S179	0	2,46	D12S352	0	0,43
D9S1830	2,46	0,44	D12S200	0,43	0,22
D9S1199	2,90	0,25	D12S1455	0,65	0,38
D9S915	3,15	0,20	D12S91	1,03	0,66
D9S2157	3,35	0,38	D12S389	1,69	0,35
D9S164	3,73	2,10	D12S388	2,04	0,93
D9S164	5,83		D12S1285	2,97	0,68
			D12S1608	3,65	0,47
			D12S1656	4,12	0,39
			D12S1642	4,51	0,25
			D12S100	4,76	

Pour toutes les analyses, tous les individus dont le sexe et le phénotype étaient connus ont été intégrés. Les boucles de consanguinité ont également été représentées le cas échéant. Afin de déterminer le LOD score le plus élevé que nous pouvions obtenir avec nos cohortes, nous avons aussi procédé à une analyse de liaison sur des données d'haplotypes fictives illustrant une ségrégation allélique parfaite en fonction du phénotype de chaque membre des familles. Les pedigrees et les haplotypes des familles ont été générés par le programme MAXPROB (Voir annexes 3 et 4).

C. Résultatsⁱ

1. Analyse de la première série de données pour l'AOA2

En 2002, Antoine Duquette a analysé les données de génotypage de 10 familles canadiennes-françaises pour cinq marqueurs (D9S1830, D9S1199, D9S915, D9S2157 et D9S164) à l'aide du logiciel MLINK de la suite FASTLINK v3.0P, une version modifiée de LINKAGE (Table IX et Figure 14). Les LOD scores étaient supérieurs à 3 pour l'intervalle testé. Il a obtenu un LOD score maximum de 9,86 pour le marqueur D9S2157. Des résultats identiques ont été obtenus en analysant ses données avec MLINK de la suite LINKAGE.

Ces mêmes données ont été analysées avec le programme MAXPROB. Les LOD scores sont également supérieurs à 3 pour l'intervalle testé (Table X et Figure 15). Mais un LOD score maximum d'environ 8,6 a été obtenu entre les marqueurs D9S1830 et D9S1199.

Table IX : LOD scores obtenus par Antoine Duquette pour la première série de données avec la méthode de calcul deux-points du logiciel MLINK de la suite FASTLINK à un $\theta=0$.

Familles	Marqueurs							
	D9S179	SETX	D9S1830	D9S1199	D9S915	D9S2157	D9S164	D9S66
1	-	.	1,53	1,53	3,64	3,03	1,25	-
2	-	.	2,31	0,01	1,10	2,31	0,75	-
3	-	.	0,13	-0,01	0,22	0,85	0,00	-
4	-	.	0,12	0,25	0,00	0,85	0,12	-
5	-	.	0,00	0,73	0,12	0,73	0,60	-
6	-	.	0,51	0,52	0,55	1,45	0,85	-
7	-	.	0,25	0,60	0,14	0,44	0,83	-
8	-	.	0,12	-0,18	0,00	-0,18	0,12	-
9	-	.	-0,24	-0,21	-0,06	0,25	0,25	-
10	-	.	-0,48	-0,08	0,12	0,12	0,12	-
Total	-	.	4,25	3,15	5,82	9,86	4,91	-

ⁱ Pour toutes les représentations graphiques, sur l'axe vertical sont représentés les LOD scores et sur l'axe horizontal les marqueurs en fonction de leur position en cM.

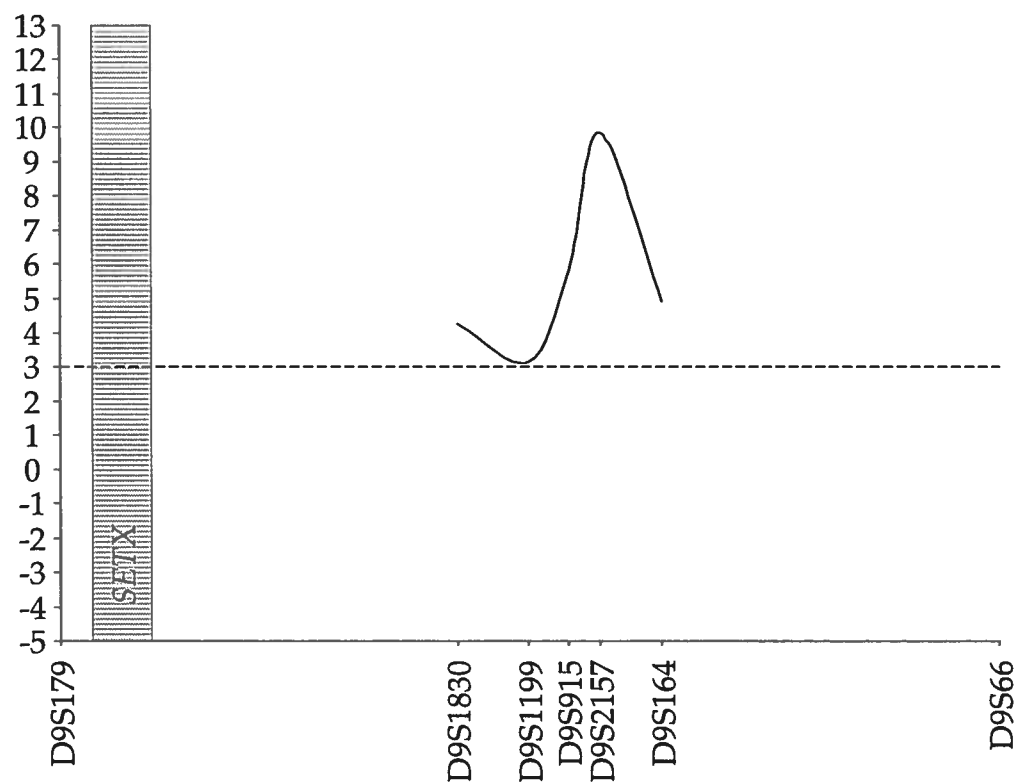


Figure 14 : Représentation graphique des LOD scores obtenus par Antoine Duquette pour la première série de données avec la méthode de calcul deux-points du logiciel MLINK de la suite FASTLINK à un $\theta=0$. L'emplacement du gène SETX a été représenté par une barre verticale hachurée.

Table X : LOD scores totaux obtenus pour la première série de données avec la méthode de calcul multipoints MAXPROB de la suite GENEHUNTER à un $\theta=0$.

Marqueur	Position	LOD score réel
D9S179	0.00	-
<i>SETX</i>	0.49	-
	0.98	-
	1.48	-
	1.97	-
	D9S1830	2.46
	2.55	8.48
	2.64	8.68
	2.72	8.71
	2.81	8.57
D9S1199	2.90	2.30
	2.95	6.72
	3.00	6.93
	3.05	6.98
	3.10	6.88
D9S915	3.15	1.76
	3.19	6.48
	3.23	6.65
	3.27	6.65
	3.31	6.48
D9S2157	3.35	$-\infty$
	3.43	6.43
	3.50	6.59
	3.58	6.58
	3.65	6.39
D9S164	3.73	1.10
	4.15	-
	4.57	-
	4.99	-
	5.41	-
D9S66	5.83	-

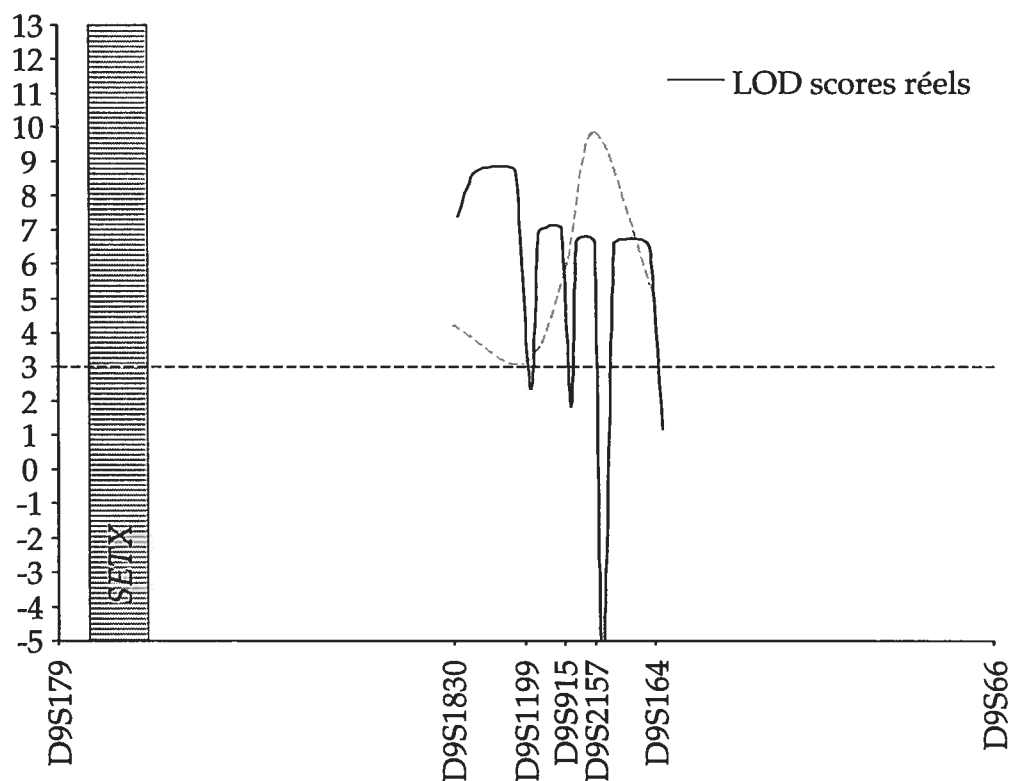


Figure 15 : Représentation graphique des LOD scores totaux obtenus pour la première série de données avec la méthode de calcul multipoints MAXPROB de la suite GENEHUNTER à un $\theta=0$. L'emplacement du gène *SETX* a été représenté par une barre verticale hachurée. La courbe obtenue à la figure 14 est représentée en pointillés gris.

2. Analyse de la deuxième série de données pour l'AOA2

Suite à la publication du locus et du gène pour l'AOA2, nous avons procédé à une révision de nos données d'haplotype, nous avons corrigé certaines erreurs de lecture, complété une partie des données manquantes et nous avons rajouté des données pour deux marqueurs supplémentaires: D9S179 et D9S66 (Figure 8). De plus, la famille 8 s'est révélée être consanguine au premier degré (voir famille 8 de l'annexe 3). Dans la famille 6, la sœur cadette de la patiente 20 qui n'avait pas été diagnostiquée lors de l'évaluation clinique car elle était trop jeune, a récemment développé des symptômes ataxiques. Un test diagnostique par séquençage a confirmé que cette personne

est effectivement porteuse homozygote de la mutation L1976R et est donc atteinte de l'AOA2 (voir famille 6 de l'annexe 3). À des fins de comparaison, ces nouvelles données corrigées ont été analysées selon les deux méthodes d'analyse deux-points et multipoints.

Avec la méthode d'analyse deux-points effectuée avec MLINK, nous avons obtenu un LOD score supérieur à 3 pour les marqueurs D9S179 et D9S1830. Le LOD score le plus élevé a été obtenu pour le marqueur D9S1830 avec une valeur de 5,56 (Table XI et Figure 16).

Table XI: LOD scores obtenus avec la méthode de calcul deux-points du logiciel MLINK de la suite LINKAGE à un $\theta=0$ avec les nouvelles données.

Familles	Marqueurs							
	D9S179	SETX	D9S1830	D9S1199	D9S915	D9S2157	D9S164	D9S66
1	1,53	.	1,53	$-\infty$	3,63	3,63	2,33	3,63
2	1,06	.	2,31	0,00	1,06	2,31	0,73	1,06
3	-0,03	.	-0,10	-0,01	-0,10	0,85	0,56	-0,38
4	0,85	.	0,25	$-\infty$	0,00	0,85	0,73	0,85
5	0,00	.	0,43	$-\infty$	0,12	0,73	0,60	$-\infty$
6	1,09	.	0,33	$-\infty$	$-\infty$	$-\infty$	$-\infty$	$-\infty$
7	0,52	.	0,52	$-\infty$	0,49	0,52	0,99	0,86
8	0,49	.	0,99	$-\infty$	0,49	0,52	0,82	-4,15
9	-0,42	.	-0,55	-0,11	-0,55	0,25	0,25	-0,55
10	0,12	.	-0,14	-0,05	-0,12	0,12	0,12	0,12
Total	5,23	.	5,56	$-\infty$	$-\infty$	$-\infty$	$-\infty$	$-\infty$

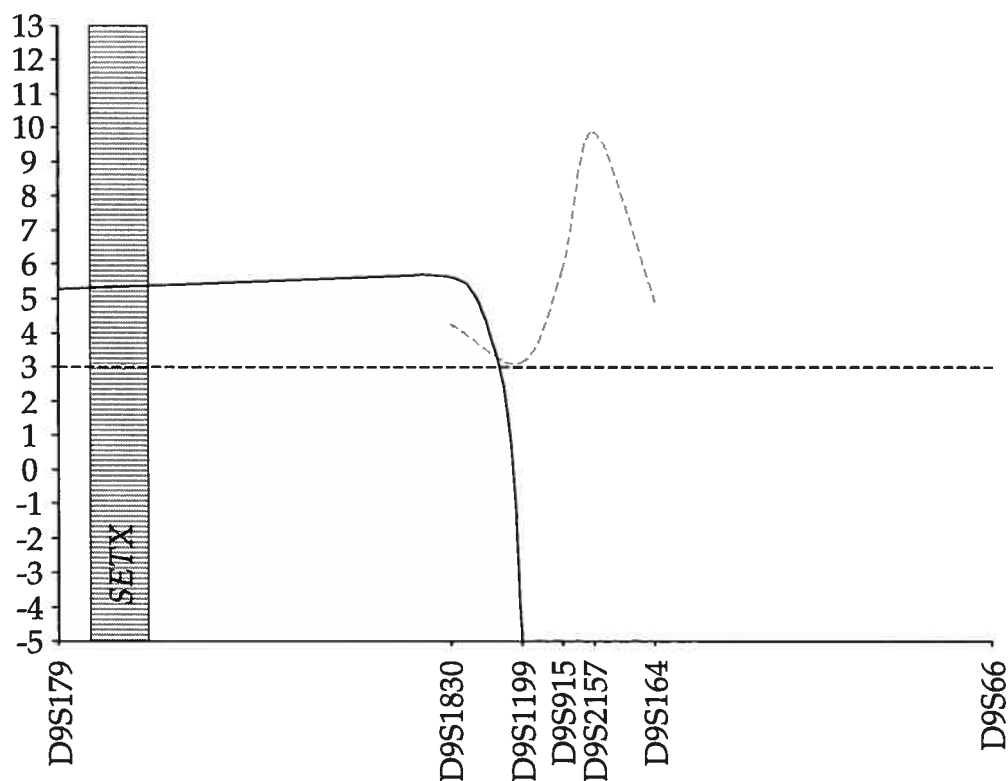


Figure 16 : Représentation graphique des LOD scores totaux obtenus avec la méthode de calcul deux-points du logiciel MLINK de la suite LINKAGE à un $\theta=0$ avec les nouvelles données. L'emplacement du gène *SETX* a été représenté par une barre verticale hachurée. La courbe obtenue à la figure 14 est représentée en pointillés gris.

Avec la méthode d'analyse multipoints exécutée par MAXPROB, nous avons obtenu des LOD scores supérieurs à 3 pour les marqueurs D9S179 et D9S1830 (Table XII et Figure 17). Le LOD score le plus élevé a été obtenu aux positions 0 et 0,49 cM avec une valeur de 9,71. Des LOD scores supérieurs à 3 ont été observés entre les marqueurs D9S164 et D9S66 avec des valeurs avoisinant 6,4 (Table XII et Figure 17).

Table XII: LOD scores obtenus avec la méthode de calcul multipoints MAXPROB de la suite GENEHUNTER à un $\theta=0$ avec les nouvelles données.

Marqueur	Position	LOD score réel	LOD score maximum
D9S179	0.00	9.71	12,92
<i>SETX</i>	0.49	9.71	12,92
	0.98	9.60	12,92
	1.48	9.34	12,93
	1.97	8.86	12,93
D9S1830	2.46	6.94	12,94
	2.55	6.75	12,94
	2.64	6.51	12,94
	2.72	6.20	12,94
	2.81	5.72	12,94
D9S1199	2.90	$-\infty$	12,94
	2.95	1.18	12,94
	3.00	1.14	12,94
	3.05	0.82	12,94
	3.10	0.08	12,94
D9S915	3.15	$-\infty$	12,94
	3.19	-5.17	12,94
	3.23	-4.58	12,94
	3.27	-4.51	12,94
	3.31	-4.96	12,94
D9S2157	3.35	$-\infty$	12,94
	3.43	-3.38	12,94
	3.50	-2.87	12,94
	3.58	-2.88	12,94
	3.65	-3.42	12,94
D9S164	3.73	$-\infty$	12,94
	4.15	6.02	12,94
	4.57	6.60	12,94
	4.99	6.72	12,93
	5.41	6.45	12,93
D9S66	5.83	$-\infty$	12,93

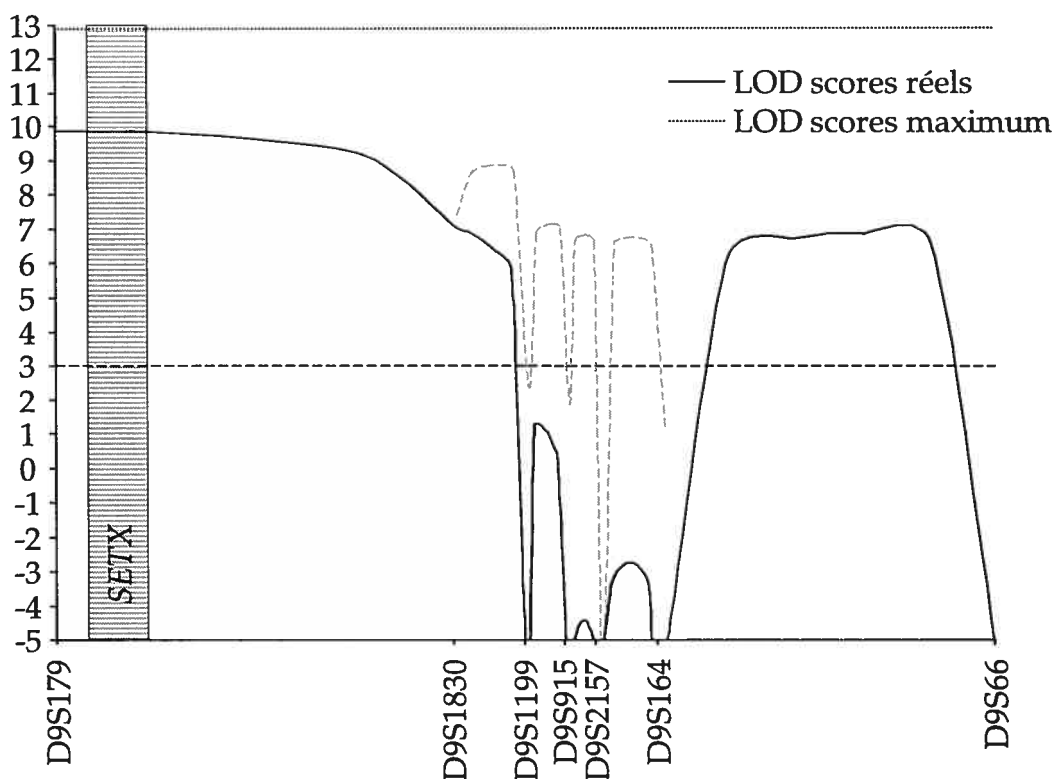


Figure 17 : Représentation graphique des LOD scores totaux obtenus avec la méthode de calcul multipoints MAXPROB de la suite GENEHUNTER à un $\theta=0$ avec les nouvelles données. L'emplacement du gène *SETX* a été représenté par une barre verticale hachurée. La courbe obtenue à la figure 15 est représentée en pointillés gris.

3. Analyse des données pour la NHSA2

Les données recueillies pour 11 marqueurs suite au génotypage des familles présentant des cas de NHSA2 ont été analysées selon les deux méthodes d'analyse deux-points et multipoints.

Avec la méthode deux-points effectuée par le programme MLINK, nous n'avons pas obtenu de LOD score supérieur à 3. Nous observons un plateau entre les marqueurs D12S352 et D12S389 où la valeur du LOD score est de 2,66 (Table XIII et Figure 18).

Table XIII : LOD scores obtenus avec la méthode de calcul deux-points du logiciel MLINK de la suite LINKAGE à un $\theta=0$ pour les haplotypes des familles des patients atteints de NHS2.

Familles	Marqueurs											
	D12S352	D12S200	D12S1455	D12S91	HSN2	D12S389	D12S388	D12S1285	D12S1608	D12S1656	D12S1642	D12S100
1	0,52	0,52	0,52	0,52	.	0,52	0,30	0,30	0,60	0,60	0,30	0,60
2	0,52	0,52	0,52	0,52	.	0,52	0,30	0,30	0,00	$-\infty$	$-\infty$	$-\infty$
3	0,00	0,00	0,00	0,00	.	0,00	-0,18	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
4	0,81	0,81	0,81	0,81	.	0,81	-4,21	-4,21	-4,45	0,95	-4,45	-3,93
5	0,00	0,00	0,00	0,00	.	0,00	0,12	0,12	0,12	-0,18	-0,18	0,12
6	0,81	0,81	0,81	0,81	.	0,81	0,49	1,07	1,24	1,07	1,07	-4,12
7	0,00	0,00	0,00	0,00	.	0,00	0,07	-0,32	-0,23	-0,20	0,37	0,37
8	0,00	0,00	0,00	0,00	.	0,00	$-\infty$	0,00	$-\infty$	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	.	0,00	0,00	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52
Total	2,66	2,66	2,66	2,66	.	2,66	$-\infty$	-2,09	$-\infty$	$-\infty$	$-\infty$	$-\infty$

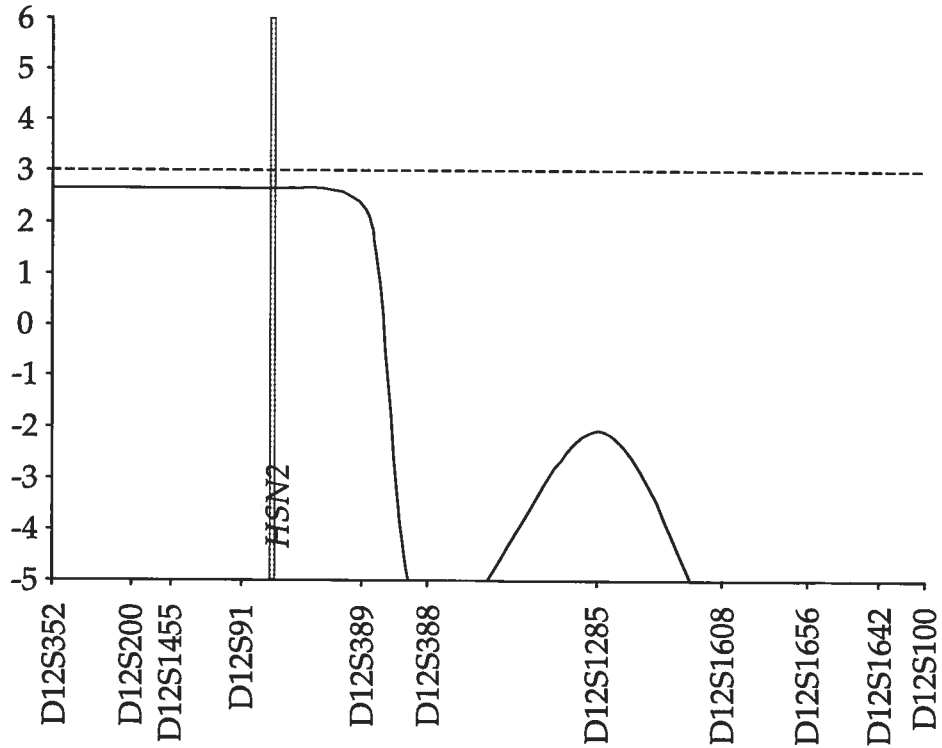


Figure 18 : Représentation graphique des LOD scores totaux obtenus avec la méthode de calcul deux-points du logiciel MLINK de la suite LINKAGE à un $\theta=0$ pour les haplotypes des familles des patients atteints de NHTA2. L'emplacement du gène *HSN2* a été représenté par une barre verticale hachurée.

La méthode multipoints exécutée par le programme MAXPROB a permis d'obtenir des LOD scores supérieurs à 3 pour les marqueurs D12S352, D12S200, D12S145, D12S91 et D12S389. Des LOD scores maximums de 5 et 4,99 ont pu être observés des positions 0,80 cM à 1,29 cM, soit entre les marqueurs D12S1455 et D12S389 (Table XIV et Figure 19).

Table XIV : LOD scores obtenus avec la méthode de calcul multipoints MAXPROB de la suite GENEHUNTER à un $\theta=0$ pour les haplotypes des familles des patients atteints de NHSA2.

Marqueur	Position	LOD score réel	LOD score maximum	Marqueur	Position	LOD score réel	LOD score maximum
D12S352	0.00	4.94	5.10		2.23	0.25	5.11
	0.09	4.94	5.10		2.41	0.35	5.11
	0.17	4.95	5.10		2.60	0.25	5.11
	0.26	4.96	5.10		2.78	-0.04	5.11
	0.34	4.96	5.10	D12S1285	2.97	-1.47	5.11
D12S200	0.43	4.97	5.10		3.11	-0.56	5.11
	0.47	4.97	5.10		3.24	-0.48	5.11
	0.52	4.97	5.10		3.38	-0.55	5.11
	0.56	4.98	5.10		3.51	-0.79	5.11
	0.61	4.98	5.10	D12S1608	3.65	-2.08	5.11
D12S1455	0.65	4.98	5.10		3.74	-0.91	5.11
	0.73	4.98	5.10		3.84	-0.73	5.11
	0.80	4.99	5.11		3.93	-0.73	5.11
	0.88	4.99	5.11		4.03	-0.94	5.11
	0.95	5.00	5.11	D12S1656	4.12	$-\infty$	5.11
D12S91	1.03	5.00	5.11		4.20	-5.09	5.11
	<i>HSN2</i>	1.16	4.99		5.11	4.28	-4.93
1.29		4.99	5.11		4.35	-4.99	5.11
1.43		4.98	5.11		4.43	-5.32	5.11
D12S389	1.56	4.97	5.11	D12S1642	4.51	$-\infty$	5.11
	1.69	4.96	5.11		4.56	-0.35	5.11
	1.76	4.87	5.11		4.61	-0.15	5.11
	1.83	4.75	5.11		4.66	-0.33	5.11
	1.90	4.58	5.11		4.71	-0.98	5.11
1.97	4.28	5.11	D12S100	4.76	$-\infty$	5.11	
D12S388	2.04	-0.96		5.11			

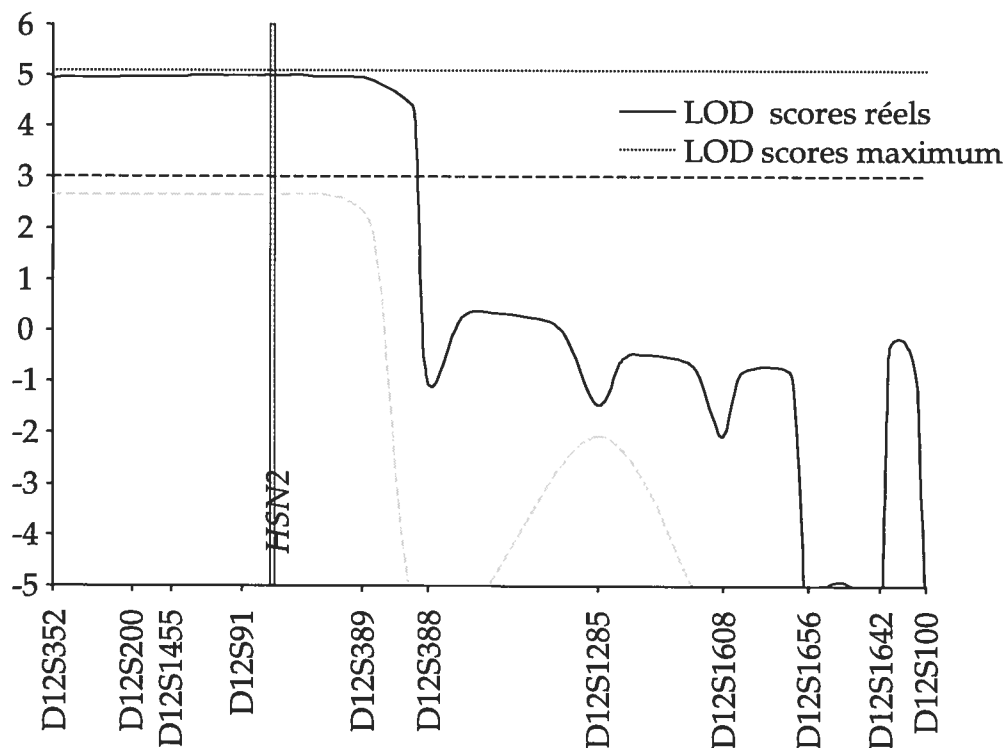


Figure 19 : Représentation graphique des LOD scores totaux obtenus avec la méthode de calcul multipoints MAXPROB de la suite GENEHUNTER à un $\theta=0$ pour les haplotypes des familles des patients atteints de NLSA2. L'emplacement du gène *HSN2* a été représenté par une barre verticale hachurée. La courbe obtenue à la figure 18 est représentée en pointillés gris.

D. Discussion

1. Analyse des données pour l'AOA2

L'analyse des données effectuée en 2002 par Antoine Duquette a permis de définir un intervalle candidat délimité par les marqueurs D9S1830 et D9S164. Suite à l'analyse de ses haplotypes, il a étendu cet intervalle à une région flanquée par les marqueurs D9S179 et D9S66. Cette région comprend près d'une trentaine de gènes. Étant donné qu'il a obtenu un LOD score maximum pour le marqueur D9S2157, la région entourant ce marqueur est devenue un intervalle de plus grand intérêt et il a préférentiellement étudié des gènes proches de ce marqueur. Malheureusement, la publication du gène

responsable de l'AOA2 en 2004 (Moreira 2004) a montré que la région candidate délimitée par D9S179 et D9S66 comprenait bien le gène *SETX*, mais qu'en revanche, le marqueur D9S2157 n'était pas le marqueur le plus proche, celui-ci étant D9S179 (Figure 8).

Cette observation nous a amenés à nous questionner sur la fiabilité de nos données ainsi que sur la méthode d'analyse de liaison deux-points qui avait été utilisée. Nous avons alors voulu comparer les résultats d'analyse selon les deux méthodes d'analyse deux-points et multipoints. Nous avons donc alimenté le programme MAXPROB de GENEHUNTER avec la même série de données utilisée lors de l'analyse faite par Antoine Duquette afin d'évaluer la pertinence des résultats fournis par les deux programmes de calcul.

Les résultats sont très différents. Des LOD scores supérieurs à 3 sont atteints sur toute la région étudiée. Ils permettent de définir le même intervalle candidat s'étendant de D9S1830 à D9S164 que lors de la première analyse. Mais la valeur de LOD score la plus élevée est cette fois-ci atteinte entre les marqueurs D9S1830 et D9S1199. Cette observation change l'intervalle de plus grand intérêt. Cependant, le fait que le LOD score soit supérieur à 3 pour tout l'intervalle entre les marqueurs D9S1830 et D9S164 qui flanquent la région analysée ne permet pas de restreindre l'intervalle candidat à une région délimitée par ces deux marqueurs. En effet, l'analyse de données pour des marqueurs centromériques et télomériques à cet intervalle pourraient aussi donner des LOD scores supérieurs à 3 et ainsi étendre cet intervalle candidat. Ces observations nous ont amenés à réviser et compléter nos données et à procéder à plusieurs analyses de liaison. Nous avons ajouté deux marqueurs (D9S179 et D9S66) à notre analyse, ainsi qu'une boucle de consanguinité préalablement inconnue pour la famille 8. De plus, dans la famille 6, la sœur cadette de la patiente 20 s'est très récemment révélée atteinte par la maladie (voir famille 6 de l'annexe 3).

Ces modifications ont conduit à des résultats surprenants avec les méthodes deux-points et multipoints.

L'analyse deux-points de ces nouvelles données donne des LOD scores supérieurs à 3 pour les marqueurs D9S179 et D9S1830. Toutefois, puisque cette méthode ne permet pas de dire si le locus de la maladie est à droite ou à gauche du marqueur, l'intervalle candidat est délimité du côté télomérique par le marqueur D9S1199 et du côté centromérique, ces seules données ne permettent pas de définir un marqueur flanqueur. Des données supplémentaires pour un ou plusieurs marqueurs centromériques au marqueur D9S179 seraient nécessaires. Cependant, on observe que la région télomérique au marqueur D9S1199 est exclue car les LOD scores sont inférieurs à -2 et part de là même la région initialement d'intérêt majeur entourant le marqueur D9S2157 est elle aussi exclue.

Avec les résultats de l'analyse multipoints, une première région candidate peut-être délimitée par les marqueurs D9S179 et D9S1199 car les LOD scores sont supérieurs à 3 entre ces marqueurs (les valeurs varient entre 5,72 et 9,71). Une seconde région candidate est observée entre les marqueurs D9S164 et D9S66 où les LOD scores avoisinent 6,4. Cependant, au vu des valeurs de LOD scores obtenues dans ces deux régions, la première constitue un intervalle d'intérêt majeur. On peut compter environ dix gènes entre les marqueurs D9S179 et D9S1199. Le LOD score le plus élevé dans cette région a été obtenu aux positions 0 et 0,49 cM. Ces positions sont très proches de l'emplacement du gène *SETX* qui est situé à proximité du marqueur D9S179 du côté télomérique. Il est aussi intéressant de noter que cette nouvelle analyse exclut une grande partie de la région candidate initialement délimitée par les marqueurs D9S1830 et D9S164 et que la région entourant le marqueur D9S2157 qui était d'un grand intérêt lors de la première étude est incluse dans cette exclusion.

En rétrospective, il est donc évident que de tels résultats obtenus plus tôt auraient conduit à l'étude de gènes proches de cette position et non pas à proximité du marqueur D9S2157.

2. Analyse des données pour la NHSA2

Dans la même optique d'effectuer une comparaison de la validité des résultats générés avec les méthodes deux-points et multipoints, nous avons procédé à l'analyse des données collectées suite au génotypage des familles du projet NHSA2 avec les deux programmes de calculs MLINK et MAXPROB.

Les résultats fournis par la méthode deux-points ne présentent pas de valeur de LOD score supérieure à 3. Un plateau à 2,66 s'étendant du marqueur D12S352 au marqueur D12S389 a été observé. Ces résultats permettent d'exclure la région allant du marqueur D12S388 au marqueur D12S100. Cependant, la région située entre les marqueurs D12S352 et D12S389 ne peut pas être considérée comme candidate, ni exclue, car les valeurs de LOD score sont comprises entre -2 et 3 et ne permettent pas de conclure. Dans cette situation, il faudrait accumuler des données pour plus de familles.

En revanche, les résultats obtenus avec la méthode multipoints sont concluants. On observe des LOD scores supérieurs à 3 (entre 4,28 et 5) pour une région s'étendant du marqueur D12S352 au marqueur D12S389, définissant ainsi un intervalle candidat délimité par ces deux marqueurs. Les LOD scores les plus élevés (4,99 et 5) étant obtenus pour les positions 0,73 cM à 1,29 cM comprenant les marqueurs D12S91 et D12S389, cette région constitue un intervalle de plus grand intérêt et compte seulement six gènes ou séquences présumées codantes. Ces données d'analyse permettent également d'exclure toute la région en aval de D12S388. Il est à noter que le premier gène à avoir été séquencé avant que nous ne soyons informés du locus 12p13.33 de la maladie est *WNT5B*. Ce gène est situé à proximité du

marqueur D12S1608 qui est exclu dans cette analyse. Par ailleurs, il est intéressant de mentionner que le gène *HSN2* responsable de la NHSA2 est positionné entre les marqueurs D12S91 et D12S389 tout en étant très proche du premier, donc dans l'intervalle présentant le plus grand intérêt.

3. Conclusions de l'étude comparative

Cette étude comparative nous a permis de tirer plusieurs conclusions quant au choix de la méthode d'analyse (par les haplotypes ou par l'une des méthodes de calcul deux-points et multipoints) en fonction des données à disposition.

Afin de mieux visualiser et de comparer les avantages et les inconvénients des analyses des haplotypes, deux-points et multipoints, nous avons représenté sur les figures 20 et 21 les intervalles candidats que nous avons définis suite aux trois types d'analyses que nous avons faites sur chaque série de données pour l'AOA2 et la NHSA2.

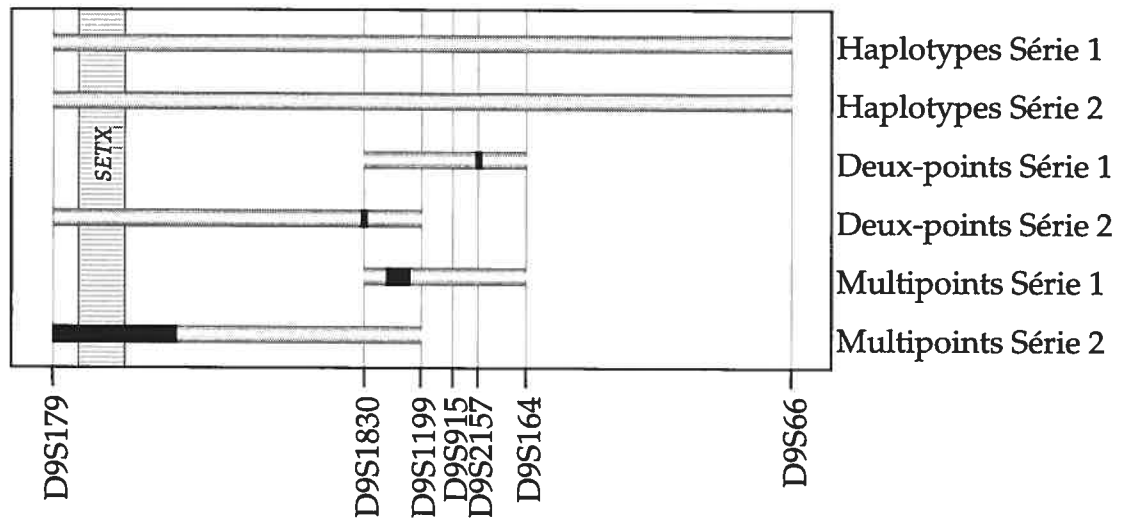


Figure 20 : Illustration des intervalles candidats définis suite aux analyses des haplotypes, deux-points et multipoints de la première et de la deuxième série de données pour l'AOA2. Chaque intervalle candidat est représenté par une barre horizontale, la zone noire correspond à la région de plus grand intérêt. L'emplacement du gène *SETX* est identifié par une barre verticale hachurée.

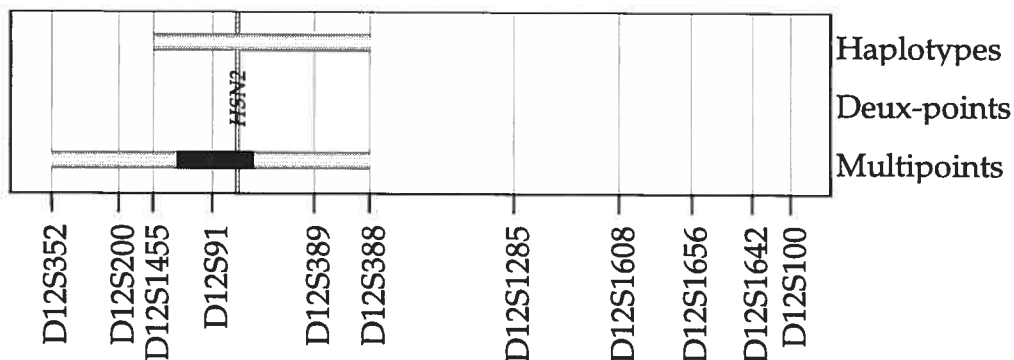


Figure 21 : Illustration des intervalles candidats définis suite aux analyses des haplotypes, deux-points et multipoints des données pour la NHSA2. Chaque intervalle candidat est représenté par une barre horizontale, la zone noire correspond à la région de plus grand intérêt. L'emplacement du gène *HSN2* est identifié par une barre verticale hachurée. Notons que l'analyse deux-points n'a pas permis de délimiter un intervalle candidat.

Tout d'abord, il apparaît clairement en comparant les résultats obtenus par l'analyse de la première et de la deuxième série de données pour l'AOA2 (Figure 20) avec une méthode de calcul informatique, que la qualité et la quantité d'information ont un impact direct sur les LOD scores que l'on obtient et ce quelle que soit la méthode utilisée. De plus, tous les individus des familles dont on connaît le sexe et le phénotype devraient être représentés, les génotypes devant être définis comme inconnus le cas échéant. Les boucles de consanguinité dont les deux méthodes deux-points et multipoints tiennent compte devraient apparaître dans les données introduites dans les programmes de calcul. Ces données supplémentaires peuvent grandement influencer les LOD scores des familles que ce soit positivement ou négativement.

Cette étude comparative nous montre aussi que le choix de la méthode utilisée a une importance majeure sur les résultats obtenus. Le génotypage des membres des familles permet d'établir des haplotypes qui peuvent permettre de définir un intervalle candidat relativement juste. Pour l'AOA2, la zone définie par les haplotypes comprend bien le gène *SETX*, mais cet intervalle est très large (près de 1,6 Mb) et contient de nombreux gènes (Figure 20). Pour la NHSA2, l'intervalle candidat délimité avec les haplotypes est plus petit (environ 0,4 Mb) et il contient au moins huit gènes ou séquences présumées codantes (Figure 21). Il apparaît donc que l'analyse des haplotypes est moins précise que l'utilisation d'une méthode de calcul informatique.

Dans nos deux exemples, on voit que la méthode deux-points est moins fiable que la méthode multipoints. Pour l'AOA2, l'analyse de la deuxième série de données avec la méthode deux-points a donné un intervalle candidat qui contient *SETX*, mais le plus haut LOD score a été obtenu pour le marqueur D9S1830 qui n'est pas le plus proche du gène (Figure 20). Pour la NHSA2, l'analyse avec la méthode deux-points n'a pas permis de définir d'intervalle

candidat. L'emploi de la méthode multipoints pour l'analyse de la deuxième série de données pour l'AOA2 a permis de définir un intervalle candidat plus restreint qu'avec les haplotypes. De plus, les plus hauts LOD scores ont été obtenus pour une zone très petite (environ 0,2 Mb) qui contient le gène *SETX* et deux autres gènes seulement (Figure 20). Pour la NHSA2, l'analyse multipoints a permis de définir un intervalle candidat plus grand qu'à partir de l'étude des haplotypes. Cependant, les plus hauts LOD scores ont été obtenus pour une petite région d'environ 0,2 Mb qui comprend six gènes ou séquences présumées codantes.

La méthode deux-points génère de bons résultats lorsque la quantité d'information disponible est grande, c'est-à-dire lorsque l'on a de nombreuses et/ou grandes familles. Nous avons pu observer que dans le cas de la NHSA2, la méthode deux-points ne permettait pas d'émettre de conclusions, tandis que la méthode multipoints a su tirer plus d'information des mêmes données, ce qui a abouti à la génération de résultats interprétables. La méthode multipoints est plus appropriée et plus fiable lorsque la quantité d'information est réduite, c'est-à-dire lorsque les familles sont petites et/ou peu nombreuses, lorsque certains marqueurs sont peu polymorphiques et donc peu informatifs ou lorsque certaines données de génotypage sont manquantes.

Lors d'une étude de liaison, l'analyse de liaison peut avoir une grande influence sur la suite du projet. Souvent, les données sont difficilement interprétables sans avoir recours à l'informatique. Dans les deux exemples cités ici, on peut voir que l'utilisation du programme d'analyse de liaison multipoints aboutit à la définition d'un intervalle candidat plus précis et permet même de cibler de petites régions qui présentent un intérêt plus grand à l'intérieur de ce même intervalle.

Nous avons utilisé le programme GENEHUNTER pour la méthode multipoints, mais le programme LINKAGE (et d'autres) offrent aussi cette possibilité. Le programme GENEHUNTER se trouve rapidement limité par la taille des familles. Avec ce programme, le temps de calcul croît proportionnellement avec le nombre de marqueurs, mais de manière exponentielle avec l'augmentation de la taille des familles et le seuil maximum est très rapidement atteint. L'avantage de GENEHUNTER réside dans le fait que le nombre de marqueurs analysés soit illimité. Cela permet de mieux définir l'intervalle candidat et d'affiner la recherche. Le programme LINKAGE arrive à gérer de grandes familles, mais le nombre de marqueurs est fortement limitant. Nous avons donc choisi GENEHUNTER car dans les deux projets les familles étaient relativement de petite taille.

Nous avons mentionné que les programmes utilisés ici présentent des limites. Cependant, des programmes plus récents permettent de pallier certains de ces problèmes. Le programme ALLEGRO présenté en 2000 (Gudbjartsson 2000) effectue des analyses multipoints et est capable de gérer à la fois de grandes familles et un nombre illimité de marqueurs. Ce programme offert par DeCode Genetics (Reykjavik, Islande) est disponible gratuitement sur demande pour une utilisation non commerciale (Gudbjartsson 2000). Le programme MERLIN introduit en 2002 (Abecasis 2002) est très rapide, permet de réaliser des analyses de liaison multipoints et comme ALLEGRO est capable de gérer à la fois de grandes familles et un nombre illimité de marqueurs. Il est lui aussi offert gratuitement par le Wellcome Trust for Human genetics de l'Université d'Oxford (Oxford, Royaume-Uni) (Abecasis 2002).

Les deux articles présentés dans ce mémoire partagent plusieurs similitudes. Outre le fait qu'ils se ressemblent au niveau méthodologique, ils décrivent tous deux une nouvelle maladie à effet fondateur québécois. Dans la première partie de notre discussion, nous examinerons plus précisément cette seconde similarité. Nous terminerons notre mémoire par une discussion sur le rôle présumé des protéines HSN2 et SETX ainsi que sur l'impact des mutations identifiées et leur rôle possible dans la physiopathologie de ces deux génopathies.



DISCUSSION

Deux nouveaux exemples d'effet fondateur au Québec

A. Effet fondateur et origine des mutations

1. Pourquoi pensons-nous que la NHSA2 et L'AOA2 sont le fruit d'effets fondateurs ?

D'une part, le phénotype des patients pour chacune des maladies est relativement homogène et d'autre part, la répartition géographique des cas montre qu'ils sont regroupés dans des régions particulières : la région de Lanaudière dans le cas de la NHSA2 et la région de la Gaspésie pour l'AOA2. De plus, la présence de mutations plus fréquentes dans la population québécoise pour ces deux pathologies confirme l'hypothèse de départ.

Ces deux maladies se classent dans la catégorie des maladies non-spécifiques au Québec qui sont répandues ailleurs dans le monde mais pour lesquelles la fréquence est particulièrement élevée chez les Canadiens français. En effet, la NHSA2 a été rapportée chez des patients d'origine libanaise (Riviere 2004; Roddier 2005), arabe (Giaccai 1952), turque (Bockers 1989) et terre-neuvienne (Lafreniere 2004). Cependant, les cas décrits sont peu nombreux. De même, l'AOA2 a été rapportée dans de nombreux autres pays : Algérie, Vietnam, Cap-Vert, Portugal, Espagne, Turquie, Japon, Pakistan, Tunisie et Royaume-Uni (Moreira 2004). Mais là encore, pour chaque pays, le nombre de cas et de familles est restreint. Pour ces deux maladies, la fréquence est donc fort probablement plus élevée chez les Canadiens français.

On observe pourtant plusieurs différences entre ces deux maladies et les autres maladies à effet fondateur connues au Québec. Pour les autres maladies, le nombre de mutations varie entre 1 et 3 et pour la plupart d'entre

elles, la mutation la plus fréquente est présente sur plus de 90% des chromosomes porteurs (Tables I et II). Par exemple, la fréquence de la mutation la plus courante pour des maladies récessives est de 92,6% pour l'ARSACS, de 99,4% pour la polynévrite avec ou sans agénésie du corps calleux, de 98% pour le syndrome de Leigh, de 95,4% pour la tyrosinémie et de 91,7% pour le rachitisme vitamino-dépendant. Pour la NHSA2 nous avons deux mutations différentes chez les Canadiens français. La mutation c.943C→T qui est la plus commune est retrouvée sur 75% des chromosomes porteurs, mais seulement 56% des cas sont homozygotes pour cette substitution et 38% sont hétérozygotes. Dans le cas de l'AOA2, nous avons identifié quatre mutations distinctes chez les Canadiens français. La mutation L1976R, plus commune, est portée par 85% des chromosomes familiaux et 77% des patients sont homozygotes pour cette substitution, le reste des patients étant hétérozygotes. Les fréquences des mutations majoritaires dans la NHSA2 et l'AOA2 sont donc moindres que celles d'autres maladies à effet fondateur identifiées au Québec jusqu'ici.

Les taux de porteurs de mutations pour les maladies à effet fondateur connues dans la région du Saguenay Lac-St-Jean varient de 1/28 (syndrome de Leigh) à 1/22 (ARSACS). Dans le cas de la NHSA2, les taux estimés dans la région de Lanaudière sont peu élevés: 1/116 pour la mutation c.943C→T et 1/260 pour la mutation c.918-919insA. Les taux estimés pour le village au sud de Joliette atteignent 1/18 pour la mutation c.943C→T et 1/28 pour la mutation c.918-919insA. Le taux de porteurs pour l'une ou l'autre des mutations est donc de 1/11. Pour cette population restreinte, les taux sont comparables, sinon plus élevés, que ceux observés dans la région du Charlevoix-Saguenay-Lac-St-Jean. On pourrait parler dans le cas de ce village d'un micro-effet fondateur. Dans l'exemple de l'AOA2, l'étude de prévalence a permis d'estimer des fréquences de porteurs pour la mutation L1976R à

1/28 pour les Québécois gaspésiens d'origine anglo-normande et 1/47 pour les Canadiens français vivant dans la région de la Gaspésie. Ces taux sont moins élevés que pour les autres maladies à effet fondateur de la région du Charlevoix-Saguenay-Lac-St-Jean (Tables I et II).

2. Comment et quand ont été introduites les différentes mutations responsables et qu'est-ce qui explique que ces maladies soient plus présentes au Québec ?

Dans l'exemple de la NHSA2, la majorité des cas sont résidents ou originaires de la région de Lanaudière. Or, le Sud du Québec, de par son hétérogénéité génétique relative, n'a pas été perçu comme une partie de la province propice aux effets fondateurs. Cependant, Lanaudière présente une situation démographique particulière. Cette région a connu différents épisodes de peuplement et les documents historiques montrent que le peuplement ancien de cette région reflète la composition initiale de l'immigration en Nouvelle-France, les fondateurs étant d'origines diverses et en nombre limité. Récemment cette région a connu une période d'accroissement démographique très important, triplant sa population en quatre décennies.

Lors de l'établissement de la Nouvelle-France, trois grandes villes (Québec, Trois-Rivières et Montréal) ont été fondées, constituant trois ports d'entrée autour desquels la colonie s'est développée. L'analyse de la contribution génétique de ces trois regroupements territoriaux montre l'existence de trois bassins génétiques anciens au Québec : l'Ouest, le Centre et l'Est. Le bassin de l'Ouest a été essentiellement colonisé par des résidents de la ville de Montréal, le Centre par ceux de Trois-Rivières et l'Est par ceux de la ville de Québec (Gagnon 2001).

La mutation c.943C→T n'a été décrite que chez des personnes canadiennes-françaises. La mutation la plus commune et certainement la plus ancienne aurait été introduite dans la région de Lanaudière par des fondateurs lors de

sa colonisation au cours du 17^{ème} siècle. Il est cependant difficile de déterminer de quel bassin génétique cette mutation provient, car Lanaudière est une région relativement vaste et facilement accessible.

La seconde mutation (c.918-919insA) aurait quant à elle été introduite plus récemment et plusieurs éléments suggèrent que son origine est acadienne.

Premièrement, cette mutation a été décrite pour la première fois chez un patient néo-écossais (Lafreniere 2004). Deuxièmement, la reconstruction généalogique des cas hétérozygotes pour cette mutation montre qu'ils sont tous descendants d'un couple qui s'est installé au 18^{ème} siècle dans Lanaudière et dont la femme est acadienne (analyse non publiée). Troisièmement, au 18^{ème} siècle, plusieurs villages de Lanaudière ont connu une implantation acadienne et cette région est probablement l'une de celles qui gardent le plus de souvenirs tangibles de la présence acadienne au Québec. Fondée en 1855, la municipalité de Saint-Jacques (à environ 15 Km à l'ouest de Joliette) est considérée comme le berceau acadien de la région de Lanaudière. Les Acadiens ont par la suite débordé dans toutes les localités environnantes, y compris Joliette (Lanoue 1972). Cette seconde mutation aurait donc probablement été introduite au cours du 18^{ème} siècle suite à un courant de migration des Acadiens vers Lanaudière au temps de la période de la grande déportation.

Dans le cas de la NHSA2, chacune des deux mutations a individuellement peu d'incidence sur l'augmentation du nombre de cas dans la région de Lanaudière du fait de leurs fréquences relativement peu élevées dans la région. Mais la présence de ces deux mutations simultanément explique l'accroissement considérable de la prévalence de la maladie dans cette région.

Dans le cas de l'AOA2, plusieurs cas sont résidents ou originaires de la Gaspésie. Le Nord-Est du Québec est réputé pour être propice aux effets fondateurs. La région de la Gaspésie a été bâtie par de multiples ethnies.

Après 1760, la Gaspésie est devenue une terre d'adoption pour plusieurs populations provenant de part et d'autre de l'Atlantique, tandis que certains Acadiens sont revenus s'y établir une fois les tensions de la guerre de Sept Ans apaisées. Les différences ethniques, religieuses et linguistiques, sont « accentuées par l'isolement géographique et par la faiblesse des moyens de communication entre les villages. À titre d'exemple, il n'y a pas de route carrossable ceinturant la Gaspésie avant la seconde moitié du 19^{ème} siècle. La route c'est la mer, ce qui tend à augmenter l'isolement au sein de la péninsule » (Alain 2003). L'isolement qu'il soit ethnique, linguistique, religieux ou géographique est un des facteurs clés de l'apparition d'un effet fondateur.

La plupart des maladies issues d'un effet fondateur dans le Nord-Est du Québec présentent une mutation très fréquente qui explique presque tous les cas. Or, dans le cas de l'AOA2, la mutation commune n'est pas si fréquente que cela. Sur les dix familles étudiées, deux sont consanguines (familles 7 et 8) et sont homozygotes pour cette mutation. Ainsi, le grand nombre de cas gaspésiens peut être expliqué en partie par la consanguinité qui aurait contribué à la concentration de cette mutation dans la région. Mais cinq autres familles non consanguines sont elles aussi homozygotes pour cette mutation. Ces cinq familles sont résidentes du Charlevoix, du Saguenay-Lac-St-Jean, de l'extrême ouest du Nouveau-Brunswick et de la pointe de la Gaspésie. Ces cinq familles sont donc géographiquement relativement éloignées et à ce jour, l'étude généalogique n'a pas encore permis d'identifier un couple qui aurait possiblement introduit la mutation au Québec.

Cependant, lors de l'étude d'un grand échantillon gaspésien, nous avons retrouvé cette mutation chez trois Gaspésiens dont certains ancêtres sont d'origine anglo-normande, plus précisément des îles de Jersey et Guernesey. De plus, les trois familles vivant à l'extrémité de la péninsule gaspésienne sont reliées, à environ cinq générations, par un ancêtre commun d'origine

acadienne. La présence anglo-normande et acadienne en Gaspésie est bien connue. Les Anglo-Normands se sont d'abord implantés sur les bancs de pêche de Terre-Neuve et cela très tôt, la référence écrite la plus ancienne datant de 1591 (Frenette 1996). Après 1763, les Anglo-Normands basés à Terre-Neuve se sont installés sur l'île du Cap-Breton, en Gaspésie et au Nouveau-Brunswick (Frenette 1996). La mutation L1976R pourrait donc avoir été introduite lors de l'immigration de résidents anglo-normands au cours du 18^{ème} siècle.

Les trois autres mutations identifiées sont quant à elles très rares et probablement plus récentes. La mutation R1363X présente chez le patient de la famille 5 a aussi été décrite chez trois familles originaires du Cap-vert, du Portugal et d'Espagne. Cette mutation pourrait avoir été introduite par des immigrants de ces pays qui se sont établis au Québec. L'origine des deux autres mutations reste totalement inconnue et elle n'ont été décrites que dans des cas Canadiens français (Moreira 2004; Duquette 2005).

Dans l'exemple de l'AOA2, la mutation commune serait le fruit d'un effet fondateur et la consanguinité aurait concouru à l'accroissement du taux de porteurs. Les trois autres mutations étant très rares, l'incidence de la maladie en dehors de la Gaspésie reste faible.

3. Qu'est-ce que ces études amènent en retour à la population ?

L'identification des mutations responsables de ces deux maladies chez les Canadiens français a un impact important sur les populations à risque. Nous pouvons d'ores et déjà offrir aux patients, aux familles, aux conjoints et aux enfants à risque un test diagnostique qui permet de déterminer s'ils sont porteurs d'une mutation et le cas échéant de laquelle. Dans le cas de dépistage de patients, le test permettra de poser un diagnostic plus précis et ainsi de proposer un traitement plus approprié de la maladie. Dans le cas où des membres familiaux ou des conjoints sont porteurs, un conseil génétique

pourra être offert aux couples afin de leur exposer les risques d'avoir un enfant atteint de la maladie. L'identification des mutations responsables peut aussi permettre de mettre en place un programme de dépistage, d'éducation et de conseil génétique qui serait proposé aux populations à risque. Cela permettrait aussi de déterminer avec plus de précision le taux de porteurs régional pour chaque mutation. Un tel programme a été mis en place il y a plus de 20 ans à Montréal visant les étudiants universitaires issus de populations à risque pour la maladie de Tay-Sachs et la β -thalassémie. L'incidence de ces deux maladies a chuté de plus de 90% durant les deux dernières décennies, les rares nouveaux cas sont issus de couples ne faisant pas partie des populations visées ou de couples non-dépistés (Mitchell 1996).

B. Rôle des protéines et pathologie moléculaire

1. Quel est le rôle présumé de la protéine HSN2 ?

La fonction de la protéine HSN2 mutée dans la NHSA2 reste à ce jour inconnue. Tel qu'il a déjà été rapporté, une analyse bioinformatique de la séquence protéique à l'aide du programme SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) a permis d'identifier un peptide signal situé au niveau N-terminal de la protéine (résidus d'acides aminés 1 à 17) (Lafreniere 2004). Le programme PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>) a quant à lui prédit la localisation cellulaire de la protéine au niveau lysosomal (lumen) avec une certitude de 47,6% ou la sécrétion de la protéine avec une certitude de 37%. Au niveau de la pathophysiologie, la NHSA2 est principalement caractérisée par une démyélinisation ainsi qu'une perte de fibres non myélinisées au niveau du système nerveux périphérique.

Au moins deux maladies neurogénétiques ont été associées à des protéines vraisemblablement localisées au niveau lysosomal. La neuropathie Charcot-

Marie-Tooth de type 1C (CMT1C) est caractérisée par une démyélinisation des nerfs périphériques entraînant un affaiblissement et une atrophie musculaire ainsi qu'une perte de sensibilité (Street 2003). Le gène responsable de cette pathologie est *LITAF* (lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α factor) aussi appelé *SIMPLE* (small integral membrane protein of lysosome/late endosome) (Bennett 2004). Il a été montré que *SIMPLE* est exprimé dans les cellules de Schwann (Bennett 2004). Sa localisation subcellulaire au niveau du lysosome et la présence de domaines putatifs suggèrent que cette protéine jouerait un rôle dans la dégradation lysosomale médiée par l'ubiquitination au niveau du système nerveux périphérique (Street 2003; Bennett 2004). La maladie de Niemann-Pick de type C est une affection neurodégénérative fatale. Le gène muté dans cette pathologie est *NPC1* (Niemann-Pick C1) qui code pour une protéine gliale présente dans les processus astrocytaires associés aux terminaisons nerveuses. Une étude a permis de montrer que *NPC1* est localisée dans des vésicules ressemblant aux lysosomes (Patel 1999). Ainsi, *HSN2* pourrait jouer un rôle au niveau de la dégradation lysosomale et son absence compromettrait la dégradation protéique et ainsi conduirait à la dégénérescence des cellules de Schwann et donc à une démyélinisation des fibres et à une neurodégénérescence des neurones périphériques.

Le programme PSORT a aussi prédit que *HSN2* pourrait être une protéine sécrétée. Tel qu'il a déjà été proposé, *HSN2* pourrait alors être un nouveau facteur neurotrophique (Lafreniere 2004). Le gène *NTRK1* muté dans la *NHSA4* est un récepteur de facteur neurotrophique (Indo 1996). Il ne serait donc pas surprenant que *HSN2* soit un peptide sécrété jouant un rôle dans la croissance et le maintien neuronal.

2. Quelles sont les caractéristiques et l'impact biologique des différentes mutations dans la NHSA2 ?

Dans le cas de la NHSA2, toutes les mutations identifiées sont des mutations non-sens (Figure 22). La mutation c.868C→T est une mutation originale. Elle change une arginine pour un codon stop. La substitution C→T est la plus courante dans le cas de mutation non-sens et la mutation R→X est la plus fréquente parmi toutes les mutations connues (The Human Gene Mutation Database, Statistics). Les mutations c.868C→T, c.943C→T et c.918-919insA entraînent la formation d'une protéine tronquée de 289, 314 et 318 aa respectivement au lieu de 434 aa pour la protéine native. Ces troncations représentent respectivement 33%, 28% et 27% de perte du côté C-terminal de la protéine. Ainsi, soit la protéine mutée est ubiquitinée et dégradée par le protéasome et donc absente chez nos patients, soit elle ne peut pas assurer sa fonction. En effet, la portion manquante qui représente environ un tiers de la protéine native doit contenir un ou plusieurs domaines qui jouent un rôle essentiel, car leur absence est pathologique.

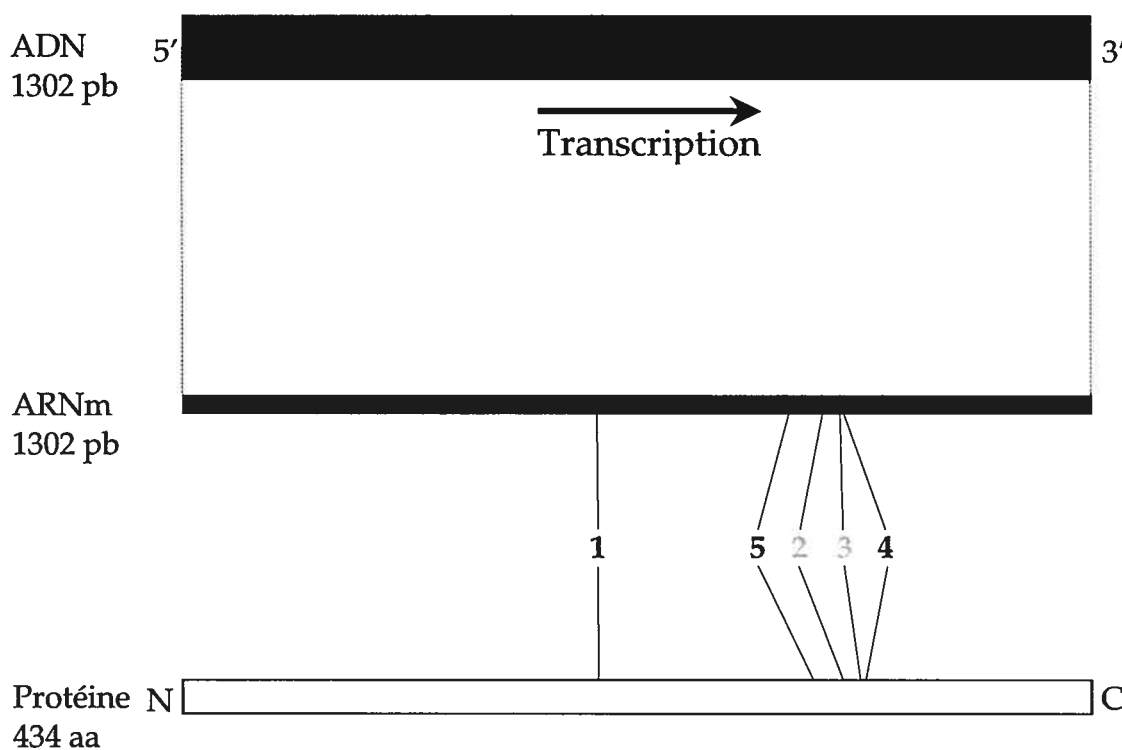


Figure 22 : Cinq mutations non-sens ont été décrites dans le gène *HSN2*. Les mutations canadienne-françaises sont représentées en gris. Mutation 1=c.594delA (fs après R198), mutation 2=c.918-919insA (fs après S307), mutation 3=c.943C→T (Q315X), mutation 4=c.947delC (fs après P316), mutation 5=c.868C→T (R290X).

Les trois mutations ont un impact semblable sur la protéine, il n'est donc pas surprenant de ne pas observer de différence phénotypique entre les porteurs homozygotes pour l'une des trois mutations et les hétérozygotes pour les mutations c.943C→T et c.918-919insA.

3. Quel est le rôle présumé de la protéine SETX ?

De même que pour *HSN2*, la fonction de la protéine SETX est inconnue. Cependant, une recherche de domaines conservés grâce au "Conserved domain database" (CDD) et une recherche d'homologie à l'aide du programme blastp v2.2.10 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) a permis d'identifier un domaine fonctionnel ainsi que des homologues protéiques

chez l'humain, d'autres mammifères et des espèces inférieures. Le programme CDD a prédit la présence d'un domaine hélicase dans la partie C-terminale de la protéine SETX (positions 1930 à 2500 environ, Figure 23). Ce domaine est caractéristique de la superfamille 1 des hélicases DextQ-box (Gorbalenya 1993). Le domaine hélicase des DextQ-box est caractérisé par la présence de huit motifs conservés: I, Ia, Ib, II, III, IV, V et VI (Gorbalenya 1993). On retrouve ces huit motifs dans la séquence protéique de SETX (Figures 23 et 24).



Figure 23 : Représentation linéaire de la protéine SETX complète (2677 aa). Le domaine hélicase est représenté par un cadre gris. Les huit motifs conservés sont numérotés et indiqués en bleu. Les deux séquences de localisation nucléaire sont représentées en jaune.

QLARAVLNPMPDFCTKDLLTTTSERIIAYLRDFNEDQKKAIEIAYAMVKHSPVAKI**CLIIHGPPGTGKS****KTIVGLIYR**LLLTENQRKGHSDENSNAKIKQ 2000
 Ib
 NR**VIVCAPSNAAVDE**LMKKIILEFFKECKDKKNPLGNCGDINLVRGLPEKINSSEVLKFSLDSQVNHHRMKKELPSHVQAMHKRKEFLDYQLDELSRQRAL 2100
 CRGGREIQRQELDENISKVSKERQELASKIKEVQGRPQKTQSIILLESIIICCTLSTSGLLLESFRGQGGVFPFSCVIV**DEAGQ**SCSEIETLTLPLIHRCN 2200
 III
 K**LLVGDPKQLPPIVTS**MKAQEYGYDQSMMARFCRLLEENVEHNMISRLPILQ**LTVQYR**MHPDI CLFP SNYYVNRNLKTNRQTEAIRCSSDWPFPYLVF 2300
 IV
 DVGDGSERRDNDSYINVQEI KLVMEI IKLIKDKRDKVSRNIGIITHYKAQKTMIQKDLKKEFDRKGPAAEVD**VVDAFQGRQDCVI**VT**CV**RANSIQGSIG 2400
 V
 FLASLQRLN**VTTTRAKV**SLFILGHLRITLMENQHWNQLIQDAQKRGAI IKTCDKNYRHDVAVKILKLPVLQORSLTHPPTTIAPEGSRPQGGLPSSKLLDSGFA 2500
 KTSVAASLYHTPSPDSKEITLTVTSKDPERPPVHDQLQDPRLKRMGIEVKGGIFLWDPQSSPQHPGATPPTGEPGFV**VH**QDL**SHIQ**PAAVVAALSSH 2600
 KPPV**R**GEPPAASPEASTCQSKCDDPEEELCHRREARAFSEGEQEKCGSETHHTRNSRWDKRTLEQEDSSSKKRKLL 2677

Figure 24 : Les huit motifs conservés de la famille des protéines DExxQ-box (Gorbalenya 1993) sont soulignés en gris, leur nom est indiqué au dessus. Le domaine hélicase est représenté par les résidus soulignés. Le résidu impliqué dans la mutation L1976R est doublement souligné dans le motif Ia.

Les motifs I et II, aussi appelés Walker A et Walker B, sont des sites de liaison et d'hydrolyse des nucléotides triphosphates ATP et GTP. Les motifs Ia, Ib, IV, V et VI lieraient l'ADN ou l'ARN et le motif III serait impliqué dans le déroulement de l'ADN ou de l'ARN. Le programme PROSITE (<http://au.expasy.org/prosite/>) a détecté la présence de deux séquences de localisation nucléaire (NLS), la première dans le domaine hélicase (positions 2070 à 2086) et la seconde à l'extrémité C-terminale (positions 2661 à 2677) (Figure 23). De plus, le programme PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>) a prédit une localisation nucléaire pour SETX avec une certitude de 60,9%. La protéine SETX serait donc localisée au niveau du noyau des cellules.

Une recherche avec le programme blastp v2.2.10 a permis d'identifier plusieurs homologues de SETX. Le domaine hélicase est homologue à celui de la protéine SEN1 chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* avec 28% et 30% d'identité respectivement. Cette homologie est à l'origine du nom *senataxin* (SETX) attribué au gène responsable de l'AOA2 (Moreira 2004). SEN1 est une ADN/ARN hélicase de la superfamille 1 des hélicases DextQ-box. Les parties les plus conservées correspondent aux emplacements des huit motifs spécifiques à cette famille d'hélicases. Chez la levure, SEN1 est une protéine essentielle au traitement de l'ARN ribosomal (ARNr), de transfert (ARNt) et des petits ARN nucléaires et nucléolaires (ARNsno). Elle est impliquée dans la maturation de ces différents types d'ARN (Ursic 1997). Il a déjà été montré qu'une seule substitution dans le domaine hélicase de SEN1 abolissait la fonction de la protéine (Ursic 1997).

SETX présente aussi une homologie au niveau du domaine hélicase avec la protéine RENT1 chez l'humain (28% d'identité), la souris (34% d'identité), le rat (35% d'identité), *Caenorhabditis elegans* (37% d'identité) et *Danio rerio* (34% d'identité). RENT1 et son homologue Upf1 chez la levure font aussi partie de

la superfamille 1 des hélicases DExxQ-box. RENT1 aurait un rôle dans un processus appelé NMD (Nonsense-mediated RNA decay) qui aurait pour fonction de protéger l'organisme en empêchant la traduction de peptides tronqués dominants négatifs ou ayant un gain de fonction délétère potentiel (Medghalchi 2001). Il semblerait également que RENT1 soit essentiel à la viabilité chez les mammifères (Medghalchi 2001). RENT1 pourrait aussi avoir, en plus de sa fonction de surveillance, d'autres fonctions qui ont été attribuées à Ufp1 chez la levure (Medghalchi 2001). À ce jour, aucune maladie n'a été associée à des mutations dans RENT1 chez l'humain.

SETX est aussi homologue à la protéine IGHMBP2 (CATF1) chez l'humain, la souris et le rat avec respectivement 25%, 24% et 26% d'identité au niveau du domaine hélicase. IGHMBP2 est un membre de la superfamille 1 des hélicases DExxQ-box. Des mutations récessives dans le gène *Ighmbp2* sont responsables de l'amyotrophie spinale diaphragmatique avec insuffisance respiratoire (SMARD1, MIM 604 320). SMARD1 est une maladie infantile touchant les motoneurones. Les patients présentent une faiblesse musculaire progressive ainsi qu'une détresse respiratoire due à une paralysie du diaphragme (Grohmann 2004). Le modèle murin *nmd* (neuromuscular degeneration) de SMARD1 développe un phénotype similaire (dégénérescence des motoneurones spinaux et faiblesse musculaire) et présente des mutations dans le gène *Catf1*, l'homologue d'*Ighmbp2* chez la souris (Grohmann 2004). La fonction d'IGHMBP2 dans le système nerveux périphérique est inconnu. Mais CATF1 a d'abord été décrit comme un activateur ou un répresseur transcriptionnel suggérant un rôle dans le métabolisme des ARN. Des défauts dans ce métabolisme seraient à l'origine de la dégénérescence des motoneurones qui est observée (Grohmann 2004).

SETX est également homologue à la protéine DNA2L chez l'humain, la souris et le rat avec 31% d'identité au niveau du domaine hélicase pour ces trois

espèces. DNA2L est une ADN hélicase de la famille des hélicases DNA2/NAM7 qui joue un rôle dans la réplication de l'ADN (Eki 1996).

L'homologie récurrente de SETX avec des hélicases et plus particulièrement de la superfamille 1 des hélicases DExxQ-box suggère fortement que SETX appartient à cette famille d'hélicases. Elle appartiendrait plus précisément à la sous-famille Sen1 like de la superfamille 1 (Gorbalenya 1993). Les ARN/ADN hélicases jouent des rôles importants dans la transcription, la traduction, la réparation de l'ADN, le métabolisme (épissage, export nucléaire, biosynthèse des ribosomes) et la surveillance des ARN. Les hélicases semblent fonctionner sous forme d'oligomères, généralement des dimères ou des hexamères (Korolev 1997). SETX pourrait donc être associée au maintien du cycle cellulaire, aux processus de réparation de l'ADN ou encore aux mécanismes de métabolisme des ARN et être active sous forme d'oligomère.

Le développement essentiellement normal et l'apparition de l'AOA2 à l'adolescence suggère que SETX est impliquée dans la survie neuronale. En effet, tous les patients présentent une atrophie cérébelleuse qui serait la conséquence d'une perte neuronale importante au niveau du cervelet ainsi qu'une faiblesse musculaire distale qui serait due à une perte de neurones moteurs. L'AOA2 partage des caractéristiques phénotypiques avec d'autres maladies neurodégénératives, ce qui nous amène à nous demander si des mécanismes physiopathologiques seraient partagés. Il a été montré que des défauts dans le métabolisme des ARN peuvent contribuer à la dégénérescence des motoneurones dans les amyotrophies spinales (SMA) (Grohmann 2004). De plus, l'ataxie télangiectasique, SCAN1 et AOA1 seraient la conséquence d'une déficience dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Taroni 2004).

On peut imaginer que si SETX joue un rôle dans les mécanismes de métabolisme et de surveillance des ARN ainsi que dans les processus de réparations à l'ADN, son dysfonctionnement entraînerait une accumulation d'ARN défectueux et de lésions à l'ADN qui ne seraient pas correctement réparées. Des mutations dans *SETX* perturberaient l'activité hélicase de la protéine ce qui empêcherait les neurones de produire des ARN matures et dépourvus d'erreurs et conduirait à une dégénérescence neuronale (Chen 2004).

4. Quelles sont les caractéristiques et l'impact biologique des différentes mutations dans l'AOA2 ?

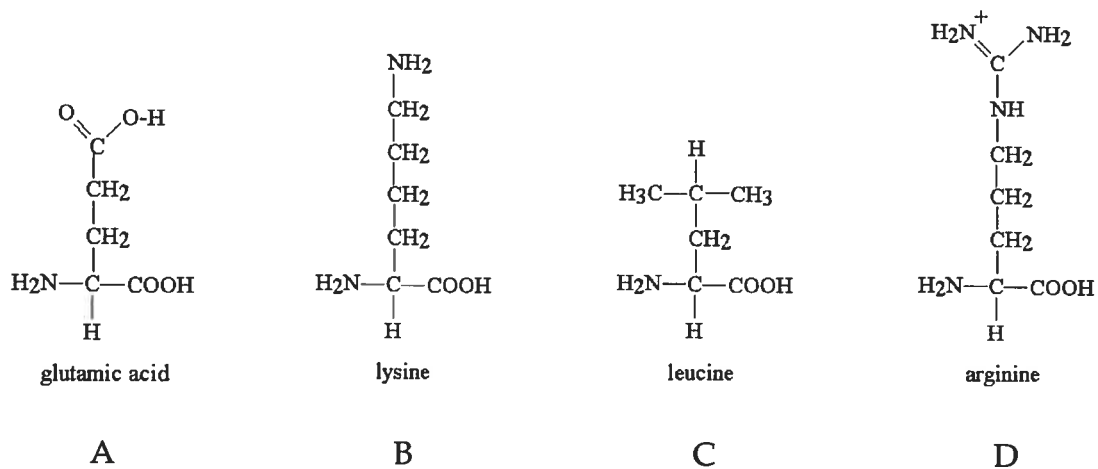
Dans le cas de l'AOA2, nous avons quatre mutations canadiennes-françaises dont deux non-sens (c.4087C→T et c.5070insT) qui conduisent à la synthèse de protéines tronquées de 1362 et 1698 aa respectivement au lieu de 2677 aa pour la protéine sauvage (Figure 12). Ces amputations représentent une perte de 49% et 37% respectivement et dans les deux cas on observe une perte totale du domaine hélicase de la molécule.

Les deux autres mutations sont des substitutions (E65K et L1976R).

La première, E65K, est due au changement d'un G pour un A au codon 195. Cette substitution est la plus fréquente pour les mutations faux sens (selon les statistiques de "The Human Gene Mutation Database" <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>). Le remplacement d'un acide glutamique pour une lysine est la 11^{ème} mutation la plus fréquente sur les 170 répertoriées et dans le cas de mutation de l'acide glutamique, c'est la mutation la plus courante après le non-sens (selon les statistiques de "The Human Gene Mutation Database"). L'acide glutamique est un acide aminé acide chargé négativement (Figure 23A) tandis que la lysine est un résidu basique chargé positivement dont la chaîne est plus longue que celle de l'acide glutamique (Figure 25B). Ces deux acides aminés ont donc des

propriétés très différentes, ce qui peut expliquer le caractère pathogénique de cette mutation. Le résidu 65 fait partie d'un domaine fortement conservé chez les mammifères et le poulet et il présente une identité de 100% chez sept espèces (Figure 26).

Figure 25 : Formule semi-développée plane de quatre acides aminés.



A.

Humain	PFLHEVLWLETTLLRLINHFESMKAEIGDDDELYIVDNNGEMPLFDITGQDFENKLRVPLLEILKYPYLLLHERV
Chimpanzé	PFLHEVLWLETTLLRLINHFESMKAEIGDDDDLYIVDNNGEMPLFDITGQDFENKLRVPLLEILKYPYLLLHERV
Souris	PFLHEVLWLETTLLRLVSHFESMKAEADDDDDLYIVDNNGEQLFDCSQDFENKLRVPLFEILKYPYLLLHERV
Rat	PFLHEVLWLETTLLRLISHFESMKAEADDDDELYIVDNNGEQLFDCSQDFENKLRVPLFEILKYPYLLLHERV
Vache	-----VLWLETTLLRLINHFERSMKAEIGDDDELYIVDNNGEAQLFDFTGQDFENKLRVPLLEILKYPYLLLHE--
Chien	PFLHEVLWLETTLLRLINHFESMKAEIGDDDELYIVDNNGEAQLFDFTGQDFENKLRVPLLEILKYPYLLLHERV
Poulet	PSLHQVLLLETTSLVAHIKSIRESAGEDELFIVDENGETQLPVYVGPDFENLRVPLLEVLKYPYLLLHEKV

R.

Humain	LTTTSERIIAYLRDFNEDQKKA IETAYMVKHSPSVAKI CLIHGPPGTGKSKTIIVG LLYRLLLTENQRKGHSDENS
Chimpanzé	LTTTSERIIAYLRDFNEDQKKA IETAYMVKHSPSVAKI CLIHGPPGTGKSKTIIVG LLYRLLLTENQRKGHSDENS
Souris	LTTTSERIIVAYLKD FNE DQKKA IETAYMVKHSPSVAKI CLIHGPPGTGKSKTIIVG LLYRLLLTENQRKGHSDEF
Rat	LTTTSERIIAYLKD FNE DQKKA IETAYMVKHSPSVAKI CLIHGPPGTGKSKTIIVG LLYRLLTESQRKGHSDEF
Vache	PTATSERIVAYLKD FNE DQKKA IETACAMVKHSPSVAKI CLIHGPPGTGKSKTIIVG LLYRLLLTENQRGYSDENS
Chien	LTTTSERIIVAYLRDFNEDQKKA IETAYMVKHSPSVAKI CLIHGPPGTGKSKTIIVG LLYRLLLTENQRKGHSDENS
Poulet	PVS-SESATFCMNEYNE DQKKA IETAYMVKHSPSVAKI CLIHGPPGTGKSKTIIVG LSRVLRRENTRENEKTSKK-
S. pombe	KHS-SSEIKAAMKRYQVNEPQAKAIMCALDNNG-----FTLIQPPPGTGKTKTIIGIISALLVDLSRYHIITRPNQ
S. cerevisiae	VNVDAAEIETVKKSYKLNTSQAEAI VNSVSKG-----FSLIQPPPGTGKTKTIILGIGYFLSTKNASSSNVIKV
A. thaliana	RSLPHSLQQILKSSFNESQLQAISVAIGSSNLMKAFD-ISLIIQPPPGTGKTRTIIVAVIISGLLASASHKTSDRGNS

Figure 26 : Alignements des séquences à l'aide du programme CLUSTALW (<http://au.expasy.org/>). (A) Pour la mutation E65K, les séquences utilisées sont: NP_055861 (ALS4, UCSC) pour l'humain, XP_520331 (NCBI) pour le chimpanzé, DDA01946 (TPA=tRNA splicing endonuclease regulator 1, NCBI) pour la souris, XP_342401 (NCBI) pour le rat, XP_610152 (NCBI) pour la vache, XP_537811 (NCBI) pour le chien et XP_415453 (NCBI) pour le poulet. (B) Pour la mutation L1976R, les séquences utilisées sont: NP_055861 (ALS4, UCSC) pour l'humain, XP_520331 (NCBI) pour le chimpanzé, DDA01946 (TPA=tRNA splicing endonuclease regulator 1, NCBI) pour la souris, XP_342401 (NCBI) pour le rat, XP_613997 (NCBI) pour la vache, XP_537811 (NCBI) pour le chien, XP_415453 (NCBI) pour le poulet, Sen1 (NCBI) pour *S. pombe*, AAB63976 (Sen1, NCBI) pour *S. cerevisiae*, et NP_173124 (tRNA splicing endonuclease positive effector-related, NCBI) pour *A. thaliana*. Les résidus d'acides aminés en rouge sont identiques à 100%, ceux en vert sont fortement conservés, ceux en bleu sont faiblement conservés et ceux en noir sont non-conservés.

La mutation L1976R est le fruit de la substitution 5927T→G. Ce changement de nucléotide n'est pas très fréquent (7^{ème} sur 12) (selon les statistiques de "The Human Gene Mutation Database"). Cependant, la substitution d'une leucine pour une arginine est le changement le plus courant pour ce résidu et représente la 30^{ème} mutation la plus fréquente sur les 170 connues (selon les statistiques de "The Human Gene Mutation Database"). La leucine est un acide aminé hydrophobe, non polaire et non chargé (Figure 25C) alors que l'arginine qui a une chaîne plus longue que la leucine est hydrophile, basique et chargée positivement (Figure 25D). Là encore, les deux résidus présentent des caractéristiques différentes ce qui expliquerait la pathogénicité de cette mutation. Tout comme l'acide aminé 65, le résidu 1976 fait partie d'un domaine conservé chez dix espèces (Figure 26). Ce résidu d'acide aminé est identique chez l'humain, le chimpanzé, la souris, le rat, le chien et le poulet. Et il est fortement conservé chez la vache, la levure et *Arabidopsis thaliana* où il est substitué par un résidu isoleucine (qui présente des caractéristiques très proches de celle de la leucine) (Figure 26).

La mutation E65K est localisée dans l'extrémité N-terminale de la protéine dans laquelle aucun domaine fonctionnel n'a pu être identifié. Au vu de son caractère pathogène, on peut penser que ce domaine est important pour le fonctionnement de la protéine. On peut proposer que les extrémités N- et C-terminales de la protéine interagissent et que cette interaction, qui serait compromise par la mutation E65K, serait nécessaire à la fonction du domaine hélicase de la protéine SETX. La mutation L1976R touche quant à elle directement le domaine hélicase de la molécule. Tout laisse croire que cet acide aminé est essentiel pour que ce domaine assure son rôle car sa modification entraîne une perte de fonction totale comparable à la perte physique du domaine.

La structure tridimensionnelle de SETX n'est pas connue. Cependant, la structure tridimensionnelle du domaine hélicase de la protéine homologue PcrA hélicase de *Bacillus stearothermophilus* a été déterminée (Velankar 1999). PcrA est un membre de la superfamille 1 des hélicases DExxQ-box (Petit 2002). Comme on peut le voir sur la figure 27 où nous avons identifié en couleur les huit motifs caractéristiques des hélicases DExxQ-box, ces motifs bien qu'éloignés dans la séquence, sont proches les uns des autres dans la structure tridimensionnelle, formant ainsi un domaine fonctionnel qui a une activité catalytique (Korolev 1997). La protéine SETX présente elle aussi ces huit motifs conservés (Figure 24). On peut donc penser que comme chez *Bacillus stearothermophilus* les huit motifs du domaine hélicase de SETX sont proches dans l'espace et forment aussi un domaine fonctionnel avec une activité catalytique.



Figure 27 : Structure tridimensionnelle du domaine hélicase de la protéine PcrA de la bactérie *Bacillus stearothermophilus*. La figure a été construite sous UNIX avec les logiciels MOLSCRIPT (Kraulis 1991) (<http://www.avatar.se/molscript/>) et RASTER 3D (Merritt 1997) (<http://www.bmsc.washington.edu/raster3d/raster3d.html>), à partir des fichiers de coordonnées 2PJR déposés dans la base de données "Protein Data Bank" (<http://www.rcsb.org/pdb/index.html>). Le motif I est représenté en bleu clair, le motif Ia en violet, le motif Ib en vert clair, le motif II en bleu foncé, le motif III en orange, le motif IV en vert foncé, le motif V en jaune et le motif VI en rose. Les résidus R44, H221 et C247 sont identifiés en rouge.

Un alignement de la séquence de SETX et de PcrA hélicase nous a permis de déterminer les acides aminés correspondant chez l'une et l'autre des protéines (Figure 28). Ainsi, le résidu L1976 correspondrait à l'acide aminé R44 dans la protéine PcrA. Grâce à une visualisation en 3-dimensions de la structure tridimensionnelle du domaine hélicase fournie dans l'article de Velankar (Velankar 1999), nous avons pu déterminer que les acides aminés les plus proches du résidu R44 dans l'espace sont H221 et C247. Ces trois

acides aminés sont hydrophiles et formeraient donc un site structural stable à caractère hydrophile (Figure 29A). Les résidus correspondant aux deux acides aminés proches dans SETX seraient I2179 et I2203 (Figure 28). Ces deux résidus et L1976 ont un caractère hydrophobe et constitueraient donc un site structural stable de type hydrophobe (Figure 29B). La mutation L1976R, change la leucine pour une arginine. Contrairement à la leucine, l'arginine est un acide aminé hydrophile dont la chaîne latérale est plus longue. L'arginine serait alors proche de deux résidus hydrophobes. Cette mutation pourrait déstabiliser le site hydrophobe d'origine, compromettre la structure du domaine fonctionnel composé par les huit motifs conservés et finalement empêcher le domaine hélicase de jouer son rôle.

SETX	1934	fNEDQKKAIEt ayamvkhspS-VAKICLIHGPPGTGKSKTIVGLYRLLTENQrkghsdensnakIKQNR-----VL	2004
PcrA	12	LKKEQQEAVR-----T-TEGPLLIMAGAGSGKTRVLTHTIAYLMAEKH-----VAPWN-----IL	60
gi 1723131	1	MNEQQKQAI-----C-GKGVNVVYSGAGTGKTTIITNRFAYLVNKEK-----VDPSR-----IL	49
gi 2688535	11	LNFQYQYAVT-----T-IEGALLIAGAGSGKTRVVTHTIAYLMLKG-----IAQRE-----IL	58
gi 4033461	3	LNFNQKNAIE-----L-INGPCLILAGAGSGKTKVIIINKIYLINNCQ-----YKPGN-----II	51
gi 2983362	3	LNTQQEAVR-----H-FGSPLLVAVAGAGSGKTKTLTKVYLYLKEKG-----LKYE-----IL	51
gi 1169572	2	AETIPLNPIT-----LpLNQISLIEASAGTGKTYTIGSLYLRLLKAG-----ENNFSrpln-veeIL	58
gi 119668	3	DVAETLPLR-----LpLQGERLIEASAGTGKTTIAALYLRLLLGLG-----SSAAPPpplveeLL	60
gi 8134452	2	SSFDFISPTA-----S-VSGKFFLEASAGTGKTTIEQVLRSLLEGS-----IEQTK-----IL	51
SETX	2005	VCAPSNAAVDELMKKIIEfkekeckdKX-----NPLGNG-----DInlv	2044
PcrA	61	AITFTNKAAREMRERVO-----S-----LLGGA-----A-----	84
gi 1723131	50	AITFTKKAAKEMQFRIL-----Klid-----ssLA-----	74
gi 2688535	59	ALTFTNKAANEMKDRIK-----K-----ILKSP-----L-----	82
gi 4033461	52	AVTFTNKAHEIKVRLA-----K-----HLNLlq-----I-----	76
gi 2983362	52	CITFTNKAKEIKERIK-----N-----TFG-----L-----	73
gi 1169572	59	VVTFTEATEELKKIR-----EritdankltafaktqdkAFKNDfetalcdlnlfeaihrklkaeqnM-----	126
gi 119668	61	VVTFTEAATALRGRIR-----Snihelria-----clrettdnPLYERlleiddkaga-----aqwlllaerqM-----	121
gi 8134452	52	VVTFNATNELKLRIQ-----Aslkqalsi-----fsqalshpGTPPLPpyisssetkvkq-----lymkirnslatL-----	114
SETX	2045	rlgpeksinSEVLKFSLDSqVNHMKKELPSHVA-----MhkRKEFLDYqIDELS-----	2095
PcrA	85	-----EDVWISTFHS-MCVIRLRDRIDRIG-----I-----NRNFSIL-----DPTD-----	120
gi 1723131	75	-----EKNITTYFHS-FCKFLIQLTKKRfiidd-----disyF-----LKEFLAD-----SKLDi-----	119
gi 2688535	83	-----SNLMVSTFHA-FGLYFLKENYKLLG-----Y-----RKNFSIY-----DDND-----	118
gi 4033461	77	-----KKMIISTFHS-LGLEIKKEINTLK-----F-----NSNFSIA-----DERD-----	112
gi 2983362	74	-----ELEWSGTFSH-VALKILKDKGEIKG-----I-----PKDFSA-----DEKD-----	109
gi 1169572	127	-----DLAAYTYING-FCRRMLMAYAFHSgihfnlelikdq-sdlivraneFw-----REHFYPL-----DFESanfiate	191
gi 119668	122	-----DEAAVFTING-FCQRMNLNFAFESmlfeqgliedesllygacacdfwr-----RHICYPLP-----REIAqvvetw	187
gi 8134452	115	-----DEMNIPTING-FCRFTLEQHPFPIQpiqpsifse-----pqiqqhildY-----LRKQWD-----TVLSpkqyafI	177
SETX	2096	-----RQRALcRGRE-----IQRQELDEHI-SKVS-----	2120
PcrA	121	-----QLSVM-KTIL-----KE-KNIDPKKFEPR-----	142
gi 1723131	120	-----HLAKQI-IDNFK-----NTFADFEIINKLDQDer-----l-----	147
gi 2688535	119	-----RISLL-KEIL-----LD-EGLFNKVSLN-----	140
gi 4033461	113	-----QMMLL-KKICs-----KS-IKNDTKLLK-----	133
gi 2983362	110	-----TTLIV-KEILk-----KYGLKKEPEE-----	129
gi 1169572	192	-----lvspanVLSLL-KADLg-----kDLqVEIENKQALSVpiqilpqqlyggyqkal-----nelkafwlesadeisa	255
gi 119668	188	kgpgallrdinrYLOGE-APVikappPDDTLASRHAQIVaridvtvkqwrдавгeldaliessgidrrkfnrnsqakwi	266
gi 8134452	178	s-----yhhrrattqQTRHL-IERLL-----QDyTSTPNLALSPLsitlqklkawvs-----ryqhlapisl	232
SETX	2121	KERQELASKIKEVQGRPQKTS-----I-IILESH-----	2149
PcrA	143	-TILGTISAAKHELPEQFAK-----RASTYYEKVSDVYQEQQLRLNRHS-----	189
gi 1723131	148	I-SLCEHSLLLKDEEYSTLKTQ-----LINAFLSYEKNKILNNK-----	185
gi 2688535	141	-SLSNVISLLKNGI LTLMDLKE-----EDINIYRLYEERLRLYNS-----	179
gi 4033461	134	-KLVFMISFWKKNFLTPLQ-VQl-----SAQSNLEKDFAPYKQYTFHLRKSNI-----	180
gi 2983362	130	--VKEKISKVKENFEEPEANLG-----VLLEEYQRVLRNKL-----	164
gi 1169572	256	iITNELVKDYPKDQLKSLNRKKyqvkrlgdwinkingWSNNPRDYQINTTLKDYFLQSSIEKNCeestdknkdkkptf	335
gi 119668	267	dKISAWAEEETNSYQLPESLEKfsgfrl-----edrtckaGGETPRHPLFEAIDQLLAEPLSIRDlvitalaeiretvarek	343
gi 8134452	233	eEMQAFSLRFKQSDLSIERELPaf-----vqQFETNPYSLDMLFPFGMQKQOEENRnkklisap-----asp	295
SETX	2150	-----ICCTL-----STSG-----GLLLESAFRGQgg	2172
PcrA	190	-----LDFDDLIMTTIQ-----LFDR-----VPDLVHYQYK--	216
gi 1723131	186	-----LDFHDLIKTCNl-----LSND-----NDLLNQNSEQ--	212
gi 2688535	180	-----FDFDDLILKPKE-----LLSN-----NSDIRNKYSKR--	206
gi 4033461	181	-----LDFDDLI-CIPTS-----LKN-----NQIQNRWQKK--	207
gi 2983362	165	-----LDFSDLMRELYN-----LLLv-----DEVREKYRNT--	190
gi 1169572	336	yspifADLEKRVNALMTpdllskltlyhyrqglqkklldyklnhqksfddLLRLlceal-----qdaqGDELAEIRFQ--	410
gi 119668	344	rrrgeLGFDDMLSRDLS-----ALRSe-----sGEVLAARIRTR--	377
gi 8134452	296	ldpffQDWIQLAHPFCQkepihfhtllksv-----qqhltkcaqsYSHDesiatlesl1ahndTVVSQLRKQ--	362
SETX	2173	vpFSCVIVDEAGQS--CEIETLPLIHRCKN-----LVLVGDPKQlpptvismkageydgqsmmarfcrllleenvehnmi	2246
PcrA	217	--FQYIILDEYQDTNRAQYTLVKLAERFQN-----ILAVGDADQS IYRWGADIQNILSFERDYPN--AKVILLEQNYRS	288
gi 1723131	213	--FQHILVDEFQDTNQIQYELIKMLVTknc-----nLFLVGDNNQMIYRWGAVNGIITALKHDFNVpknsEFFIINQNYRC	286
gi 2688535	207	--YKYVILDEFQDTS LIQYNFIRLLINHSn-----nLCCVGDQDQSIYSWRGANYNMQLQEKDYD--VKEIKLEQNYRS	276
gi 4033461	208	--ISYLLVDEYQDTNNSQYELIKMLTNVNSN-----FTLVGDQDQSIYSWRGAKPNLFLIKKDFPN--LKIIMEQNYRS	279
gi 2983362	191	--FKYIMVDEYQDTNNIQYELIKLLANKV-----ICAIGDPNQC IYEWDRARPNILRFIEDFNP--KIIKLELNYRS	259
gi 1169572	411	--YPFAMIDEFQDTSQYAI FSKIYRDNPekntg FIMIGDPKQAIYFRGADIFTYLKASDEAQS--RFELTKNYRS	484
gi 119668	378	--FPVAMIDEFQDTPQYRIFRRIWHHQPET--aLLLIGDPKQAIYAFRGADIFTYMKARSEVH--AHYTLDTNWRs	449
gi 8134452	363	--FQLVLIDEFQDTRKQWQIFSKLFAFDPYsg-sLFLIGDPKQSIYEWARNADLPTYLQAKHSFp--KEAQLILDTNYRS	437

Figure 28: Alignement des séquences du domaine hélicase des protéines SETX, PcrA, gi 1723131, gi 2688535, gi 4033461, gi 2983362, gi 1169572, gi 119668 et gi 8134452 selon le "Conserved domain database" (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les résidus L1976, I2179 et I2203 de la protéine SETX ainsi que les résidus R44, H221 et C247 de la protéine PcrA sont surlignés.

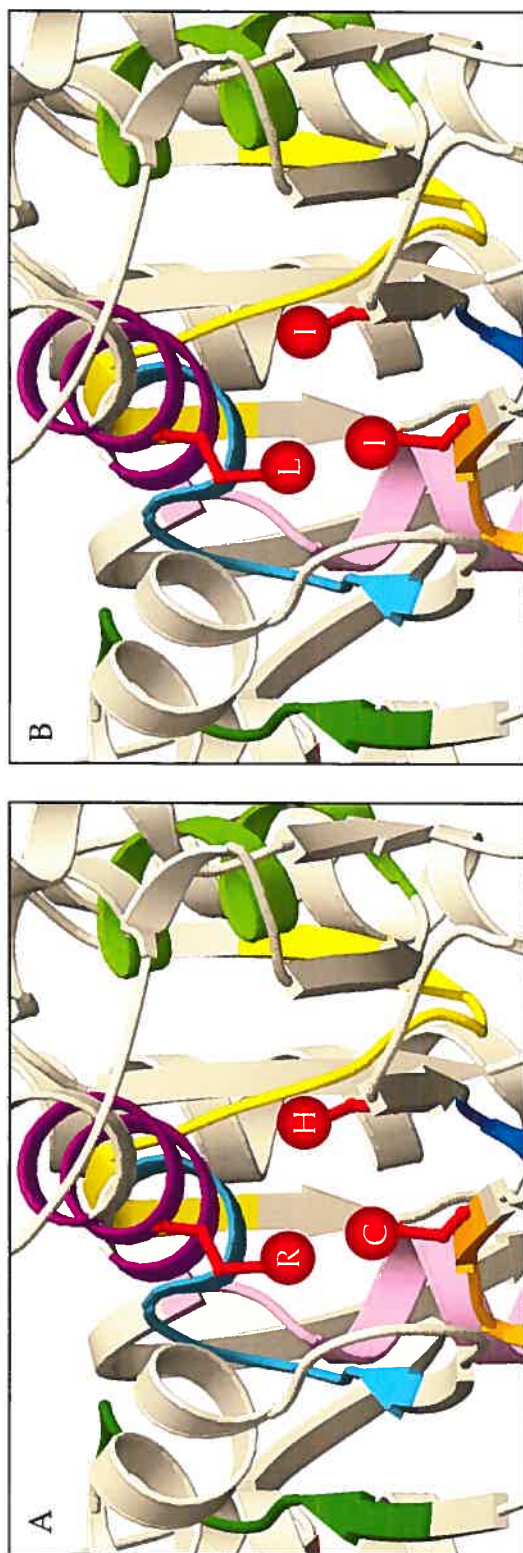


Figure 29 : Vue rapprochée du domaine hélicase de la protéine PcrA de la bactérie *Bacillus stearothermophilus*. (A) Vue rapprochée de la partie encadrée de la figure 27. Les résidus R44, H221 et C247 sont identifiés en rouge. (B) Même vue que (A) où les résidus R44, H221 et C247 ont été respectivement remplacés par L1976, I2179 et I2203 selon l'alignement donné par le "Conserved domain database" (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de la figure 28. Le code de couleur pour les huit motifs est le même que celui de la figure 27.

Malgré la diversité des quatre mutations identifiées dans le gène *SETX*, il ne semble pas y avoir de différence phénotypique quel que soit le génotype. Ceci pourrait être expliqué par le fait que tous les individus atteints de notre cohorte sont soit homozygotes pour la mutation L1976R ou hétérozygotes pour cette substitution et que la mutation L1976R causerait une perte de fonction totale de la protéine SETX. Ainsi, chez les atteints, le fait de porter cette mutation, de manière homozygote ou hétérozygote, abolirait la fonction des oligomères et donnerait le même phénotype. Il semblerait donc que les substitutions E65K et L1976R touchent des domaines très importants pour la fonction de la protéine à tel point que l'impact est équivalent à la perte physique du domaine hélicase.

À ce jour, 20 mutations distinctes ont été rapportées dans le gène *SETX* (Table XV). Ces mutations sont distribuées sur toute la séquence protéique (Figure 30).

Table XV : Vingt mutations ont été décrites dans le gène *SETX*.

Mutation	Maladie	Origine géographique	Changement de nucléotide	Changement de résidu	Statut
1	AOA2 ¹	Algérie	2602C→T	Q868X	Homozygote
2	AOA2 ¹	Algérie	915G→T	W305C	Homozygote
3	AOA2 ¹	Canada, Québec	5070insT	Fs après I1690	Homozygote (Québec hétérozygote)
4	AOA2 ¹	Vietnam	2622-2625delAGTT	Fs après L874	Homozygote
5	AOA2 ¹	France	994C→T	R332W	Hétérozygote
6	AOA2 ¹	France	2966-2970delGGAAA	Fs après Q988	Hétérozygote
7	AOA2 ¹	France	5264delC	Fs après N1754	Hétérozygote
8	AOA2 ¹	Cap Vert, Portugal, Espagne, Québec	4087C→T	R1363X	Homozygote (Québec hétérozygote)
9	AOA2 ¹	Turquie	5249insT	Fs après L1750	Homozygote
10	AOA2 ¹	Japon	4321C→T	Q1441X	Homozygote
11	AOA2 ¹	Japon	6638C→T	P2213L	Homozygote
12	AOA2 ¹	Pakistan	2332C→T	R788X	Homozygote
13	AOA2 ¹	Tunisie	1238C→T	P413L	Homozygote
14	AOA2 ¹	Royaume-Uni	879delT	Fs après C292	Hétérozygote
15	AOA2 ¹	Royaume-Uni	5267T→C	F1756S	Hétérozygote
16	AOA2	Québec	193G→A	E65K	Hétérozygote
17	AOA2	Québec	5927T→G	L1976R	Homozygote/hétérozygote
18	SLA4 ²	Etats-Unis	8C→T	T3I	Hétérozygote
19	SLA4 ²	Belgique	1166T→C	L389S	Hétérozygote
20	SLA4 ²	Autriche	6407G→A	R2136H	Hétérozygote

¹D'après Moreira *et al.* (Moreira 2004), ²d'après Chen *et al.* (Chen 2004), Fs=changement de cadre de lecture, rouge=mutation canadienne-française.

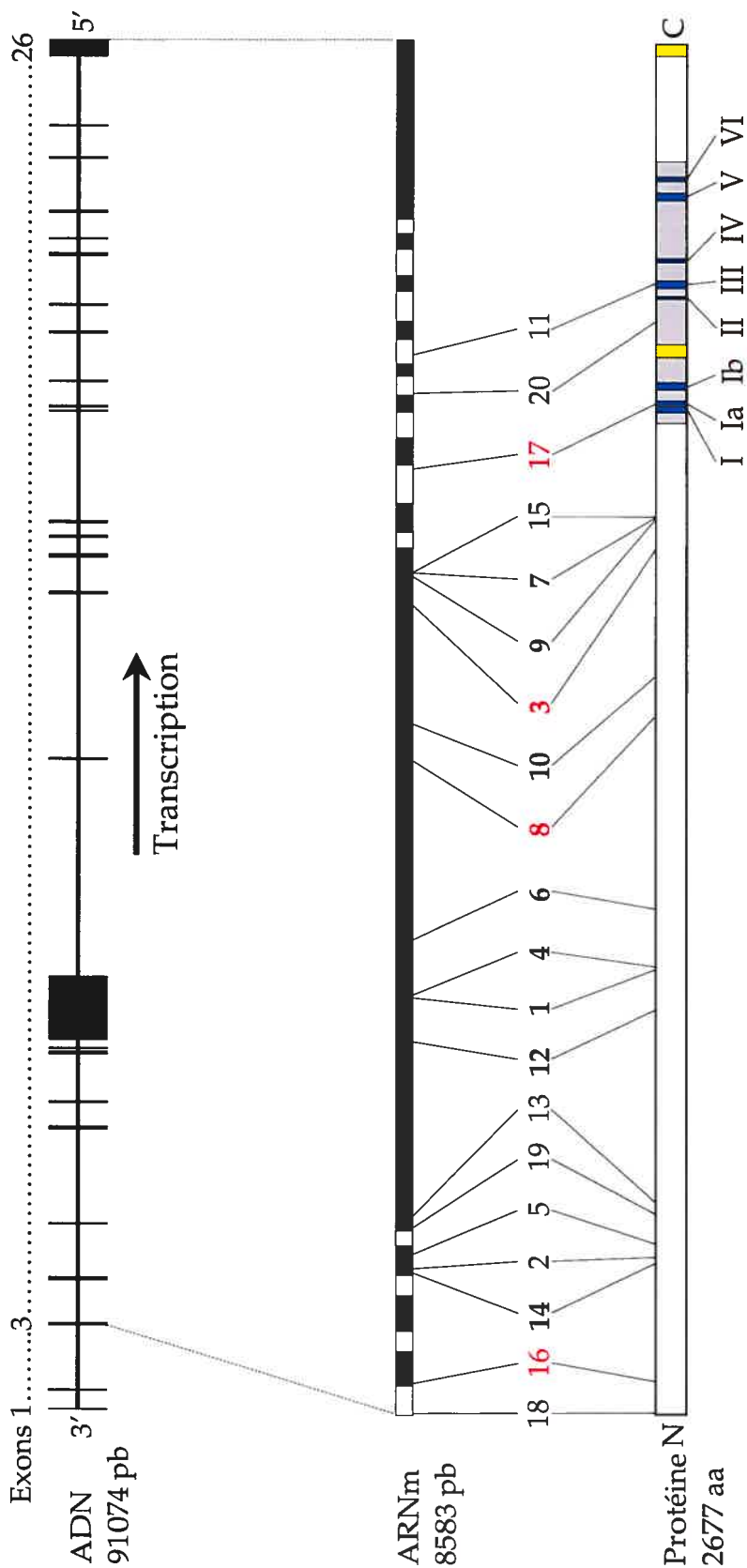


Figure 30 : Vingt mutations ont été décrites dans le gène *SETX*. Les mutations canadiennes-françaises sont représentées en gras. Les mutations responsables de la SLA4 sont identifiées en vert. Les mutations non-sens sont en gras. La numérotation des mutations est identique à celle de la table XV. Dans la protéine, les huit motifs conservés sont numérotés et indiqués en bleu et les deux séquences de localisation nucléaire sont représentées en jaune.

Sur les 15 mutations décrites dans la cohorte internationale de Moreira *et al.* (Moreira 2004), dix tronquent la protéine et entraînent la perte du domaine hélicase. Ces dix mutations sont très certainement à l'origine d'une perte de fonction de SETX. Les cinq autres mutations (3, 5, 11, 13 et 15) sont des substitutions. Seule la mutation 11 (P213L) touche le domaine hélicase de la protéine et serait plus précisément située dans le motif III. Les quatre autres sont localisées dans des parties de la protéine où aucun domaine fonctionnel n'a pu être identifié. D'après le tableau clinique fourni dans l'article de Moreira *et al.* (Moreira 2004), il ne semble pas y avoir de corrélation entre le type de mutation portée et le phénotype présenté par les patients. Cependant, le nombre de cas pour chaque mutation est très restreint et ne permet pas une comparaison significative. Il semble tout de même que la fonction de SETX soit suffisamment importante pour qu'une simple substitution abolisse son activité cellulaire avec le même impact qu'une mutation troncatrice.

Trois substitutions ont aussi été rapportées dans SETX comme étant responsables de la SLA4 (sclérose latérale amyotrophique de type 4) (Chen 2004).

La SLA4 est une maladie neurodégénérative autosomique dominante juvénile (Chance 1998). Le début de la maladie est variable selon les familles étudiées. Les premiers symptômes sont apparus avant l'âge de six ans pour les familles CMT-61 et CMT-106 (Chen 2004) et au cours de la deuxième décennie de vie (17 ans en moyenne) pour la grande famille K7000 du Maryland (Chance 1998). Cette affection est caractérisée par une faiblesse et une atrophie musculaire progressive des muscles squelettiques des membres supérieurs et inférieurs dues à une dégénérescence sélective des motoneurons (Rabin 1999). Certaines caractéristiques cliniques sont communes avec celles que l'on observe dans l'AOA2, telles que l'amyotrophie et la faiblesse musculaire. Une difficulté à marcher a été rapportée chez des patients de la famille K7000

(Rabin 1999). Cependant, les différences cliniques sont plus nombreuses. Entre autres la grande majorité des patients atteints de SLA4 ne présentent pas de perte de sensibilité. Ces patients n'ont pas de signes d'affection cérébelleuse tel qu'un nystagmus ou une atrophie. Aucune élévation du taux d'AFP n'a été rapportée. Les signes cliniques et le mode de transmission sont donc différents entre la SLA4 et l'AOA2.

Les mutations rapportées pour la SLA4 sont toutes des substitutions (Chen 2004). Une seule est localisée dans le domaine hélicase de la protéine, mais ne touche pas une séquence conservée de ce domaine. Les deux autres mutations sont situées dans la partie N-terminale de la protéine dont on ne connaît pas la fonction (Chen 2004). Les mutations de la SLA4 ne causeraient pas une perte complète de l'activité, mais soit une perte partielle de fonction, un gain de fonction toxique ou induiraient la formation d'un dominant négatif qui abolirait la fonction de la protéine sauvage (Chen 2004).

Nous avons mentionné que les hélicases semblent actives sous forme d'oligomère (Korolev 1997). Ainsi trois type d'oligomères pourraient coexister chez les patients atteints de SLA4. Un premier type serait constitué uniquement de monomères sauvages dont l'activité serait normale. Un deuxième type serait formé seulement de monomères mutés dont l'activité serait soit partielle, soit nulle. Finalement, un troisième type qui serait le plus abondant serait constitué à la fois de monomères sauvages et mutés. L'activité de tels oligomères serait soit partielle si la mutation entraînait une perte de fonction incomplète, ou nulle si la mutation induit la synthèse d'un dominant négatif ou un gain de fonction toxique. Ainsi une faible proportion des oligomères assureraient une activité catalytique ce qui expliquerait les différences cliniques observées et le mode de transmission dominant.

C. Conclusion et perspectives

Un peu plus près du but.

La découverte et l'étude de ces deux nouveaux effets fondateurs au Québec est une première étape franchie vers une thérapie pour ces deux maladies. La description clinique et génétique que nous en avons fait concourent à une meilleure connaissance et à une meilleure compréhension pathologique de ces deux affections. Nous espérons que la disponibilité d'un test génétique puisse permettre un meilleur diagnostic des patients et puisse répondre aux interrogations de leurs familles. Nous souhaitons également qu'un tel dépistage vienne en aide aux couples à risque afin de mieux les conseiller et les soutenir. Dans l'attente de voir ces maladies disparaître, nous espérons que des études fonctionnelles futures conduisent à l'élaboration d'une thérapie pour les patients souffrant de ces maladies neurodégénératives. Une meilleure connaissance de la physiopathologie de ces maladies associée à un diagnostic génétique permettra de mieux comprendre ces maladies rares pour mieux les soigner.

Pour la NHSA2 comme pour l'AOA2, il serait utile de mettre en place un programme d'information, de dépistage et de conseil génétique pour les populations à risque. Pour les deux maladies, une étude généalogique des familles permettrait de dater et de déterminer l'origine géographique des mutations et d'identifier les fondateurs ayant introduit chacune d'elles. Un dépistage génétique systématique de tous les cas présentant un phénotype similaire à la NHSA2 ou à l'AOA2 pourrait mener à l'identification de nouvelles mutations dans les gènes *HSN2* et *SETX*.

Dans le cas de la NHSA2 comme de l'AOA2, le rôle de la protéine impliquée est inconnu. Plusieurs études permettraient de démystifier leurs fonctions. Des hybridations *in situ* de type "whole mount" sur des embryons de souris viseraient à établir le profil d'expression des deux protéines au cours du développement et au stade post-natal. Des hybridations *in situ* sur des coupes de tissus adultes permettraient également de déterminer le profil d'expression de HSN2 et de SETX à l'âge adulte.

Le développement d'un anticorps permettrait de procéder à une étude d'expression dont le but serait de déterminer la localisation subcellulaire des deux protéines dans les lignées cellulaires exprimant le plus HSN2 et SETX. Les anticorps produits pourraient aussi permettre de voir si la protéine, même tronquée, est présente ou non dans des lignées cellulaires de patients atteints de NHSA2 ou d'AOA2.

Dans le cas de l'AOA2, SETX est présumée être une hélicase. Plusieurs essais d'activité hélicase ont été décrits dans la littérature (Uhlmann-Schiffler 2002; Artsaenko 2003; Dziembowski 2003) et de telles expériences menées avec la protéine sauvage et des protéines tronquées ou portant une substitution permettraient d'évaluer l'incidence de chaque mutation sur l'activité catalytique de SETX.

De plus, la détermination de la structure tridimensionnelle du domaine hélicase de SETX ainsi que de son domaine N-terminal pourrait fournir de précieuses informations sur la fonction de ces domaines ainsi que sur la pathophysiologie des mutations.



BIBLIOGRAPHIE

- Abecasis G.R., Cherny S.S., Cookson W.O. and Cardon L.R. (2002). "Merlin-rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees." *Nat Genet* 30(1): 97-101.
- Aicardi J., Barbosa C., Andermann E. *et al.* (1988). "Ataxia-ocular motor apraxia: a syndrome mimicking ataxia-telangiectasia." *Ann Neurol* 24(4): 497-502.
- Alain P. (2003). Une Gaspésie Moderne bâtie par de multiples ethnies. *Magazine Gaspésie*. 39: 8.
- Andermann F., Andermann E., Joubert M. *et al.* (1972). "Familial agenesis of the corpus callosum with anterior horn cell disease. A syndrome of mental retardation, areflexia, and paraplegia." *Trans Am Neurol. Assoc* 97: 242-244.
- Anderson S.L., Coli R., Daly I.W. *et al.* (2001). "Familial dysautonomia is caused by mutations of the IKAP gene." *Am J Hum Genet* 68(3): 753-758.
- Artsaenko O., Tessmann K., Sack M. *et al.* (2003). "Abrogation of hepatitis C virus NS3 helicase enzymatic activity by recombinant human antibodies." *J Gen Virol* 84(Pt 9): 2323-2332.
- Barbot C., Coutinho P., Choraó R. *et al.* (2001). "Recessive ataxia with ocular apraxia: review of 22 Portuguese patients." *Arch Neurol* 58(2): 201-205.
- Bejaoui K., Uchida Y., Yasuda S. *et al.* (2002). "Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis." *J Clin Invest* 110(9): 1301-1308.
- Bejaoui K., Wu C., Scheffler M.D. *et al.* (2001). "SPTLC1 is mutated in hereditary sensory neuropathy, type 1." *Nat Genet* 27(3): 261-262.
- Bennett C.L., Shirk A.J., Huynh H.M. *et al.* (2004). "SIMPLE mutation in demyelinating neuropathy and distribution in sciatic nerve." *Ann Neurol* 55(5): 713-720.
- Blumenfeld A., Slaugenhaupt S.A., Axelrod F.B. *et al.* (1993). "Localization of the gene for familial dysautonomia on chromosome 9 and definition of the DNA markers for genetic diagnosis." *Nat Genet* 4: 160-163.
- Blumenfeld A., Slaugenhaupt S.A., Liebert C.B. *et al.* (1999). "Precise genetic mapping and haplotype analysis of the familial dysautonomia gene on human chromosome 9q31." *Am J Hum Genet* 64: 1110-1118.

Bockers M., Benes P. and Bork K. (1989). "Persistent skin ulcers, mutilations, and acro-osteolysis in hereditary sensory and autonomic neuropathy with phospholipid excretion. Report of a family." *J Am Acad Dermatol* 21(4 Pt 1): 736-739.

Bodzioch M., Lapicka K., Aslanidis C. *et al.* (2001). "Two novel mutant alleles of the gene encoding neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 (NTRK1) in a patient with congenital insensitivity to pain with anhidrosis: a splice junction mutation in intron 5 and cluster of four mutations in exon 15." *Hum Mutat* 17(1): 72.

Bomont P., Watanabe M., Gershoni-Barush R. *et al.* (2000). "Homozygosity mapping of spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy and peripheral neuropathy to 9q33-34, and with hearing impairment and optic atrophy to 6p21-23." *Eur J Hum Genet* 8(12): 986-990.

Bouchard G. and De Braekeleer M., Eds. (1990). *Histoire d'un génome*. Québec, Presses de l'Université du Québec.

Bouchard J., Bedard P. and Bouchard R. (1980). "Study of a family with progressive ataxia, tremor and severe distal amyotrophy." *Canadian Journal of Neurol Sci* 7(4): 345-349.

Bouchard J.P., Barbeau A., Bouchard R. and Bouchard R.W. (1978). "Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay." *Can J Neurol Sci* 5(1): 61-69.

Bourgeois S. and Labuda D. (2004). "Dynamic allele-specific oligonucleotide hybridization on solid support." *Anal Biochem* 324(2): 309-311.

Brais B., Bouchard J.-P., Xie Y.-G. *et al.* (1998). "Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy." *Nat Genet* 18(2): 164-167.

Buzin C.H., Gatti R.A., Nguyen V.Q. *et al.* (2003). "Comprehensive scanning of the ATM gene with DOVAM-S." *Hum Mutat* 21(2): 123-31.

Campuzano V., Montermini L., Molto M.D. *et al.* (1996). "Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion." *Science* 271(5254): 1423-1427.

Chance P.F., Rabin B.A., Ryan S.G. *et al.* (1998). "Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34." *Am J Hum Genet* 62(3): 633-640.

Chen Y.Z., Bennett C.L., Huynh H.M. *et al.* (2004). "DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4)." *Am J Hum Genet* 74(6): 1128-1135.

Cohen L., Henzel W.J. and Baeuerle P.A. (1998). "IKAP is a scaffold protein of the I κ B kinase complex." *Nature* 395(6699): 292-296.

Criscuolo C., Banfi S., Orio M. *et al.* (2004). "A novel mutation in SACS gene in a family from southern Italy." *Neurology* 62(1): 100-102.

Date H., Onodera O., Tanaka H. *et al.* (2001). "Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene." *Nat Genet* 29(2): 184-188.

Dawkins J.L., Brahmhatt S., Auer-Grumbach M. *et al.* (2002). "Exclusion of serine palmitoyltransferase long chain base subunit 2 (SPTLC2) as a common cause for hereditary sensory neuropathy." *Neuromuscul Disord* 12(7-8): 656-658.

Dawkins J.L., Hulme D.J., Brahmhatt S.B. *et al.* (2001). "Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I." *Nat Genet* 27(3): 309-312.

De Braekeleer M., Giasson F., Mathieu J. *et al.* (1993). "Genetic epidemiology of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay in northeastern Quebec." *Genet Epidemiol* 10(1): 17-25.

de Graaf A.S., de Jong G. and Kleijer W.J. (1995). "An early-onset recessive cerebellar disorder with distal amyotrophy and, in two patients, gross myoclonia: a probable ataxia telangiectasia variant." *Clin Neurol Neurosurg* 97(1): 1-7.

Delague V., Bareil C., Bouvagnet P. *et al.* (2002). "A new autosomal recessive non-progressive congenital cerebellar ataxia associated with mental retardation, optic atrophy, and skin abnormalities (CAMOS) maps to chromosome 15q24-q26 in a large consanguineous Lebanese Druze Family." *Neurogenetics* 4(1): 23-7.

Delatycki M.B., Knight M., Koenig M. *et al.* (1999). "G130V, a common FRDA point mutation, appears to have arisen from a common founder." *Hum Genet* 105(4): 343-6.

Duquette A., Roddier K., McNabb-Baltar J. *et al.* (2005). "Mutations in senataxin responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy." *Ann Neurol* 57(3): 408-414.

Dyck P.J. (1966). "Histologic measurements and fine structure of biopsied sural nerve: normal, and in peroneal muscular atrophy, hypertrophic neuropathy, and congenital sensory neuropathy." *Mayo Clin Proc* 41(11): 742-774.

Dyck P.J. (1993). Neuronal atrophy and degeneration predominantly affecting peripheral sensory and autonomic neurons. Peripheral neuropathy. Dyck P.J. and Thomas P.K. Philadelphia, W.B. Saunders Company. 2: 1065-1093.

Dyck P.J., Mellinger J.F., Reagan T.J. *et al.* (1983). "Not "indifference to pain "but varieties of hereditary sensory and dysautonomic neuropathy." *Brain* 106(Pt 2): 373-390.

Dziembowski A., Piwowarski J., Hoser R. *et al.* (2003). "The yeast mitochondrial degradosome. Its composition, interplay between RNA helicase and RNase activities and the role in mitochondrial RNA metabolism." *J Biol Chem* 278(3): 1603-1611.

Einarsdottir E., Carlsson A., Minde J. *et al.* (2004). "A mutation in the nerve growth factor beta gene (NGFB) causes loss of pain perception." *Hum Mol Genet* 13(8): 799-805.

Eki T., Okumura K., Shiratori A. *et al.* (1996). "Assignment of the closest human homologue (DNA2L:KIAA0083) of the yeast Dna2 helicase gene to chromosome band 10q21.3-q22.1." *Genomics* 37(3): 408-410.

El Euch-Fayache G., Lalani I., Amouri R. *et al.* (2003). "Phenotypic features and genetic findings in saccin-related autosomal recessive ataxia in Tunisia." *Arch Neurol* 60(7): 982-988.

Engert J.C., Berube P., Mercier J. *et al.* (2000). "ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF." *Nat Genet* 24(2): 120-125.

Ervin F.R. and Sternbach R.A. (1960). "Hereditary insensitivity to pain." *Trans Am Neurol Assoc* 86: 70-74.

Frenette Y. (1996). Les Anglo-Normands dans l'est du Canada. Ottawa, La société historique du Canada.

Gagnon A., Vézina H. and Brais B. (2001). "Histoire démographique et génétique du Québec." *Pour la Science* 287: 62-69.

Gatti R.A. (2001). "The inherited basis of human radiosensitivity." *Acta Oncol* 40(6): 702-11.

- Gatti R.A., Berkel I., Boder E. *et al.* (1988). "Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23." *Nature* 336(6199): 577-580.
- Gatti R.A., Peterson K.L., Novak J. *et al.* (1993). "Prenatal genotyping of ataxia-telangiectasia." *Lancet* 342(8867): 376.
- Giaccai L. (1952). "Familial and sporadic neurogenic acro-osteolysis." *Acta Radiol* 38(1): 17-29.
- Gorbalenya A.E. and Kooninb E.V. (1993). "Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships." *Curr Opin Struct Biol* 3(3): 419-429.
- Greco A., Villa R., Tubino B. *et al.* (1999). "A novel NTRK1 mutation associated with congenital insensitivity to pain with anhidrosis." *Am J Hum Genet* 64(4): 1207-1210.
- Grieco G.S., Malandrini A., Comanducci G. *et al.* (2004). "Novel SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay type." *Neurology* 62(1): 103-106.
- Grohmann K., Rossoll W., Kobsar I. *et al.* (2004). "Characterization of Ighmbp2 in motor neurons and implications for the pathomechanism in a mouse model of human spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1)." *Hum Mol Genet* 13(18): 2031-2042.
- Gudbjartsson D.F., Jonasson K., Frigge M.L. and Kong A. (2000). "Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis." *Nat Genet* 25(1): 12-13.
- Haddow J.E., Shapiro S.R. and Gall D.G. (1970). "Congenital sensory neuropathy in siblings." *Pediatrics* 45(4): 651-655.
- Hara K., Onodera O., Endo M. *et al.* (2005). "Sacsin-related autosomal recessive ataxia without prominent retinal myelinated fibers in Japan." *Mov Disord* 20(3): 380-382.
- Harding A.E. (1983). "Classification of the hereditary ataxias and paraplegias." *Lancet I*: 1151-1155.
- Heller I.H. and Robb P. (1955). "Hereditary sensory neuropathy." *Neurology* 5(1): 15-24.
- Hicks E.P. (1922). "Hereditary perforating ulcer of the foot." *Lancet* 1: 319-321.

- Hould F. and Verret S. (1967). "Neuropathie radriculaire héréditaire avec pertes de sensibilité: étude d'une famille canadienne-française." *Laval Médical* 38: 454-459.
- Howard H.C., Mount D.B., Rochefort D. *et al.* (2002). "The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum." *Nat Genet* 32(3): 384-392.
- Indo Y. (2001). "Molecular basis of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): mutations and polymorphisms in TRKA (NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor." *Hum Mutat* 18(6): 462-471.
- Indo Y., Tsuruta M., Hayashida Y. *et al.* (1996). "Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis." *Nat Genet* 13(4): 485-488.
- Izatt L., Nemeth A.H., Meesaq A. *et al.* (2004). "Autosomal recessive spinocerebellar ataxia and peripheral neuropathy with raised alpha-fetoprotein." *J Neurol* 251(7): 805-812.
- Koeppen A.H. (2002). "Ocular apraxia in recessive ataxia." *Arch Neurol* 59(5): 874.
- Korolev S., Hsieh J., Gauss G.H. *et al.* (1997). "Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of E. coli Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP." *Cell* 90(4): 635-47.
- Kraulis P.J. (1991). "MOLSCRIPT: A Program to Produce Both Detailed et Schematic Plots of Protein Structures." *J App Cryst* 24: 946-950.
- Laberge A.-M., Michaud J., Richter A. *et al.* (2005). "Historical founder effects and their impact on medical genetics in Quebec." *submitted*.
- Lafreniere R.G., MacDonald M.L., Dube M.P. *et al.* (2004). "Identification of a novel gene (HSN2) causing hereditary sensory and autonomic neuropathy type II through the Study of Canadian Genetic Isolates." *Am J Hum Genet* 74(5): 1064-1073.
- Lanoue F. (1972). Une nouvelle Acadie, Saint-Jacques-de-L'Achigan 1772-1972, Société de généalogie de Joliette.
- Lathrop G.M., Lalouel J.M., Julier C. and Ott J. (1984). "Strategies for multilocus linkage analysis in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(11): 3443-3446.

- Le Ber I., Bouslam N., Rivaud-Pechoux S. *et al.* (2004). "Frequency and phenotypic spectrum of ataxia with oculomotor apraxia 2: a clinical and genetic study in 18 patients." *Brain* 127(Pt 4): 759-67.
- Lessard J.-M. and Pouliot A. (1953). "Maladie de Morvan." *Laval Médical* 18: 1017-1032.
- Levi-Montalcini R. (1987). "The nerve growth factor 35 years later." *Science* 237(4819): 1154-1162.
- Mardy S., Miura Y., Endo F. *et al.* (2001). "Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): effect of TRKA (NTRK1) missense mutations on autophosphorylation of the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor." *Hum Mol Genet* 10(3): 179-88.
- Mardy S., Miura Y., Endo F. *et al.* (1999). "Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: novel mutations in the TRKA (NTRK1) gene encoding a high-affinity receptor for nerve growth factor." *Am J Hum Genet* 64(6): 1570-1579.
- Medghalchi S.M., Frischmeyer P.A., Mendell J.T. *et al.* (2001). "Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability." *Hum Mol Genet* 10(2): 99-105.
- Megarbane A., Delague V., Salem N. and Loiselet J. (1999). "Autosomal recessive congenital cerebellar hypoplasia and short stature in a large inbred family." *Am J Med Genet* 87(1): 88-90.
- Merritt E.A. and Bacon D.J. (1997). "Raster3D: Photorealistic Molecular Graphics." *Methods Enzymol* 277: 505-524.
- Mitchell J.J., Capua A., Clow C. and Scriver C.R. (1996). "Twenty-year outcome analysis of genetic screening programs for Tay-Sachs and beta-thalassemia disease carriers in high schools." *Am J Hum Genet* 59(4): 793-798.
- Miura Y., Mardy S., Awaya Y. *et al.* (2000). "Mutation and polymorphism analysis of the TRKA (NTRK1) gene encoding a high-affinity receptor for nerve growth factor in congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) families." *Hum Genet* 106(1): 116-124.
- Montermini L., Rodius F., Pianese L. *et al.* (1995). "The Friedreich ataxia critical region spans a 150-kb interval on chromosome 9q13." *Am J Hum Genet* 57(5): 1061-1067.

- Mootha V.K., Lepage P., Miller K. *et al.* (2003). "Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(2): 605-610.
- Moreira M.-C., Barbot C., Tachi N. *et al.* (2001). "The gene mutated in ataxia-oculomotor apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin." *Nat Genet* 29(2): 189-193.
- Moreira M.C., Klur S., Watanabe M. *et al.* (2004). "Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2." *Nat Genet* 36(3): 225-227.
- Morton N.E. (1955). "Sequential tests for the detection of linkage." *Am J Hum Genet* 7(3): 277-318.
- Morvan A. (1883). "De l'anesthésie sous ses divers modes dans la paréso-analgésie: cas frustes de paréso-analgésie: cass frustes de paréso-analgésie." *Gazette Hebdomadaire de Médecine* 20: 580, 590,624.
- Murray T.J. (1973). "Congenital Sensory Neuropathy." *Brain* 96: 387-394.
- Nemeth A.H., Bochukova E., Dunne E. *et al.* (2000). "Autosomal recessive cerebellar ataxia with oculomotor apraxia (ataxia-telangiectasia-like syndrome) is linked to chromosome 9q34." *Am J Hum Genet* 67(5): 1320-1326.
- Nicholson G.A., Dawkins J.L., Blair I.P. *et al.* (1996). "The gene for hereditary sensory neuropathy type I (HSN-1) maps to chromosome 9q22.1-q22.3." *Nat Genet* 13(1): 101-104.
- Ogawa T., Takiyama Y., Sakoe K. *et al.* (2004). "Identification of a SACS gene missense mutation in ARSACS." *Neurology* 62(1): 107-109.
- Ogryzlo M.A. (1946). "A familial peripheral neuropathy of unknown etiology resembling Morvan's disease." *Canad Med Assoc J* 54: 547-553.
- Ohta M., Ellefson R.D., Lambert E.H. and Dyck P.J. (1973). "Hereditary sensory neuropathy, type II: Clinical, electrophysiologic, histologic, and biochemical studies of a Quebec kinship." *Arch Neurol* 29(1): 23-37.
- Parks H. and Staples O.S. (1945). "Two cases of Morvan's syndrome of uncertain cause." *Arch Intern Med* 75: 75-81.
- Patel S.C., Suresh S., Kumar U. *et al.* (1999). "Localization of Niemann-Pick C1 protein in astrocytes: implications for neuronal degeneration in Niemann-Pick type C disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4): 1657-1662.

- Petit M.A. and Ehrlich D. (2002). "Essential bacterial helicases that counteract the toxicity of recombination proteins." *Embo J* 21(12): 3137-3147.
- Rabin B.A., Griffin J.W., Crain B.J. *et al.* (1999). "Autosomal dominant juvenile amyotrophic lateral sclerosis." *Brain* 122(Pt 8): 1539-1550.
- Rasmussen T.P. and Culbertson M.R. (1998). "The putative nucleic acid helicase Sen1p is required for formation and stability of termini and for maximal rates of synthesis and levels of accumulation of small nucleolar RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 18(12): 6885-6896.
- Richter A., Rioux J.D., Bouchard J.-P. *et al.* (1999). "Location score and haplotype analyses of the locus for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay, in chromosome region 13q11." *Am J Hum Genet* 64(3): 768-775.
- Riley C.M., Day R.L., Greeley D.M. and Langford W.S. (1949). "Central autonomic dysfunction with defective lacrimation: report of five cases." *Pediatrics* 3: 468-478.
- Riviere J.B., Verlaan D.J., Shekarabi M. *et al.* (2004). "A mutation in the HSN2 gene causes sensory neuropathy type II in a Lebanese family." *Ann Neurol* 56(4): 572-575.
- Roddier K., Thomas T., Marleau G. *et al.* (2005). "Two mutations in the HSN2 gene explain the high prevalence of NHSAN2 in French Canadians." *Neurology* 64(10): 1762-1767
- Saar K., Al-Gazali L., Sztriha L. *et al.* (1999). "Homozygosity mapping in families with Joubert syndrome identifies a locus on chromosome 9q34.3 and evidence for genetic heterogeneity." *Am J Hum Genet* 65(6): 1666-1671.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Scriver C.R. (2001). "Human genetics: lessons from Quebec populations." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 69-101.
- Shatzky S., Moses S., Levy J. *et al.* (2000). "Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) in Israeli-Bedouins: genetic heterogeneity, novel mutations in the TRKA/NGF receptor gene, clinical findings, and results of nerve conduction studies." *Am J Med Genet* 92(5): 353-360.

Shimazaki H., Takiyama Y., Sakoe K. *et al.* (2002). "Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia: the aprataxin gene mutations." *Neurology* 59(4): 590-595.

Silverman F.N. and Gilden J.J. (1959). "Congenital insensitivity to pain, a neurologic syndrome with bizarre skeletal lesions." *Radiology* 72: 176-190.

Slaugenhaupt S.A., Blumenfeld A., Gill S.P. *et al.* (2001). "Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia." *Am J Hum Genet* 68(3): 598-605.

Smeyne R.J., Klein R., Schnapp A. *et al.* (1994). "Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene." *Nature* 368(6468): 246-249.

Street V.A., Bennett C.L., Goldy J.D. *et al.* (2003). "Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth disease 1C." *Neurology* 60(1): 22-26.

Swanson A.G., Buchan G.C. and Alvord E.C., Jr. (1965). "Anatomic Changes in Congenital Insensitivity to Pain. Absence of Small Primary Sensory Neurons in Ganglia, Roots, and Lissauer's Tract." *Arch Neurol* 12: 12-18.

Swanson A.G., Buchan G.C. and Alvord E.D., Jr. (1963). "Absence of Lissauer's Tract and Small Dorsal Root Axons in Familial, Congenital, Universal Insensitivity to Pain." *Trans Am Neurol Assoc* 88: 99-103.

Takashima H., Boerkoel C.F., John J. *et al.* (2002). "Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy." *Nat Genet* 32(2): 267-272.

Taroni F. and DiDonato S. (2004). "Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias." *Nat Rev Neurosci* 5(8): 641-55.

Terwilliger J.D. and Ott J. (1994). Handbook of human genetic linkage. Baltimore, The Johns Hopkins University Press.

Tessier D. (1987). Bibliographie de Lanaudière. Québec, Institut québécois de recherche sur la culture.

Uhlmann-Schiffler H., Seinsoth S. and Stahl H. (2002). "Preformed hexamers of SV40 T antigen are active in RNA and origin-DNA unwinding." *Nucleic Acids Res* 30(14): 3192-3201.

Ursic D., DeMarini D.J. and Culbertson M.R. (1995). "Inactivation of the yeast Sen1 protein affects the localization of nucleolar proteins." *Mol Gen Genet* 249(6): 571-84.

Ursic D., Himmel K.L., Gurley K.A. *et al.* (1997). "The yeast SEN1 gene is required for the processing of diverse RNA classes." *Nucleic Acids Res* 25(23): 4778-4785.

Velankar S.S., Soutanas P., Dillingham M.S. *et al.* (1999). "Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism." *Cell* 97(1): 75-84.

Wald A. (1977). *Sequential analysis*. New York, John Wiley & Sons.

Watanabe M., Sugai Y., Concannon P. *et al.* (1998). "Familial spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy, peripheral neuropathy, and elevated level of serum creatine kinase, gamma-globulin, and alpha-fetoprotein." *Ann Neurol* 44(2): 265-269.

Winey M. and Culbertson M.R. (1988). "Mutations affecting the tRNA-splicing endonuclease activity of *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 118(4): 609-617.

Yotsumoto S., Setoyama M., Hozumi H. *et al.* (1999). "A novel point mutation affecting the tyrosine kinase domain of the TRKA gene in a family with congenital insensitivity to pain with anhidrosis." *J Invest Dermatol* 112(5): 810-814.



ANNEXES

Annexe 1

Article scientifique « Two Mutations in the *HSN2* Gene Explain the High Prevalence of HSN2 in French Canadians » *Neurology* 2005 may, 64(10) : 1762-1767 sous sa forme originale.

Two mutations in the *HSN2* gene explain the high prevalence of HSN2 in French Canadians

K. Roddier, BSc*; T. Thomas, MD*; G. Marleau, BSc; A.M. Gagnon, BSc; M.J. Dicaire, BSc; A. St-Denis, MSc; I. Gosselin, BSc; A.M. Sarrazin, MD; A. Larbrisseau, MD; M. Lambert, MD; M. Vanasse, MD; D. Gaudet, MD, PhD; G.A. Rouleau, MD, PhD; and B. Brais, MD, PhD

Abstract—Background: Hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2 (HSAN2; MIM 201300) is a rare recessive neuropathy typically diagnosed in the first decade. The 1973 study of a French Canadian family led to the definition of HSN2. **Objectives:** To demonstrate that the apparent higher prevalence of HSN2 in Quebec is due to the presence of two *HSN2* mutations and that carriers of different mutations appear to have a similar phenotype. **Methods:** Through attending physicians, the authors recruited French Canadian patients with HSN2. Exclusion of linkage to the known HSN loci and linkage to the HSN2 was performed using standard methods. Sequencing of the *HSN2* gene was used to uncover the causal mutations. **Results:** A large cluster of HSN2 patients comprising 16 affected individuals belonging to 13 families was identified. The mode of inheritance is clearly autosomal recessive. All patients originated from southern Quebec, and 75% are from the Lanaudière region. Whereas linkage to the HSN1, 3, and 4 loci was excluded, linkage to the 12p13.33 HSN2 locus was confirmed. Sequencing of the *HSN2* gene uncovered two French Canadian mutations and a novel nonsense mutation in a patient of Lebanese origin, all predicted to lead to truncations of the HSN2 protein. The comparison of clinical variables between patients with different genotypes does not suggest any difference in phenotype. **Conclusions:** Two founder mutations are responsible for the apparently higher prevalence of HSN2 in French Canadians. Genotype-phenotype correlation does not suggest any significant clinical variability.

NEUROLOGY 2005;64:1762–1767

Hereditary sensory and autonomic neuropathies (HSANs) are a group of clinically and genetically heterogeneous disorders associated with sensory dysfunction. During the last decade, through positional cloning and candidate gene screening strategies, the loci and mutated genes have been identified for HSN1 (MIM 162400), HSN3 (MIM 223900), HSN4 (MIM 256800), and HSN5.^{1–8} The mutated gene for HSN2 (neurogenic acro-osteolysis; MIM 201300) has only recently been identified.⁹ HSN2 is a rare recessive disease that was first clearly described in 1973 in a French Canadian kinship.^{10,11} In the literature, >50% of the patients described are of French Canadian background.^{10–14} The hallmarks of

HSAN2 are an autosomal recessive mode of inheritance, onset of symptoms in infancy or early childhood, occurrence of distal extremity pathologies (paronychia, whitlows, ulcers, and necrosis Charcot joints), frequent amputations, sensory loss that affects all modalities of sensation (lower and upper limbs and perhaps the trunk as well), absence or diminution of tendon reflexes (usually in all limbs), minimal autonomic dysfunction, absence of sensory nerve action potentials, and virtual absence of myelinated fibers with decreased numbers of unmyelinated fibers in sural nerves.^{11,15} Prior to this study, four loss-of-function mutations have been uncovered in the single-exon *HSN2* gene encoding a 434-amino acid open reading frame.^{9,16} We have uncovered a large cohort of 16 HSN2 patients belonging to 13 French Canadian families. We have confirmed that all affected individuals have mutations in the *HSN2*

Additional material related to this article can be found on the *Neurology* Web site. Go to www.neurology.org and scroll down the Table of Contents for the May 24 issue to find the title link for this article.

*These authors have contributed equally to this work.

From the Laboratoire de neurogénétique (Drs. Thomas and Brais, K. Roddier, G. Marleau, A.M. Gagnon, M.J. Dicaire, A. St-Denis, and I. Gosselin), Centre de recherche du CHUM, Université de Montréal, Centre Hospitalier Régional de Lanaudière (Dr. Sarrazin), Saint-Charles-Borromée, Département de pédiatrie (Drs. Larbrisseau, Lambert, and Vanasse), Hôpital Sainte-Justine et Université de Montréal, Centre de médecine génique communautaire de l'Université de Montréal (Dr. Gaudet), Centre Hospitalier de la Sagoumie, Sagoumie, and McGill Health Centre (Dr. Rouleau), McGill University, Montréal, Québec, Canada.

Supported by the ECOGENE-21 Interdisciplinary CIHR team grant of the Centre de médecine génique communautaire de l'Université de Montréal, the Démogénétique and Génétique communautaire axes of the Réseau de médecine génétique appliquée (RMGA) du Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ), and the Association de la Neuropathie sensorielle et autonome héréditaire de type 2.

Dr. Brais is a chercheur-boursier of the FRSQ.

Received September 3, 2004. Accepted in final form January 25, 2005.

Address correspondence and reprint requests to Dr. B. Brais, Centre de recherche du CHUM, Hôpital Notre-Dame-CHUM, M4211-L3, 1560, rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1; [REDACTED]

gene. We describe the relative clinical homogeneity of this disease despite the differences in genotype.

Methods. Through attending physicians, we identified 18 patients with HSN2 belonging to 13 families living in southern Quebec. Sixteen subjects agreed to participate in this study following informed consent. Genealogic information was obtained at least up to grandparents in all families (except Family M). Blood samples were collected for the 16 subjects and their relatives. One Canadian patient of Lebanese origin was also recruited after informed consent.

All patients were evaluated with standardized questionnaire and examination. Patient medical charts were reviewed. Previous electromyography or nerve biopsy results done in different laboratories were compiled.

DNA was extracted from blood samples using standard techniques.¹⁷ Information about the 17 polymorphic markers analyzed was obtained from the Genome Database (<http://www.gdb.org/gdb>). PCR was performed in 13 μ L of a mixture containing 0.2 mM dNTP-A, 0.025 mM dATP, 0.16 μ L of dATP ³⁵S-labeled at 12.5 μ Ci/ μ L, 1 \times bovine serum albumin, Taq tampon 1 \times , 0.9 U of Taq polymerase, 1.15 μ M of each primer, and 15 ng of DNA. The amplification procedure was performed with a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA), and it consisted of a hot start of 5 minutes at 94 °C followed by 35 cycles of denaturing at 94 °C for 30 seconds, annealing at 52, 55, or 58 °C for 30 seconds and elongation at 72 °C for 30 seconds, and a final elongation at 72 °C for 5 minutes; 2.5 μ L was loaded on 5% polyacrylamide denaturing gels. Following electrophoresis, the gels were dried and autoradiographs were obtained. The sizes of the different alleles were established by comparison with a standard M13 sequence prepared from the AmpliCycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Haplotypes were deduced from family data. The haplotyped carrier chromosomes were studied for all affected individuals, except for three individuals for whom no other familial samples were available (Patients 3, 8, and the Lebanese patient). Some DNA samples were too limited to allow full genotyping (Patient 16).

PCR primers were designed using PrimerSelect 4.03 (DNASTAR) and synthesized by Alpha DNA (Montreal, Canada). Fragments were amplified using the same amplification mix as for genotyping. Amplification was performed in a GeneAmp PCR System 9700 using the following PCR protocol: hot start of 5 minutes at 94 °C followed by 35 cycles of denaturing at 94 °C for 30 seconds, annealing at 58 °C for 30 seconds and elongation at 72 °C for 30 seconds, and a final elongation at 72 °C for 5 minutes. PCR products were sequenced at the Montreal Genome Center (Quebec, Canada). Sequence traces were compared with the genomic sequence AB002342 from UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu>) using SeqMan 4.03 (DNASTAR).

To estimate the regional mutation carrier frequencies for the two mutations, we calculated based on the presence of five families with homozygotes for mutation c.943C \rightarrow T and one for the rarer mutation c.918-919insA living in Lanaudière. We relied on the 1996 Canadian Census for the population of the county of Joliette. We excluded the population of the administrative region of the Municipalité Régionale de Comté des Moulins where no HSN2 patients are known to live, because it consists largely of an urban suburb of Montreal (population: 267,141 = 370,354 - 102,008). For the small town east of Joliette from which five families originate (one homozygote for mutation c.918-919insA, two homozygotes for mutation c.943C \rightarrow T, and two compound heterozygotes for mutations c.943C \rightarrow T and c.918-919insA), the same Canadian 1996 Census gives a population of 2,987 inhabitants. We applied Hardy-Weinberg proportions to estimate carrier frequencies because no regional population samples are available. Combined HSN2 regional carrier frequencies for the two mutations were calculated by adding the individual frequencies for each mutation estimated by Hardy-Weinberg proportions.

Results. Our cohort comprises 16 patients belonging to 13 families (figure 1). The most striking feature of this cohort is that all families come from the southern part of the province of Quebec defined as southwest of an imaginary line along the Chaudière River that runs a few miles south of Quebec City (figure 2A). No patients have been

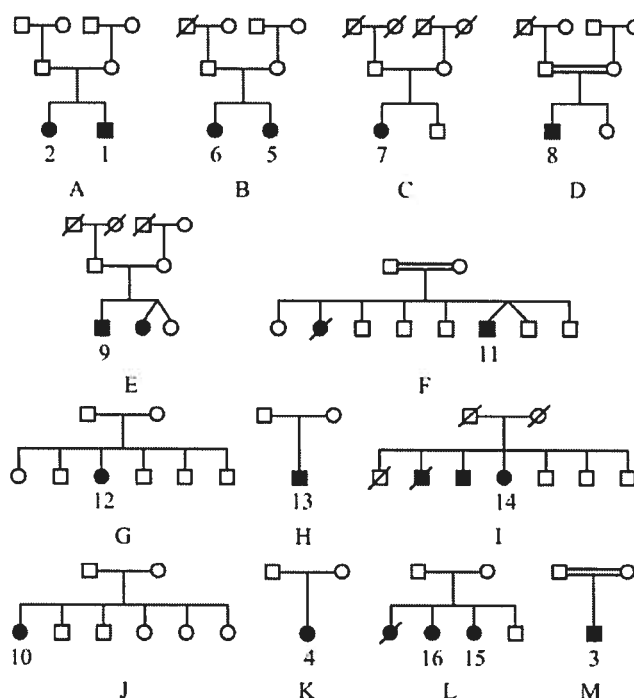


Figure 1. Thirteen French Canadian hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2 (HSAN2) pedigrees. We identified and contacted 18 HSN2 patients belonging to 13 families living in southern Quebec.

diagnosed in Quebec City or in the Saguenay-Lac-Saint-Jean region during the last 20 years (J. Mathieu and J.P. Bouchard, personal communications). Furthermore, 75% (12/16) of patients originate from the Lanaudière region (see figure 2A). Joliette, the county town, is 75 km (47 mi) north of Montreal. The southeastern part of the county along the Saint Lawrence River was first settled by French pioneers during the second half of the 17th century.¹⁸ The majority of the population is still French Canadian and lives in the agricultural southeastern part of the county. Unfortunately, the regional origin of the family described in 1973 is unknown, and the family has been lost to follow-up (S. Verret and P.J. Dyck, personal communications). However, Family I, originally described by Heller and Robb in 1955, also originated from the Lanaudière region.¹³ Of the 13 families, 6 have more than one affected member (see figure 1). In Family F, one daughter died of septicemia at age 19. In two families, parents are first-degree cousins; in one, they are uncle and niece. Three families are known to be distantly related by more than one ancestor (Families A, E, and F; see figure 1). Five of the families originate from a small village east of Joliette. Last, Patient 8 lives northwest of Lanaudière, but his parents are first-degree cousins and their shared grandparents came from Lanaudière. To our knowledge, no parents are affected. Men and women are equally affected. Pedigree analysis strongly supports an autosomal recessive mode of inheritance (see figure 1).

Linkage of the French Canadians families with HSN2 to the HSN1, 3, and 4 gene loci was excluded by performing linkage analyses to polymorphic makers previously reported to be in close proximity to the three mutated genes (data not shown). A first genome scan using the Weber 8

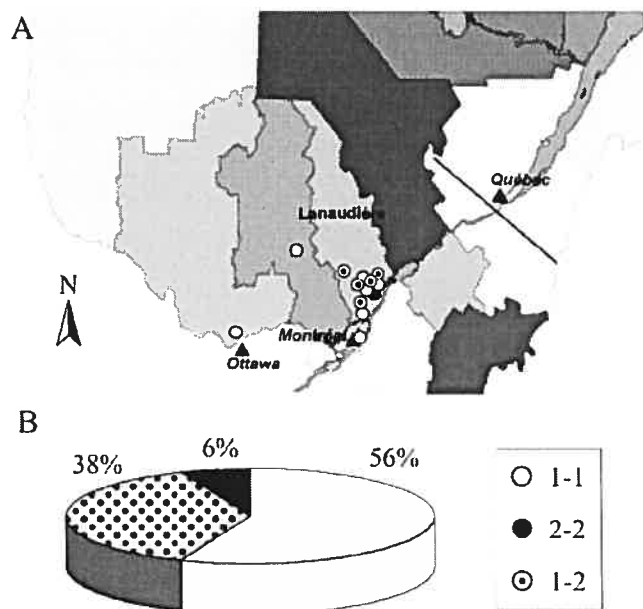


Figure 2. Regional origin and mutation distribution for 13 French Canadian hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2 families. (A) Regional origins of patients. Circles represent the place of residence of the patients' parents and the genotype of the affected individuals. White circles stands for homozygotes for mutation *c.943C→T*, black circles for homozygotes for mutation *c.918-919insA*, and dotted circles for compound heterozygotes for both mutations. (B) Percentage of carriers of the two founder mutations. Symbol codes are identical to those in A.

panel of markers and a pooling strategy failed to uncover the disease locus. A second genome scan using a homozygosity mapping strategy also failed to identify the locus. Through collaboration with Xenon Genetics (Vancouver, Canada), we confirmed that our families were linked to the same 12q13.33 locus as two large consanguineous Newfoundland families (see table E-1 on the *Neurology* Web site at www.neurology.org).⁹ Haplotype analysis determined that two distinct ancestral carrier chromosomes were present in our cohort. In retrospect, the presence of two mutations in our cohort and the absence of a close marker to the very telomeric *HSN2* gene in the Weber 8 marker panel, the telomeric D12S372 being >8 cM from the gene, together were responsible for the failure of the two genome scans performed under the assumption that one founder mutation was likely responsible for HSN2 in most French Canadian patients.

The *HSN2* gene was sequenced in all 16 patients, and two mutations were identified. Mutations detected in each individual were consistent with the haplotype analysis (see table E-1). Mutation 1, *c.943C→T*, changes a CAG codon into a TAG stop codon and is predicted to truncate the protein to a 314-amino acid peptide. Mutation 2, *c.918-919insA*, consists of an insertion of an A at position 918, causing a frameshift that leads to a premature truncation to a 318-amino acid peptide. Mutation 1 (*c.943C→T*) is the more frequent, being found on 75% (24/32) of mutation-carrying chromosomes. Fifty-six percent (9/16) of patients are *c.943C→T* homozygotes, 6% (1/16) are *c.918-919insA*

homozygotes, and 38% (6/16) of patients are compound heterozygotes (*c.943C→T* and *c.918-919insA*) (see figure 2B). Interestingly, the two families that have no known Lanaudière origin are homozygotes for the common *c.943C→T* mutation, suggesting that HSN2 in patients outside the Lanaudière region will likely be caused by two copies of the common mutation. We also sequenced the DNA of a 13-year-old Canadian child of Lebanese origin clinically affected with HSN2 and identified that he was homozygote for a novel nonsense mutation: a 868C→T substitution at codon 290 of *HSN2*. This mutation is predicted to change a CGA coding for an arginine to a TGA stop codon that should lead to a 289-amino acid truncated protein.

We are confident that we have identified all the living HSN2 patients in the Lanaudière region. Based on the 267,141 population of the Lanaudière region, one can estimate the regional carrier frequencies to be in the order of 1:116 for mutation *c.943C→T* and 1:260 for mutation *c.918-919insA* based on Hardy-Weinberg proportions. In the 2,987 inhabitants of the village east of Joliette, where we observed the greatest concentration of patients, the carrier frequencies could be as high as 1:18 for the more common *c.943C→T* mutation and 1:28 for the rarer *c.918-919insA* mutation.

The clinical, electromyographic, and pathologic characteristics of HSN2 are well established.^{11,19} The 16 French Canadian patients present a relatively homogeneous HSN2 phenotype, as summarized in the table. The diagnosis of HSN2 in these families was arrived at clinically because the mode of transmission is recessive as opposed to dominant in HSN1,¹ there was no major autonomic dysfunction as found in HSN3,⁶ the intelligence of the patient was normal as opposed to that in HSN4,⁷ and stretch reflexes are usually absent whereas they are present in HSN5.^{8,15} All were diagnosed before age 14 (8 months to 13 years, mean 8 years old). Patient 1, at age 8 months, was the youngest to be diagnosed. His early neurologic evaluation was prompted because his parents already had an older affected daughter. During his first evaluation, he demonstrated diminished sensitivity to pinprick and had no sensory nerve action potential. However, his deep tendon reflexes were present except at the ankles. At age 2, he has a history of many painless injuries including wounds that are slow to heal. The two larger genotype groups are the homozygote for mutations *c.943C→T* (nine individuals) and compound heterozygotes for both mutations (six patients). There appears to be no striking differences in the age of diagnosis, first infection, and necrosis between these two groups (see table). Furthermore, if one compares the degree of amputations, though there is the expected increase with age, older patients of different genotypes appear as disabled (figure 3).

Discussion. This study documents the existence of a large cluster of French Canadian families with HSN2. We demonstrate that two ancestral chromosomes carrying two distinct *HSN2* mutations are responsible for HSN2 in the French Canadian population. We also describe a novel homozygous nonsense mutation affecting an HSN2 patient of Lebanese origin different from the one recently uncovered in another HSN2-affected individual from

Table Clinical phenotype of 16 French Canadian patients with HSN2

No.	Mutation genotype	Family	Sex	Age at diagnosis	Age when recruited	Age at first infection	Age at first necrosis	Reflexes	SNAP
1	1-2	A	M	8 mo	8 mo	—	—	Present except Achilles	—
2	1-2	A	F	4 y	4 y	—	—	—	—
3	1-1	M	M	9 y	9 y	—	—	—	—
4	1-2	K	F	6 y	12 y	6 (foot)	10	Absent except Achilles	—
5	1-2	B	F	10 y	19 y	10 (toes)	16	—	—
6	1-2	B	F	5 y	22 y	5 (tibia)	—	Absent except Achilles	—
7	1-1	C	F	8 y	25 y	7 (foot)	—	Absent except Achilles	—
8	1-1	D	M	8 y	28 y	6 (foot)	14	—	—
9	1-1	E	M	11 y	31 y	18 (foot)	20	—	—
10	1-1	J	F	9 y	33 y	5 (foot)	16	Absent except Achilles	—
11	2-2	F	M	11 y	35 y	12 (finger)	16	—	—
12	1-1	G	F	3 y	43 y	3 (foot)	7	Absent except Achilles	—
13	1-1	H	M	12 y	44 y	12 (finger)	10	Absent except Achilles	—
14	1-2	I	F	9 y	58 y	7 (toe)	11	—	—
15	1-1	L	F	10 y	71 y	10 (foot)	10	—	—
16	1-1	L	F	13 y	73 y	7 (hand)	13	—	—
Mean				8 y		8.4	13		

HSAN2 = hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2; SNAP = sensory nerve action potential; mutations: 1 = c.943C→T; 2 = c.918-919insA; (—) = absent.

Lebanon.¹⁶ The higher prevalence of two *HSN2* mutations in Quebec appears to be responsible for the fact that >50% of patients described in the literature prior to this study were of French Canadian background. This study suggests that the Lanaudière region of southern Quebec province may have a much higher prevalence of this disease than other regions in the world. The higher prevalence of HSN2 in this region is due to higher carrier frequencies for both French Canadian mutations but in particular for the apparently rarer c.918-919insA mutation. In fact, 58% (7/12) of patients in this region are compound heterozygotes. Furthermore, a higher carrier frequency for mutation c.918-919insA in the small village with affected individuals in five families (A, E, F, G, and K) is probably responsible for this unfortunately higher local prevalence of the disease. The estimated combined frequencies for both mutations in the Joliette county based on the observed number of homozygotes for either mutations are in the order of 1:80, whereas they are of 1:11 in the small village east of Joliette with the greater number of patients. The overall regional carrier frequencies are smaller than the ones for more studied Quebec recessive mutations found in the northeastern region of Saguenay-Lac-Saint-Jean, such as 1:22 for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix Saguenay (ARSACS; OMIM 270550)²⁰ and 1:23 for hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC; OMIM 218000).²⁰ However, in the small Lanaudière village, the individual mutation frequencies are in the same order of magni-

tude. Moreover, the estimated combined frequency is even higher, further increasing the risk for unrelated parents from the village to have affected children. The relative frequency of the most common mutation is also different between the more common southwestern founder mutation of HSN2 (75%) and diseases with northeastern Quebec founder effects such as ARSACS (94%)²¹ and HMSN/ACC (99%).²² A population base study is needed to establish more precisely the carrier frequencies in Quebec and in the Lanaudière region to determine if a regional base screening program for the *HSN2* mutations should be offered. However, the availability of mutation screening already allows accurate genetic counseling for future parents at risk of being carriers of these mutations.

The genotype-phenotype correlation for French Canadian HSN2 carriers of different mutations does not suggest that the two identified mutations influence the severity of the phenotype. Neither were there any significant clinical differences observed between the French Canadian patients and the individual of Lebanese origin homozygous for a different *HSN2* mutation. This is not entirely surprising considering the nature of the three mutations, all being predicted to lead to the formation of truncated proteins. Future comparisons with the phenotypes of carriers of other mutations may help establish if the mutations in French Canadian patients lead to partial or complete loss of function of the truncated mutated HSN2 proteins. *HSN2* is the fifth gene identified to date to cause a hereditary sensory and autonomic neuropathy. *HSN2* is a novel gene of un-

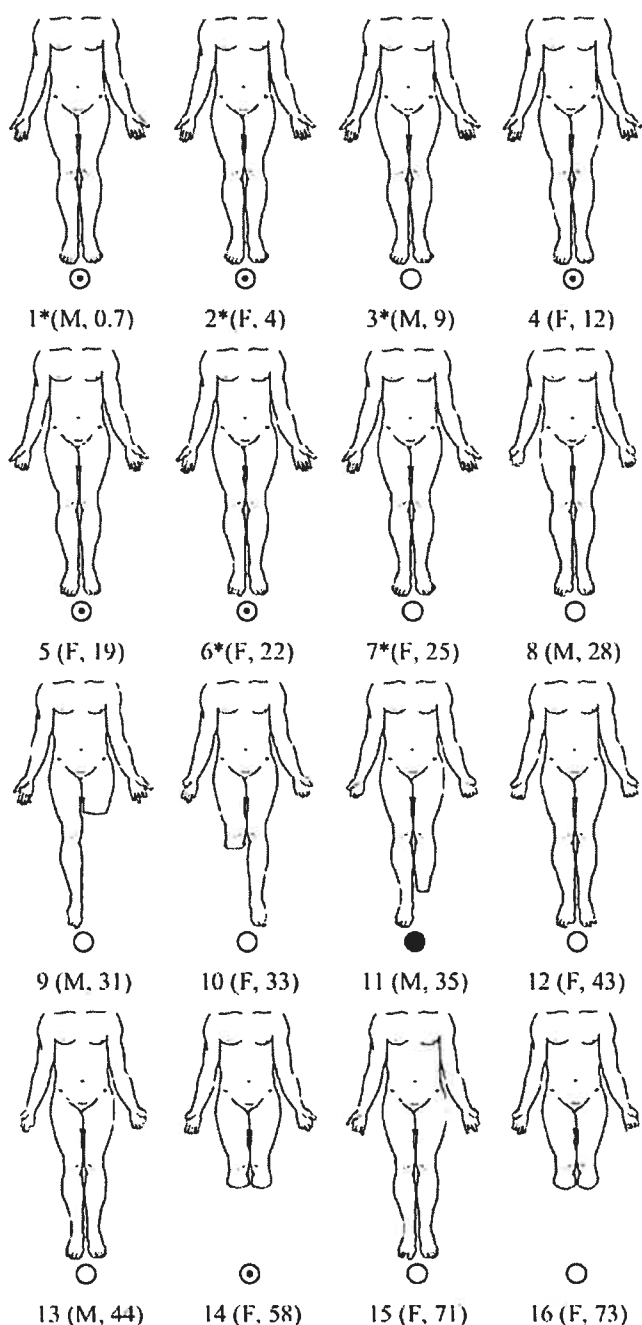


Figure 3. Progression of amputations in 16 hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2 patients according to age. Genotype and individual legend: White circles represent homozygotes for mutation *c.943C→T*, black circles homozygotes for mutation *c.918-919insA*, and dotted circles compound heterozygotes for both mutations; patient number (gender, age at examination). *Patients 1, 2, 3, 6, and 7 have not been amputated.

known function. Highly conserved *HSN2* homologues are present in pig, mouse, and rat.⁹ Functional bioinformatics analysis identified only a putative *N*-terminal domain signal peptide with a cleavage site that suggests that *HSN2* is a secreted protein. Multitissue adult northern blot and reverse tran-

scriptase PCR analyses were not able to uncover significant expression in any tissue, suggesting that *HSN2* is probably expressed in a few tissues or at low levels during development. However, the expression of *HSN2* has not yet been studied in fetal tissues. Serial examinations in our cohort demonstrate that the sensory deficit, as documented by sensory levels and loss of deep tendon reflexes, likely progresses with age. The examination of the 8-month-old Patient 1 with *HSN2* demonstrates that sensation is likely abnormal from birth, suggesting that *HSN2* may play a role in the development of the peripheral sensory system.

Our current knowledge of the mutated genes in HSANs suggests that they are likely involved in different pathways in neuronal development or survival mechanisms. The *SPTLC1* gene (serine palmitotransferase long-chain base subunit 1) mutated in dominant HSAN1¹ plays a role in sphingolipid biosynthesis by catalyzing the pyridoxal-5'-phosphate-dependent condensation of L-serine and palmitoyl-CoA to 3-oxosphinganine.² Four studies have suggested that the mutated *SPTLC1* through a dominant negative effect diminishes the function of the normal protein, leading to a relative loss of function.^{2,23-25} The *IKBKAP* gene (IKB kinase complex-associated protein gene) is mutated in recessive HSAN3.^{5,6} The *IKBKAP* protein is a scaffold protein important for the assembling of the IKK complex and a regulator for three kinases involved in pro-inflammatory cytokine signaling.²⁶ In disease, *IKBKAP* is absent or dysfunctional. The *TRKA* (tyrosine kinase A) gene mutated in HSAN4 was identified in 1996 using a candidate gene strategy.⁷ The *TRKA* (tyrosine kinase A) gene (1q21-q22)²⁷⁻³⁴ is the human homologue of the neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 gene (*NTRPK1*) deleted in mice insensitive to pain with anhidrosis.^{28,35} It is proposed that the nerve growth factor (NGF)-TRPK system plays a crucial role in the development and function of the nociceptive sensory system and in the establishment of temperature regulation via sweating.³⁴ The *NGFB* (NGF- β) gene is mutated in HSAN5.⁸ NGF is a polypeptide involved in the regulation of growth and differentiation of certain sensory neurons. NGF is composed of three subunits, α , β , and γ , which specifically interact to form a complex.³⁶ The five mutations described in the *HSN2* gene are likely loss-of-function mutations, therefore suggesting that, as in the other HSAN, it is the loss of the protein or inactivation of its function that is responsible for the sensory neuropathies. Further study of the *HSN2* gene may provide important insights into the pathophysiology of these rare neuropathies and the development and preservation of the sensory and autonomic nervous systems.

Acknowledgment

The authors thank the patients and their relatives for their participation in this study. They also thank the following colleagues: R. Bonin, J.-P. Bouchard, M.-P. Dubé, P.J. Dyck, M. Goulet, I.H. Heller, R. Lafrenière, B. Lemieux, S. Maari, J. Mathieu, C. Prévoist, M. Samuels, and S. Veret.

References

1. Nicholson GA, Dawkins JL, Blair IP, et al. The gene for hereditary sensory neuropathy type I (HSN-1) maps to chromosome 9q22.1-q22.3. *Nat Genet* 1996;13:101-104.
2. Dawkins JL, Hulme DJ, Brahmabhatt SB, Auer-Grumbach M, Nicholson GA. Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I. *Nat Genet* 2001;27:309-312.
3. Blumenfeld A, Slaugenhaupt SA, Axelrod FB, et al. Localization of the gene for familial dysautonomia on chromosome 9 and definition of the DNA markers for genetic diagnosis. *Nat Genet* 1993;4:160-163.
4. Blumenfeld A, Slaugenhaupt SA, Liebert CB, et al. Precise genetic mapping and haplotype analysis of the familial dysautonomia gene on human chromosome 9q31. *Am J Hum Genet* 1999;64:1110-1118.
5. Anderson SL, Coli R, Daly IW, et al. Familial dysautonomia is caused by mutations of the IKAP gene. *Am J Hum Genet* 2001;68:753-758.
6. Slaugenhaupt SA, Blumenfeld A, Gill SP, et al. Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia. *Am J Hum Genet* 2001;68:598-605.
7. Indo Y, Tsuruta M, Hayashida Y, et al. Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Nat Genet* 1996;13:485-488.
8. Einarsdottir E, Carlsson A, Minde J, et al. A mutation in the nerve growth factor beta gene (NGFB) causes loss of pain perception. *Hum Mol Genet* 2004;13:799-805.
9. Lafreniere RG, MacDonald ML, Dube MP, et al. Identification of a novel gene (HSN2) causing hereditary sensory and autonomic neuropathy type II through the Study of Canadian Genetic Isolates. *Am J Hum Genet* 2004;74:1064-1073.
10. Hould F, Verret S. Hereditary radicular neuropathy with sensory loss: study of a French-Canadian family. *Laval Med* 1967;38:454-459.
11. Ohta M, Ellefson RD, Lambert EH, Dyck PJ. Hereditary sensory neuropathy, type II: clinical, electrophysiologic, histologic, and biochemical studies of a Quebec kinship. *Arch Neurol* 1973;29:23-37.
12. Lessard J-M, Pouliot A. *Maladie de Morvan*. *Laval Med* 1953;18:1017-1032.
13. Heller IH, Robb P. Hereditary sensory neuropathy. *Neurology* 1955;5:15-24.
14. Dyck PJ. Histologic measurements and fine structure of biopsied sural nerve: normal, and in peroneal muscular atrophy, hypertrophic neuropathy, and congenital sensory neuropathy. *Mayo Clin Proc* 1966;41:742-774.
15. Dyck PJ, Mellinger JF, Reagan TJ. Not "indifference to pain" but varieties of hereditary sensory and dysautonomic neuropathy. *Brain* 1983;106:373.
16. Riviere JB, Verlaan DJ, Shekarabi M, et al. A mutation in the HSN2 gene causes sensory neuropathy type II in a Lebanese family. *Ann Neurol* 2004;56:572-575.
17. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
18. Tessier D. *Bibliographie de Lanaudière*. Québec: Institut québécois de recherche sur la culture, 1987.
19. Dyck PJ. Neuronal atrophy and degeneration predominantly affecting peripheral sensory and autonomic neurons. In: Dyck PJ, Thomas PK, eds. *Peripheral neuropathy*. Philadelphia: Saunders, 1993:1065-1093.
20. De Braekeleer M, Giasson F, Mathieu J, Roy M, Bouchard JP, Morgan K. Genetic epidemiology of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay in northeastern Quebec. *Genet Epidemiol* 1993;10:17-25.
21. Engert JC, Berube P, Mercier J, et al. ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat Genet* 2000;24:120-125.
22. Howard HC, Mount DB, Rochefort D, et al. The K-CI cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet* 2002;32:384-392.
23. Bejaoui K, Wu C, Scheffler MD, et al. SPTLC1 is mutated in hereditary sensory neuropathy, type 1. *Nat Genet* 2001;27:261-262.
24. Bejaoui K, Uchida Y, Yasuda S, et al. Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis. *J Clin Invest* 2002;110:1301-1308.
25. Dawkins JL, Brahmabhatt S, Auer-Grumbach M, et al. Exclusion of serine palmitoyltransferase long chain base subunit 2 (SPTLC2) as a common cause for hereditary sensory neuropathy. *Neuromusc Disord* 2002;12:656-658.
26. Cohen L, Henzel WJ, Baeuerle PA. IKAP is a scaffold protein of the IkkappaB kinase complex. *Nature* 1998;395:292-296.
27. Greco A, Villa R, Tubino B, Romano L, Penso D, Pierotti MA. A novel NTRK1 mutation associated with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Am J Hum Genet* 1999;64:1207-1210.
28. Mardy S, Miura Y, Endo F, et al. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: novel mutations in the TRKA (NTRK1) gene encoding a high-affinity receptor for nerve growth factor. *Am J Hum Genet* 1999;64:1570-1579.
29. Yotsumoto S, Setoyama M, Hozumi H, et al. A novel point mutation affecting the tyrosine kinase domain of the TRKA gene in a family with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *J Invest Dermatol* 1999;112:810-814.
30. Miura Y, Mardy S, Awaya Y, et al. Mutation and polymorphism analysis of the TRKA (NTRK1) gene encoding a high-affinity receptor for nerve growth factor in congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) families. *Hum Genet* 2000;106:116-124.
31. Shatzky S, Moses S, Levy J, et al. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) in Israeli-Bedouins: genetic heterogeneity, novel mutations in the TRKA/NGF receptor gene, clinical findings, and results of nerve conduction studies. *Am J Med Genet* 2000;92:353-360.
32. Bodzioch M, Lapicka K, Aslanidis C, Kacinski M, Schmitz G. Two novel mutant alleles of the gene encoding neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 (NTRK1) in a patient with congenital insensitivity to pain with anhidrosis: a splice junction mutation in intron 5 and cluster of four mutations in exon 15. *Hum Mutat* 2001;17:72.
33. Mardy S, Miura Y, Endo F, Matsuda I, Indo Y. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): effect of TRKA (NTRK1) missense mutations on autophosphorylation of the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Hum Mol Genet* 2001;10:179-188.
34. Indo Y. Molecular basis of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): mutations and polymorphisms in TRKA (NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Hum Mutat* 2001;18:462-471.
35. Smeyne RJ, Klein R, Schnapp A, et al. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* 1994;368:246-249.
36. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987;237:1154-1162.

RESIDENT AND FELLOW PAGE

Call for teaching videos

The *Neurology* Resident page is featured online at www.neurology.org. The Editorial Team of this section is seeking teaching videos that will illustrate classic or uncommon findings on movement disorders. Such videos will aid in the recognition of such disorders. Instructions for formatting videos can be found in the Information for Authors at www.neurology.org. Please contact the Editor, Karen Johnston [REDACTED] for more information or submit teaching videos online at <http://submit.neurology.org>.

Annexe 2

Article scientifique « Mutations in *Senataxin* Responsible for Quebec Cluster of Ataxia with Neuropathy » *Annals of Neurology* 2005 march, 57 : 408-414 sous sa forme originale.

Mutations in Senataxin Responsible for Quebec Cluster of Ataxia with Neuropathy

Antoine Duquette, MD,¹ Karel Roddier, BSc,¹ Julia McNabb-Baltar,¹ Isabelle Gosselin,¹ Anik St-Denis, MSc,¹ Marie-Josée Dicaire, BSc,¹ Lina Loisel,¹ Damian Labuda, PhD,² Luc Marchand, MD, FRCPC,³ Jean Mathieu, MD, FRCPC,⁴ Jean-Pierre Bouchard, MD, FRCPC,⁵ and Bernard Brais, MD, MPhil, PhD^{1,3,4}

Senataxin recently was identified as the mutated gene in ataxia-oculomotor apraxia 2, which is characterized by ataxia, oculomotor apraxia, and increased α -fetoprotein levels. In this study, we evaluated 24 ataxic patients from 10 French-Canadian families. All cases have a homogeneous phenotype consisting of a progressive ataxia appearing between 2 and 20 (mean age, 14.8) years of age with associated dysarthria, saccadic ocular pursuit, distal amyotrophy, sensory and motor neuropathy, and increased α -fetoprotein levels but absence of oculomotor apraxia. Linkage disequilibrium was observed with markers in the ataxia-oculomotor apraxia 2 locus on chromosome 9q34. We have identified four mutations in *senataxin* in the French-Canadian population including two novel missense mutations: the 5927T→G mutation changes the leucine encoded by codon 1976 to an arginine in the helicase domain (L1976R), and the 193G→A mutation changes a glutamic acid encoded by codon 65 into a lysine in the N-terminal domain of the protein (E65K). The common L1976R mutation is shared by 17 of 20 (85%) carrier chromosomes. The study of this large French-Canadian cohort better defines the phenotype of this ataxia and presents two novel mutations in *senataxin* including the more common founder mutation in the French-Canadian population.

Ann Neurol 2005;57:408–414

Ataxias are a heterogeneous group of diseases with considerable clinical overlap among the different forms.¹ The uncovering of population clusters of cases has accelerated the clinical characterization and positional cloning of genes for many ataxias.^{2–4} In 1980, Jean-Pierre Bouchard⁵ described a new form of recessive ataxia (Charcot–Marie–Tooth disease, progressive ataxia and tremor, MIM 214 380). He documented the existence of a large French-Canadian family living in New Brunswick in which 7 of the 20 children were affected by an ataxia with a distal amyotrophy.⁵ This ataxia shares some features with ataxia-oculomotor apraxia syndrome (AOA1; 9p13.3, MIM 208 920)^{6–8}; the spinocerebellar ataxia, autosomal recessive, with axonal neuropathy type I (SCAN1; 14q31-q32, MIM 607 250)⁹; and the ataxia-oculomotor apraxia 2 (AOA2; 9q34, MIM 606 002).^{10–12} Mutations responsible for AOA2 recently have been identified in the *senataxin* (*SETX*) gene that contains a domain found in superfamily 1 of helicases and is the human ortholog of yeast *Sen1p* gene.¹³ In this study, we de-

scribe 10 French-Canadian families segregating in a recessive mode the same ataxia as described by Bouchard.⁵ We demonstrate that they are linked to the *AOA2* locus on chromosome 9q34, and we describe four mutations in the *SETX* gene including two novel missense mutations. This is the largest regional cluster ever described of this recessive ataxia. This new French-Canadian founder effect allows a better description of the clinical phenotype and of the evolution of this recessive ataxia.

Patients and Methods

Clinical Evaluation

This project was approved by the Centre de Recherche du CHUM's institutional Ethics Committee. Patients were recruited through specialized ataxia clinics and treating neurologists. Informed consent was obtained from patients and all living family members. Detailed medical histories were obtained, and complete neurological examinations were performed on all living participants by experienced neurologists (B.B., J.-P.B., J.M., L.M.). Electromyography (EMG) and

From the ¹Laboratoire de Neurogénétique, Centre de Recherche du CHUM, Montreal; ²Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, Département de Pédiatrie, Montreal; ³Clinique d'ataxie du CHUM, Montreal; ⁴Clinique des Maladies Neuromusculaires, Carrefour de Santé de Jonquière, Saguenay; and ⁵Service de Neurologie de l'Hôpital de l'Enfant-Jésus, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada.

Received Sep 13, 2004, and in revised form Jan 3, 2005. Accepted for publication Jan 3, 2005.

Published online Feb 24, 2005, in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/ana.20408

Address correspondence to Dr Brais, Laboratoire de Neurogénétique, M4211-L3, Hôpital Notre-Dame-CHUM, 1560 Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1.

nerve conduction studies results were collected from charts. Brain magnetic resonance images were available for 12 patients. Measurements of serum α -fetoprotein (AFP) levels were performed using standard methods on all 19 living patients in 10 different hospital diagnostic laboratories. The absolute increase of AFP levels was calculated by dividing the observed value by the different laboratories' greatest normal value.

Mutation Analysis

DNA was isolated from blood samples using standard techniques.¹⁴ Genomic DNA sequencing of the 26 exons and intron-exon junctions was performed to identify pathogenic mutations in the *SETX* gene. Polymerase chain reaction (PCR) primers were designed using PrimerSelect 4.03 (DNASTAR) and synthesized by Invitrogen (Montreal, Canada). The L1976R mutation was amplified using the primers 5'CTT TGG TGT CCT TGT CTT GTC TGA3' and 5'CTC CCT CTG CCA CCC TTT TCT3'. The R1363X mutation was amplified with the primers 5'CAG CCG TCT TTG GAT TAT GTA G3' and 5'GTT TTG CTT TTA TGG TTT CTG GTT3'. The frameshift after the Ins1690T mutation was amplified using the primers 5'CTT CAG CAC TTT CAC CGT CTC TAA3' and 5'TCT CAT TTT CAC TCA GCA AGG TAA3'. The E65K mutation was amplified with the primers 5'GGC TTT CTA GGT CGT CAC ATT CAG3' and 5'CAC TTC GGC CTA GGA GAC ACA GC3'. PCR was performed in 13 μ l of a mixture containing 0.2mM deoxyribonucleoside triphosphate, 1 \times bovine serum albumin, Taq tampon at 1 \times final containing 15ng of DNA MgCl₂, 0.9 units Taq polymerase, 1.15 μ M of each primer, and 15ng DNA. The amplification procedure performed with a GeneAmp PCR System 9700 consisted of a hot-start of 5 minutes at 94°C followed by 35 cycles of denaturing at 94°C for 30 seconds, annealing at 55°C for 30 seconds, elongation at 72°C for 30 seconds, and a final elongation at 72°C for 5 minutes. PCR products were sequenced at the Montreal Genome Center. Sequence traces were compared with the genomic sequences KIAA0625 and AK022902 from UCSC Genome Bioinformatics (information available online at: <http://genome.ucsc.edu>) using SeqMan 4.03 (DNASTAR).

Mutation Prevalence Analysis

L1976R and E65K mutation prevalence studies were done by typing 154 samples from the Gaspésie region, which included 82 French Canadian and 72 Anglo Norman control samples. Dynamic allele-specific oligonucleotide hybridization was performed using the method that Bourgeois and Labuda¹⁵ described. The oligonucleotides, 5'TGT TGG CCT CCT CTA TC3' ($T_m = 51.44^\circ\text{C}$) and 5'TGT TGG CCG CCT CTA TC3' ($T_m = 58.22^\circ\text{C}$), served as probes/competitors to type the 5927T \rightarrow G polymorphism of the L1976R mutation, and 5'GGG AAT TAG AAA CCT TA3' ($T_m = 44.43^\circ\text{C}$) and 5'GGG AAT TAA AAA CCT TA3' ($T_m = 44.81^\circ\text{C}$) served as probes/competitors to type the 193G \rightarrow A polymorphism of the E65K mutation. Control samples suspected of carrying mutations were sequenced.

Results

Cluster of 10 Families with a Homogeneous Ataxia-Oculomotor Apraxia 2 Phenotype without Oculomotor Apraxia

This study describes the clinical features of 24 French-Canadian cases of ataxia accompanied by distal amyotrophy belonging to 10 families, including the 7 cases that Bouchard⁵ described in 1980 (Fig). The 19 living patients were reexamined (mean age at examination, 41.4 years; age range, 22–55 years). They present a clinically homogeneous phenotype and similar evolution. All cases share the following characteristics: a progressive gait ataxia, cerebellar dysarthria, saccadic ocular pursuit, and progressive distal amyotrophy (Table). Only Patient 19 retains deep tendon reflexes at the age of 22 years. Vibration sense is always impaired, whereas position sense is affected in 74% and touch in 57% of patients. Gaze nystagmus is present in 91% of patients and strabismus is present in 30%. None of the patients was found to have oculomotor apraxia as defined by the inability to generate volitional horizontal saccades with preserved reflex eye movements.¹⁶ None has cardiomyopathy or telangiectasia. Scoliosis is present in five patients (22%). Tremor, which was part of Bouchard's original presentation, is an inconsistent feature present in 57% of patients, and it was not observed in the recent examination of the youngest member of the original family at age 43 years (Table).

Seven families originate from northeastern Quebec and one family originates from bordering New Brunswick. Interestingly, Families 4, 6, and 9 are found in a cluster of three isolated coastal villages at the tip of the Gaspésie peninsula. This geographical distribution further suggests that many, if not most, patients share a single historical mutation.

Laboratory Findings

The workup of all 19 patients showed an increase of serum AFP levels (5.1 times normal, 1.4–18.2; Table). Measured creatine kinase ($n = 4$), vitamin E ($n = 4$), and albumin levels ($n = 8$) were normal. Total serum cholesterol levels were measured in 10 patients and were found to be only mildly increased in 4 patients (1.07–1.44 times upper limit of normal). Patient 19, who retained deep tendon reflexes, was the only patient to show no denervation on EMG at the age of 20 years. In the other 12 tested patients, denervation was severe in the lower limbs. Motor nerve conduction velocities were normal or slightly slowed, and amplitudes were mildly diminished. No sensory action potentials were detected in all patients. Sural nerve biopsies in Patients 21 (at 22 years old) and 22 (at 20 years old) showed chronic axonal neuropathy with preferential loss of large myelinated fibers. Magnetic resonance imaging was performed on 12 patients and showed iso-

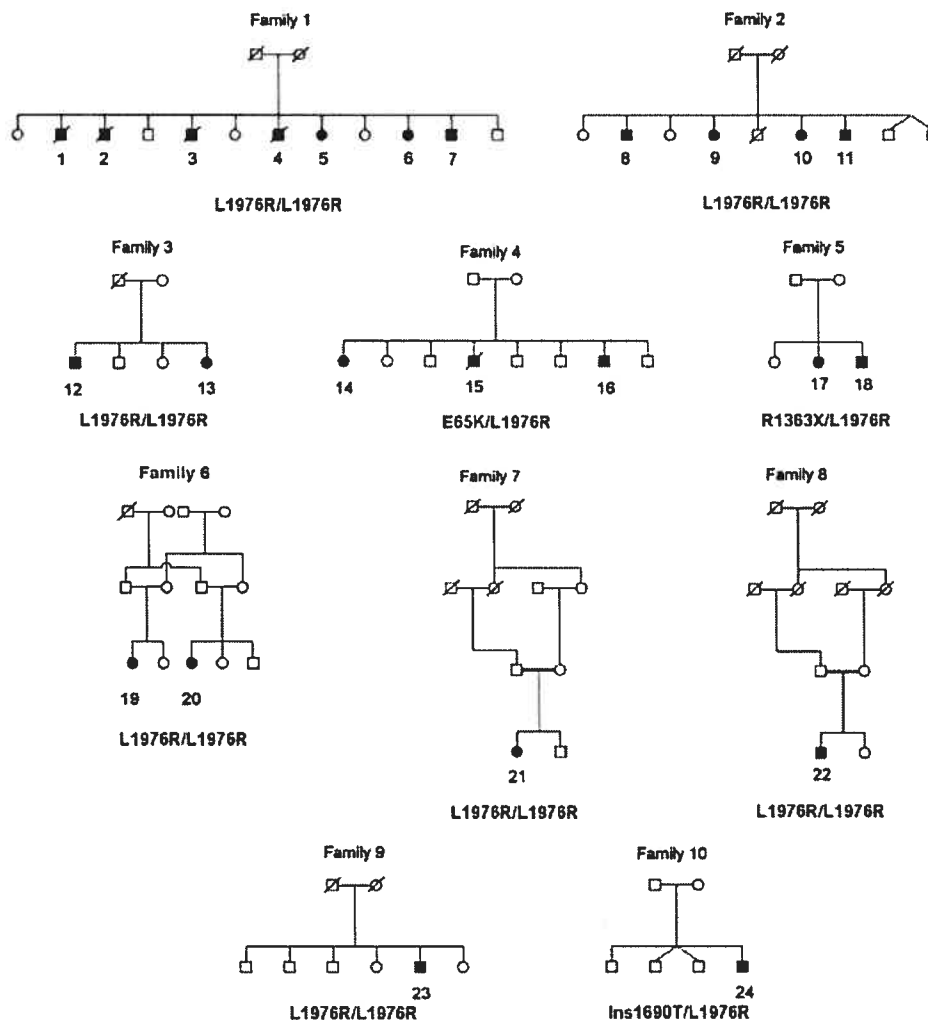


Fig. Pedigrees of 10 French-Canadian ataxia-oculomotor apraxia 2 (AOA2) families without oculomotor apraxia. Patients from Families 4 (E65K/L1976R), 5 (R1363X/L1976R), and 10 (Ins1690T/L1976R) are heterozygous. Patients from other families are homozygous for the L1976R mutation.

lated cerebellar atrophy in 7 patients and more extensive pontocerebellar atrophy in 5. Lymphoblastoid cells of Patient 24 did not show increased radiosensitivity as observed in ataxia-telangiectasia.¹⁷

Clinical Evolution

The size of this cohort and the multiple chronological evaluations allow disease evolution to be better appraised. Intervals of more than 4 years between examinations were available for 16 patients. The earliest neurological evaluation was completed at age 7 years for Patient 19. It was requested because the child was believed to have an unsteady gait compared with her classmates and possibly slightly slurred speech. Results of the neurological evaluation were considered entirely normal, and all deep-tendon reflexes were present. No EMG was performed at the time. This

patient was later able to play high school volleyball, suggesting that the gait clumsiness was indeed slight. Patients and parents report gait unsteadiness as the initial symptom at an average age at onset of 14.8 (age range, 2–20) years. AFP was not measured in this or any other patient before 21 years of age. Patients may have normal deep tendon reflexes until their 20s but eventually lose them progressively starting in the lower limbs. Distal amyotrophy usually becomes obvious only in the late 20s. The loss of vibration sense is progressive and probably accompanies the first symptoms. The evolution of the gait ataxia forced most patients to use a wheelchair for long distances by their mid-20s. However, many are still able to walk short distances with support even in their 40s. Intelligence appears to be normal and does not decline with age. Five deaths occurred among the 24

Table. Clinical Features in 24 French-Canadian Patients with a Similar Ataxic Phenotype

Feature	Family																							
	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	4	4	4	5	5	6	6	7	8	9	10
	Individual																							
Feature	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Sex	M	M	M	M	F	F	M	M	F	F	M	M	F	F	M	M	F	M	F	F	F	M	M	M
Age of death (yr)	67	50	56	49											23 ^a									
Age at study (yr)					55	51	43	51	49	48	42	53	44	42		33	42	41	22	22	38	36	49	25
Age at onset (yr)					16	11	15	15	16	12	14	17	15	18	15	16	20	17	2	17	15	16	14	15
Gait ataxia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Limb ataxia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tremor	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Cerebellar dysarthria	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gaze nystagmus	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Saccadic smooth pursuit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Strabismus	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Oculomotor apraxia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Distal muscle weakness	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Distal amyotrophy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Deep tendon reflexes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Impaired vibration sense	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Impaired position sense	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
Impaired touch	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Telangiectasia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spasticity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Scoliosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
Cardiomegaly	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRI		CA			CA							CA	CA			CA	PCA	PCA	PCA		PCA	CA	CA	PCA
Elevated AFP					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Elevated CK																								
Elevated total cholesterol								-	-				+			+	-	+	-		-	-	+	
Abnormal vitamin E														-		-			-					-

^aAccidental death.

AFP = α -fetoprotein; CK = creatine kinase; CA = cerebellar atrophy; PCA = pontocerebellar atrophy; MRI = magnetic resonance imaging.

patients. One death was accidental. One patient died of lymphoma; another patient died of intestinal cancer. Two causes of death were unspecified. Therefore, life expectancy is probably within the reference range. Denervation on EMG was documented to antedate atrophy in Patients 7, 8, and 22. No serial magnetic resonance images were available for review.

Linkage and Mutation Analysis

During a preliminary screening of candidate loci, haplotype sharing was established among the 10 families for several markers mapped to the AOA2 locus on

chromosome 9q34, and linkage analysis for these markers was performed. A maximum cumulative logarithm of odds score of 9.86 was established with marker D9S2157 at $\theta = 0$ (data not shown). A detailed five-marker haplotype analysis predicted that four mutations should be found in our cohort. Once *SETX* was identified as the mutated gene in AOA2, we screened its 26 exons and intron-exon junctions for mutations by direct sequencing.¹³ On 17 of the 20 carrier chromosomes, we identified a novel 592T→G (L1976R) mutation. Most patients were homozygous for this mutation, but patients from Families 4 (Pa-

tients 14 and 16), 5 (Patients 17 and 18), and 10 (Patient 24) were heterozygous as predicted by haplotypes. On one carrier chromosome for Patients 17 and 18, we found a previously described heterozygous 4087C→T (R1363X) nonsense mutation predicted to truncate the protein to 1362 aa.¹³ For Patient 24, we found a previously described heterozygous 5070insT mutation causing a frameshift in codon 1690 and the truncation of the protein to 1698 aa (Ins1690T).¹³ Finally, we identified a novel heterozygous 193G→A (E65K) mutation for Patients 14 and 16 of Family 4. The screening of control samples from Gaspésie uncovered a total of five carriers (three of Anglo-Norman and two of French-Canadian backgrounds) of the L1976R common French-Canadian mutation and no carriers of the rarer E65K mutation.

According to these results, we estimate the carrier rate for the L1976R mutation to be 3.5% (1:28) for Quebecois of Anglo-Norman origin and 2.1% (1:47) in the French-Canadian population of Gaspésie. No homozygote carrier of the mutations L1976R and E65K was uncovered, further supporting the argument that they are indeed causal mutations.

Discussion

This study describes a large cluster of AOA2 French-Canadian families linked to chromosome 9q34. The fairly homogeneous AOA2 phenotype is characterized in all patients by the onset in the early teenage years of a progressive gait ataxia, dysarthria, saccadic ocular pursuit, and impaired vibration sense. The progression by the mid-20s leads to the appearance of distal amyotrophy and complete loss of deep tendon reflexes. Life expectancy is probably in the reference range, with patients living to their 60s without cardiomyopathy. Increased serum AFP levels is a good biological marker for the disease but is not specific because levels are also increased in ataxia-telangiectasia and some isolated cases with phenotypes similar to AOA2 that may represent variants of the disease.^{18,19} As shown in the previous large international study by Le Ber and colleagues,²⁰ oculomotor apraxia is not a universal finding in this ataxia. In that multiethnic cohort, oculomotor apraxia was observed in 56% of patients. In French-Canadian patients, none had clear oculomotor apraxia, but ocular pursuit was saccadic in all patients.

Before the identification of the mutated gene, two studies had described the variable phenotype of recessive ataxia cases linked to 9q34. Five Pakistani brothers who experienced development of ataxia in late childhood or late teens were described to have a severe gait ataxia with mild ataxia of the limbs and trunk, absent lower limb deep tendon reflexes, abnormal ocular pursuit, and nerve conduction studies that showed absent sensory potentials.¹¹ They also had severe oculomotor

apraxia, saccade palsy, and no nystagmus. Amyotrophy, AFP levels, and EMG findings were not described. Two Japanese families also linked to chromosome 9q33-34 were described with an overlapping phenotype.¹² The four siblings from the first family were characterized by a truncal ataxia appearing at about 20 years of age, decreased vibration and position sense, and muscle weakness in the lower limbs. Ocular findings included gaze nystagmus and saccadic eye movements; however, as in the French-Canadian patients, no oculomotor apraxia was observed. They also had increased AFP levels and absent sensory action potential in the lower limbs with decreased motor conduction velocity. Interestingly, they had telangiectasia over the bulbar conjunctiva and increased creatine kinase and γ -globulin levels.¹⁰ The patient from the second Japanese family shared most of the clinical characteristics but did not have increased AFP, creatine kinase, or γ -globulin levels. In a recent study, 18 more ataxia patients from 6 families in France, the West Indies, Turkey, Morocco, and Portugal were linked to the 9q34 locus.²⁰ The mean age at onset was 15.1 years. Whereas all patients had increased AFP levels, 92% showed sensory motor neuropathy, and 56% had oculomotor apraxia. One of those patients was detailed further clinically with two others from a second family of Caucasian origin.²¹ The French-Canadian patients we studied appear to have a slightly more severe phenotype. In our study, the distal amyotrophy was a more striking feature, and patients used a wheelchair at an earlier age.

The patients evaluated in this study can be differentiated from other autosomal recessive ataxias based on the clinical presentation and its association with increased AFP levels. The slower progression and the absence of cardiomyopathy and, in most cases, of scoliosis help distinguish it from Friedreich's ataxia. Any clinical doubt involving autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay can be resolved clinically by the absence of spasticity and hypermyelinated fibers on retinal examination. AOA1 can be excluded because of its earlier age at onset (mean age, 4.7 years; age range, 1–15 years) and the universal occurrence of oculomotor apraxia.⁷ Early-onset cerebellar ataxia with hypoalbuminemia can be easily differentiated also by its hypoalbuminemia.²² SCAN1 can be excluded because it is not associated with increased AFP levels.⁹ Except for isolated ataxia cases, ataxia-telangiectasia is the only other ataxia where increased AFP levels have been clearly described.⁹ However, it can be differentiated because AOA2 has a later age of onset and does not show telangiectasia in the majority of cases or any immunological deficit. Furthermore, there is no evidence that AOA2 patients have an increased susceptibility to cancer, although in our study two patients died of cancer in their 50s.

The greater prevalence of AOA2 in northeastern Quebec and the sharing by 85% of carrier chromosomes of the same founder mutation defines this ataxia as a new disease with a French-Canadian founder effect. Because the phenotype observed in our population is homogeneous, we have not been able to identify a phenotype-genotype correlation, despite having four different mutations. This might be because the L1976R mutation present in at least one copy in all cases might be the major determinant of severity. The L1976R common mutation lies in the helicase domain of *senataxin*. It has been demonstrated that loss of function associated with amino acid substitutions in the helicase domain of yeast ortholog *Sen1p* causes altered processing of different RNA.^{23–26} Also of interest is the novel E65K mutation in the N-terminal domain, which suggests that it may be situated in a functional region. Because French-Canadian patients appear to have a normal overall development and the disease phenotype appears in adolescence, we hypothesize that *SETX* may play a role in maintaining cerebellar, anterior horn, and dorsal root neuron survival. This possibility is further suggested by the finding that amyotrophic lateral sclerosis 4 (MIM 602 433) is allelic to AOA2.^{27–29} Amyotrophic lateral sclerosis 4^{28,29} was linked to chromosome 9q34³⁰ and the candidate region was further refined to a 3cM interval on chromosome 9q34 that included *SETX*. It has an autosomal dominant transmission and is characterized by a juvenile age at onset (mean age, 23 years; age range, 1–63 years with asymptomatic carriers), a slow progression, distal limb amyotrophy, and pyramidal signs associated with severe loss of motor neurons in the brainstem and spinal cord.³¹ Three mutations responsible for this disease have been identified in *SETX*.³² They are L389S, R2136H, and T31 substitutions with only the second being in the helicase domain.

The description of this new French-Canadian founder effect for AOA2 helps define its phenotype particularly by underlining that oculomotor apraxia is not a universal finding in this ataxia. This raises the concern that AOA2 may not be the best nosographic label for this condition. We would favor a name such as SCAN2 to distinguish it from SCAN1. Stressing the association between the ataxia and the neuropathy will help clinicians in their workup of these patients to distinguish them from the more common Friedreich's ataxia. In French Canada, the identification of four causal mutations will greatly improve diagnosis and genetic counseling. The high carrier rate of the common mutation in the Gaspésie region will require the design of better information programs for families and the local communities.

This study was supported by the Association Canadienne des Ataxies Familiales and the Neuromuscular Research Partnership Program of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR 116842), Muscular Dystrophy Canada (MDC), the Canadian Amyotrophic Lateral Sclerosis Association, and the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ; Salary Support Scholarship, B.B.).

We thank all the patients and their families for their essential participation in this study. We also thank our colleagues Serge Melançon, Massimo Pandolfo, and Andrea Richter for providing samples. We acknowledge the technical support of the Genome Quebec Innovation Centre in the sequencing.

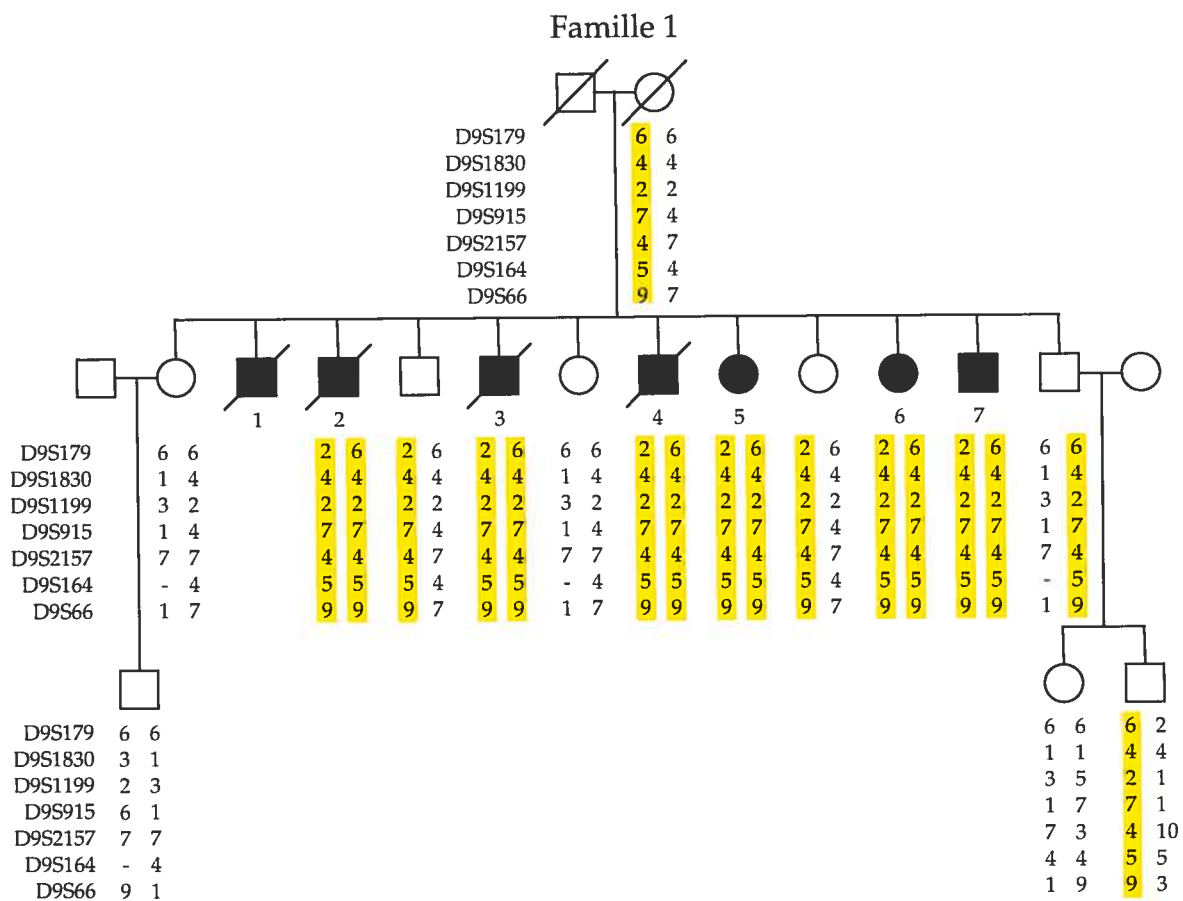
References

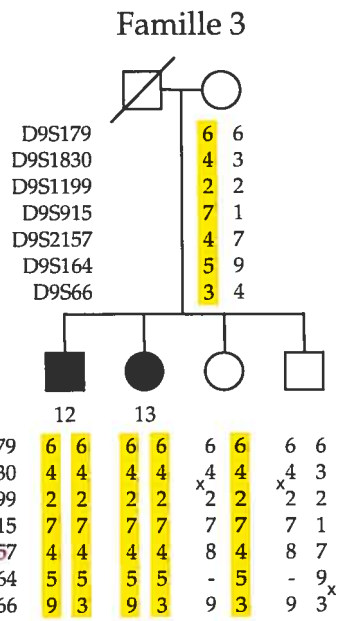
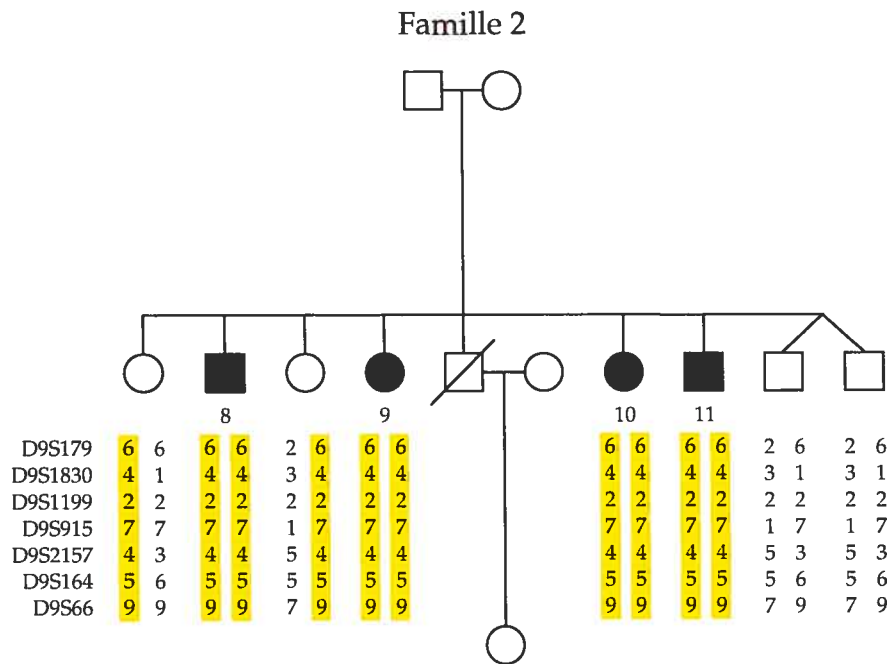
- Harding AE. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1983;1:1151–1155.
- Brais B, Bouchard JP, Xie YG, et al. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;18:164–167.
- Howard HC, Mount DB, Rochefort D, et al. The K-CI cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet* 2002;32:384–392.
- Engert JC, Berube P, Mercier J, et al. ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat Genet* 2000;24:120–125.
- Bouchard J BP, Bouchard R. Study of a family with progressive ataxia, tremor and severe distal amyotrophy. *Can J Neurol Sci* 1980;7:345–349.
- Aicardi JBC, Andermann E, Andermann F, et al. Ataxia-ocular motor apraxia: a syndrome mimicking ataxia-telangiectasia. *Ann Neurol* 1988;24:497–502.
- Barbot C, Coutinho P, Choroa R, et al. Recessive ataxia with ocular apraxia: review of 22 Portuguese patients. *Arch Neurol* 2001;58:201–205.
- Shimazaki H, Takiyama Y, Sakoe K, et al. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia: the aprataxin gene mutations. *Neurology* 2002;59:590–595.
- Takahima H, Boerkoel CF, John J, et al. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat Genet* 2002;32:267–272.
- Watanabe M, Sugai Y, Concannon P, et al. Familial spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy, peripheral neuropathy, and elevated level of serum creatine kinase, gamma-globulin, and alpha-fetoprotein. *Ann Neurol* 1998;44:265–269.
- Nemeth AH, Bochukova E, Dunne E, et al. Autosomal recessive cerebellar ataxia with oculomotor apraxia (ataxia-telangiectasia-like syndrome) is linked to chromosome 9q34. *Am J Hum Genet* 2000;67:1320–1326.
- Bomont P, Watanabe M, Gershoni-Barush R, et al. Homozygosity mapping of spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy and peripheral neuropathy to 9q33–34, and with hearing impairment and optic atrophy to 6p21–23. *Eur J Hum Genet* 2000;8:986–990.
- Moreira MC, Klur S, Watanabe M, et al. *Senataxin*, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nat Genet* 2004;36:225–227.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- Bourgeois S, Labuda D. Dynamic allele-specific oligonucleotide hybridization on solid support. *Anal Biochem* 2004;324:309–311.

16. Koeppe AH, Coutinho P, Barbot C. Ocular apraxia in recessive ataxia. *Arch Neurol* 2002;59:874.
17. Gatti RA. The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncol* 2001;40:702-711.
18. de Graaf AS, de Jong G, Kleijer WJ. An early-onset recessive cerebellar disorder with distal amyotrophy and, in two patients, gross myoclonia: a probable ataxia telangiectasia variant. *Clin Neurol Neurosurg* 1995;97:1-7.
19. McCabe DJ, Ryan F, Moore DP, et al. Typical Friedreich's ataxia without GAA expansions and GAA expansion without typical Friedreich's ataxia. *J Neurol* 2000;247:346-355.
20. Le Ber I, Bouslam N, Rivaud-Pechoux S, et al. Frequency and phenotypic spectrum of ataxia with oculomotor apraxia 2: a clinical and genetic study in 18 patients. *Brain* 2004;127:759-767.
21. Izatt L, Nemeth AH, Meesaq A, et al. Autosomal recessive spinocerebellar ataxia and peripheral neuropathy with raised alpha-fetoprotein. *J Neurol* 2004;251:805-812.
22. Date H, Onodera O, Tanaka H, et al. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat Genet* 2001;29:184-188.
23. Winey M, Culbertson MR. Mutations affecting the tRNA-splicing endonuclease activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1988;118:609-617.
24. Ursic D, Himmel KL, Gurley KA, et al. The yeast SEN1 gene is required for the processing of diverse RNA classes. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4778-4785.
25. Rasmussen TP, Culbertson MR. The putative nucleic acid helicase Sen1p is required for formation and stability of termini and for maximal rates of synthesis and levels of accumulation of small nucleolar RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1998;18:6885-6896.
26. Ursic D, DeMarini DJ, Culbertson MR. Inactivation of the yeast Sen1 protein affects the localization of nucleolar proteins. *Mol Gen Genet* 1995;249:571-584.
27. Saar K, Al-Gazali L, Sztriha L, et al. Homozygosity mapping in families with Joubert syndrome identifies a locus on chromosome 9q34.3 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1999;65:1666-1671.
28. Megarbane A, Delague V, Salem N, Loiselet J. Autosomal recessive congenital cerebellar hypoplasia and short stature in a large inbred family. *Am J Med Genet* 1999;87:88-90.
29. Delague V, Bareil C, Bouvagnet P, et al. A new autosomal recessive non-progressive congenital cerebellar ataxia associated with mental retardation, optic atrophy, and skin abnormalities (CAMOS) maps to chromosome 15q24-q26 in a large consanguineous Lebanese Druze Family. *Neurogenetics* 2002;4:23-27.
30. Chance PF, Rabin BA, Ryan SG, et al. Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34. *Am J Hum Genet* 1998;62:633-640.
31. Rabin BA, Griffin JW, Crain BJ, et al. Autosomal dominant juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 1999;122(pt 8):1539-1550.
32. Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM, et al. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet* 2004;74:1128-1135.

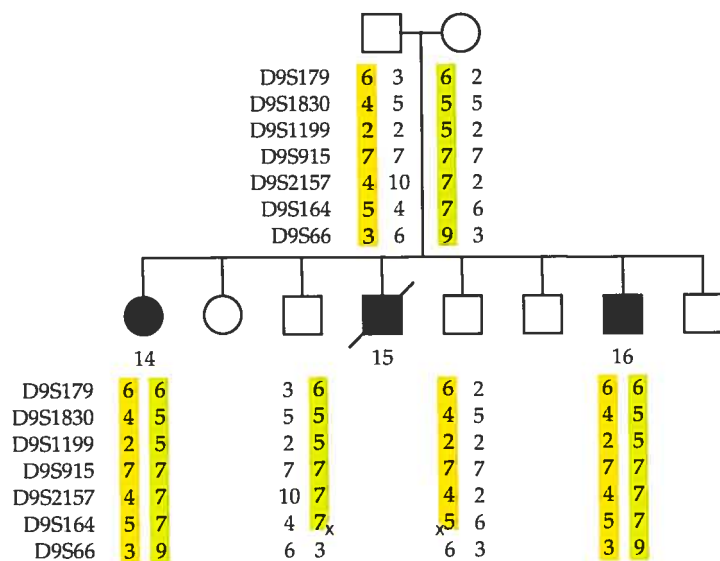
Annexe 3

Pedigrees et haplotypes générés par GENEHUNTER pour dix familles de patients atteints d'AOA2

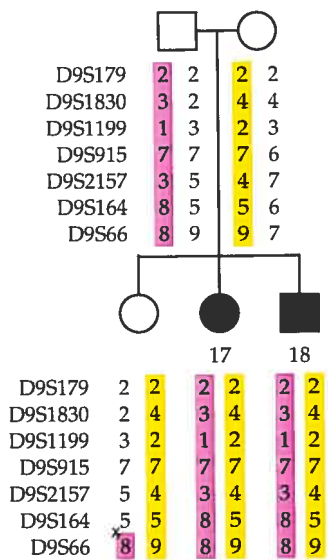




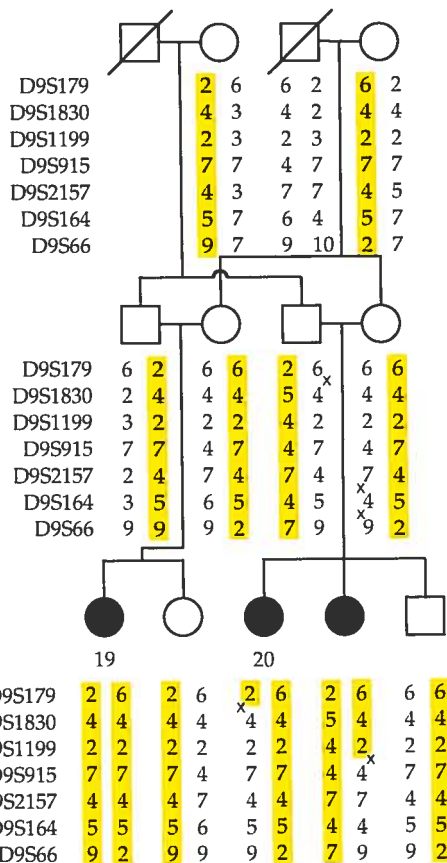
Famille 4



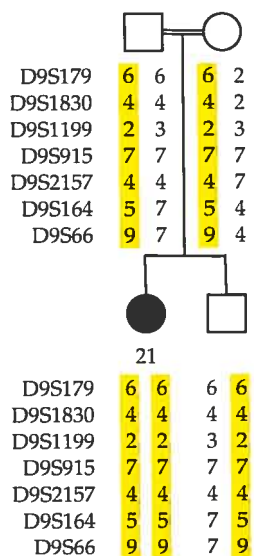
Famille 5



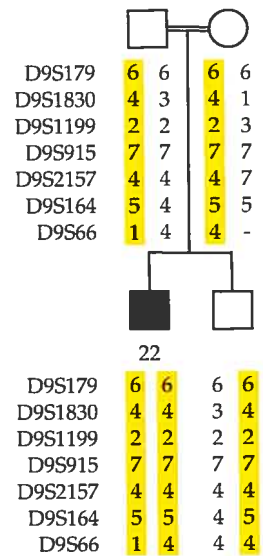
Famille 6



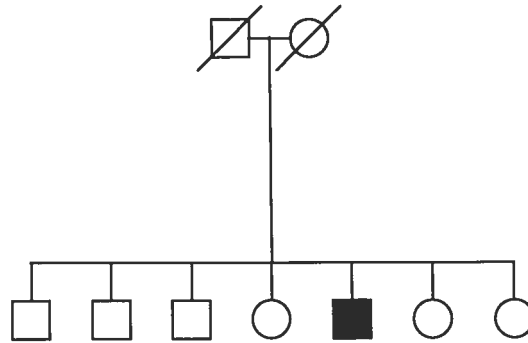
Famille 7



Famille 8

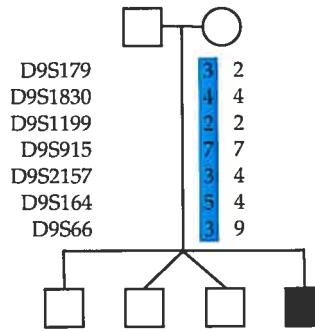


Famille 9



D9S179	6	2	6	6
D9S1830	4	4	4	4
D9S1199	2	2	2	2
D9S915	7	7	7	7
D9S2157	4	7	4	7
D9S164	4	4	5	4
D9S66	9	9	9	9

Famille 10

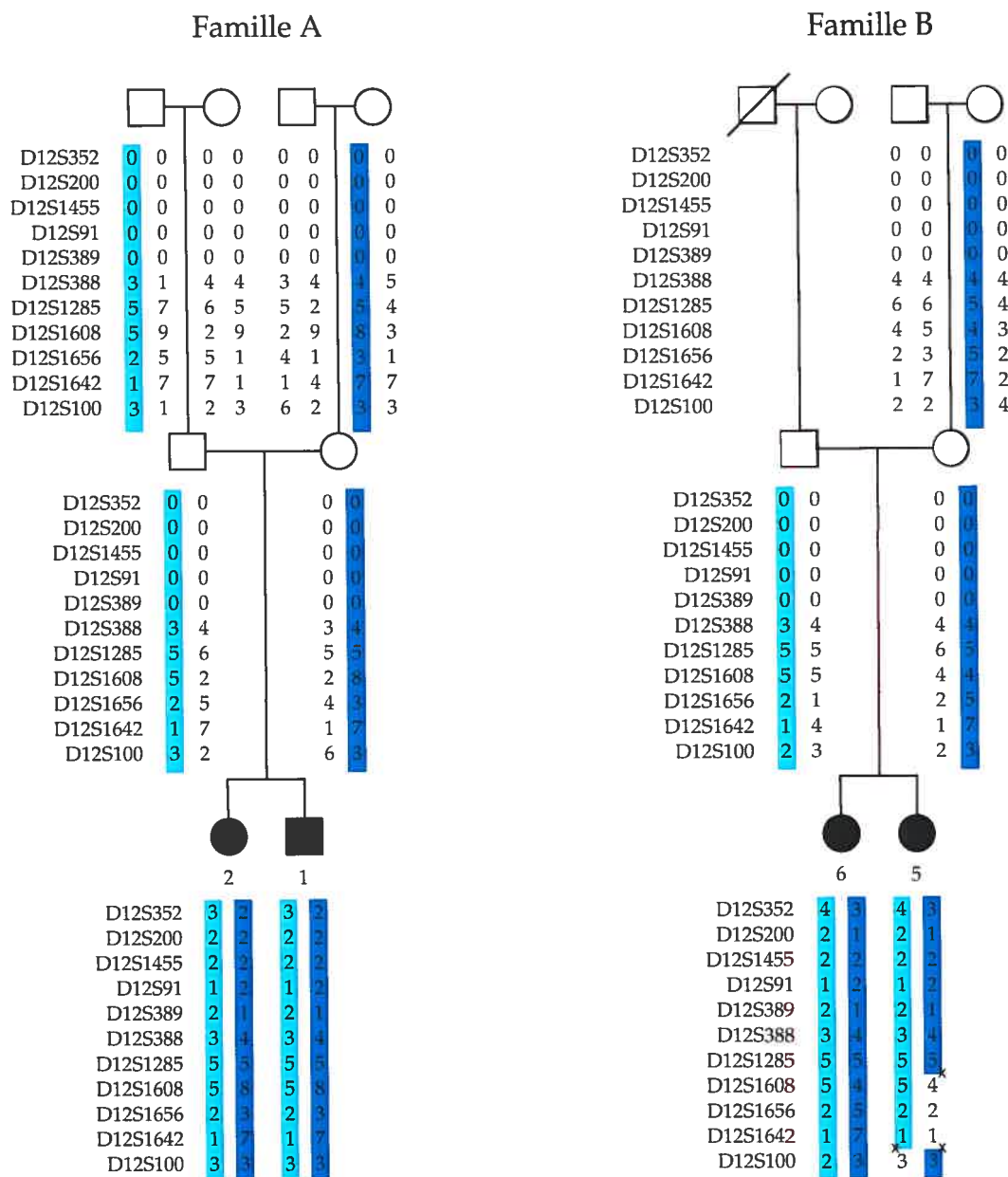


D9S179			3	2
D9S1830			4	4
D9S1199			2	2
D9S915			7	7
D9S2157			3	4
D9S164			5	4
D9S66			3	9

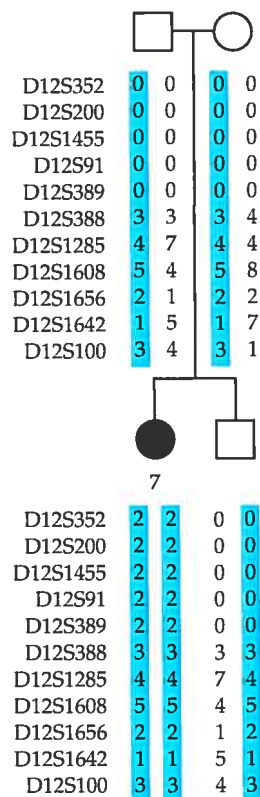
D9S179	6	2	6	3
D9S1830	4	4	4	4
D9S1199	2	2	2	2
D9S915	4	7	7	7
D9S2157	4	4	4	3
D9S164	6	4	4	5
D9S66	9	9	9	3

Annexe 4

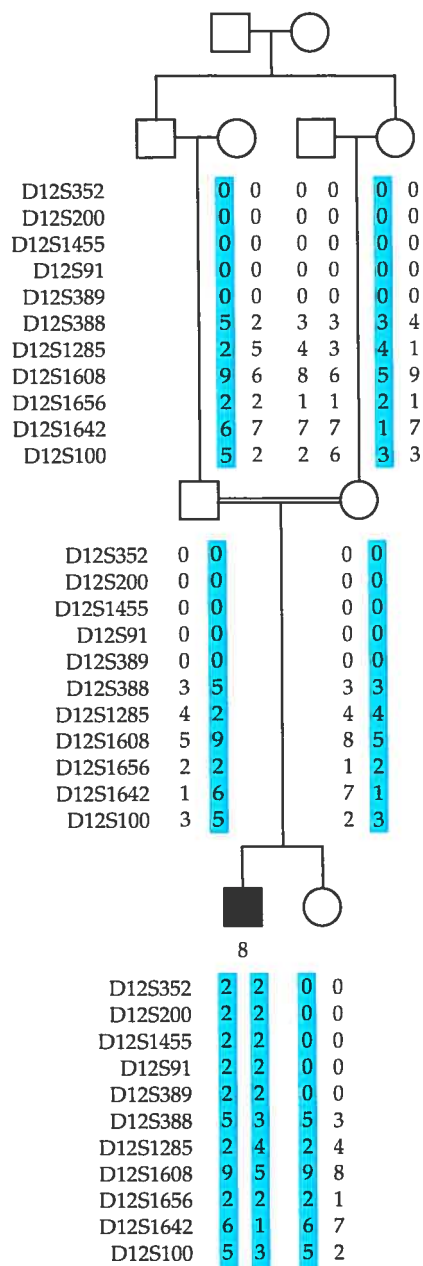
Pedigrees et haplotypes générés par GENEHUNTER pour 12 familles de patients atteints de NHSA2



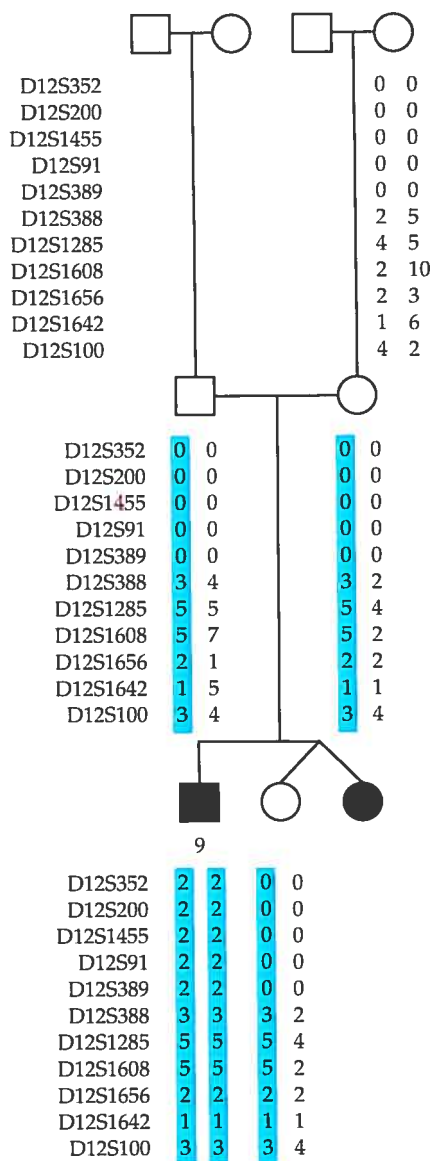
Famille C



Famille D

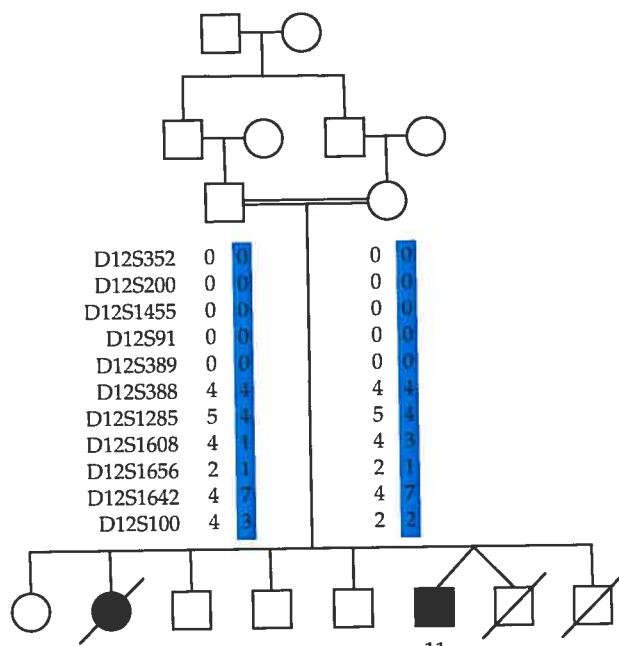


Famille E



9

Famille F



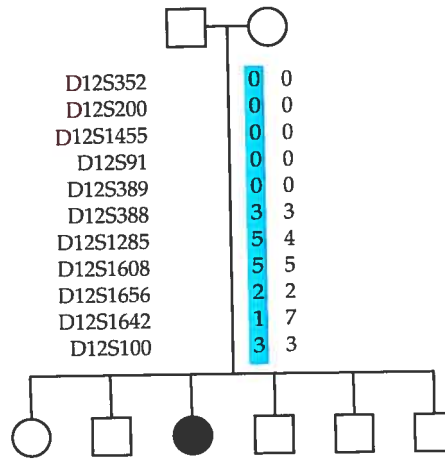
D12S352	0	0	0	0
D12S200	0	0	0	0
D12S1455	0	0	0	0
D12S91	0	0	0	0
D12S389	0	0	0	0
D12S388	4	4	4	4
D12S1285	5	4	5	4
D12S1608	4	1	4	3
D12S1656	2	1	2	1
D12S1642	4	7	4	7
D12S100	4	3	2	2

D12S352	0	0	0	0	3	3
D12S200	0	0	0	0	2	2
D12S1455	0	0	0	0	2	2
D12S91	0	0	0	0	1	1
D12S389	0	0	0	0	1	1
D12S388	4	4	4	4	4	4
D12S1285	5	4	4	4	5	5
D12S1608	4	3	1	1	4	4
D12S1656	2	1	1	1	2	2
D12S1642	4	7	7	7	4	4
D12S100	4	2	3	2	4	2

11

x4

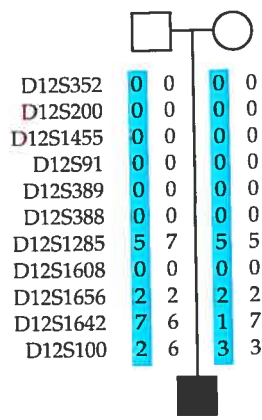
Famille G



12

D12S352	0	0	0	0	0	0	0	0
D12S200	0	0	0	0	0	0	0	0
D12S1455	0	0	0	0	0	0	0	0
D12S91	0	0	0	0	0	0	0	0
D12S389	0	0	0	0	0	0	0	0
D12S388	3	3	3	3	4	3	4	3
D12S1285	5	4	5	5	5	4	5	5
D12S1608	5	5	5	5	4	5	5	5
D12S1656	2	2	2	2	2	2	2	2
D12S1642	1	7	1	1	1	7	1	7
D12S100	4	3	3	3	4	3	4	3

Famille H



13

D12S352	2	2
D12S200	2	2
D12S1455	2	2
D12S91	2	2
D12S389	2	2
D12S388	0	0
D12S1285	5	5
D12S1608	0	0
D12S1656	2	2
D12S1642	7	1
D12S100	2	3

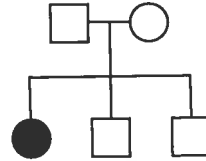
Famille I



14

D12S352	4	3
D12S200	2	1
D12S1455	2	2
D12S91	2	1
D12S389	2	1
D12S388	4	3
D12S1285	5	5
D12S1608	5	4
D12S1656	2	2
D12S1642	4	1
D12S100	3	2

Famille J



10

D12S352	2	2
D12S200	2	2
D12S1455	2	2
D12S91	2	2
D12S389	2	2
D12S388	3	3
D12S1285	5	5
D12S1608	5	5
D12S1656	2	2
D12S1642	1	1
D12S100	3	3

Famille K



4

D12S352	0	0
D12S200	0	0
D12S1455	0	0
D12S91	0	0
D12S389	0	0
D12S388	4	5
D12S1285	5	6
D12S1608	4	9
D12S1656	2	3
D12S1642	4	7
D12S100	4	2
D12S352	3	2
D12S200	2	2
D12S1455	2	1
D12S91	2	1
D12S389	2	1
D12S388	3	4
D12S1285	5	5
D12S1608	5	4
D12S1656	2	2
D12S1642	1	4
D12S100	3	2

Famille L



15

16

D12S352	0	0	0	0
D12S200	0	0	0	0
D12S1455	0	0	0	0
D12S91	0	0	0	0
D12S389	0	0	0	0
D12S388	0	0	0	0
D12S1285	5	5	5	5
D12S1608	5	5	5	5
D12S1656	2	2	0	0
D12S1642	3	1	0	0
D12S100	3	2	0	0

Légende pour les annexes 3 et 4 :

- : Femme saine
- : Homme sain
- : Femme atteinte
- : Homme atteint
- ◇ : Individu décédé
- : Parents
- =○ : Parents consanguins
- □ : Jumeaux
- 1 : Numéro de patient
- D12SX : Marqueur
- x : Recombinaison
- : Chromosome porteur de la mutation c.5927T→G (L1976R)
- : Chromosome porteur de la mutation c.4087C→T (R1363X)
- : Chromosome porteur de la mutation c.5070insT (fs après 1690)
- : Chromosome porteur de la mutation c.195G→A (E65K)
- : Chromosome porteur de la mutation c.943C→T
- : Chromosome porteur de la mutation c.918-919insA
- Annexe 3
- Annexe 4

Annexe 5

Accords des coauteurs pour les deux articles.

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Two mutations in the *HSN2* gene explain the high prevalence of HSAN2 in French Canadians.

Auteurs :

K. Roddier, T. Thomas, G. Marleau, A.M. Gagnon, M.J. Dicaire, A. St-Denis, I. Gosselin, A.M. Sarrazin, A. Larbrisseau, M. Lambert, M. Vanasse, D. Gaudet, G.A. Rouleau and B. Brais.

Journal et date d'acceptation :

Neurology, accepté le 25 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NHSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

Isabelle Gosselin
Coauteur

14-02-05
Date

M. J. DICAIRE
Coauteur

17-02-05
Date

Bernard Brais
Coauteur

05-03-28
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Two mutations in the *HTN2* gene explain the high prevalence of HSN2 in French Canadians.

Auteurs :

K. Roddier, T. Thomas, G. Marceau, A.M. Gagnon, M.J. Dicaire, A. St-Denis, I. Gosselet, A.M. Sarrazin, A. Larbrisseau, M. Lambert, M. Vanasse, D. Gaudet, G.A. Rouleau and B. Brais.

Journal et date d'acceptation :

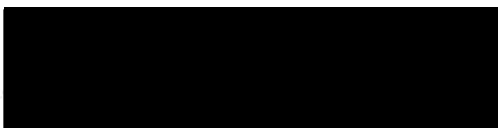
Neurology, accepté le 25 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la HNSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

ANNE-MARIE GAGNON

Coeuteur



16/02/05

Date

.....
Coeuteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coeuteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coeuteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coeuteur

.....
Signature

.....
Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Two mutations in the *HSN2* gene explain the high prevalence of HSN2 in French Canadians.

Auteurs :

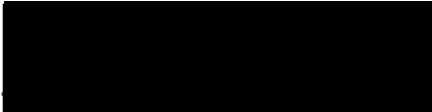
K. Roddier, T. Thomas, G. Marleau, A.M. Gagnon, M.J. Dicalre, A. St-Denis, I. Gosselin, A.M. Sarrazin, A. Larbrisseau, M. Lambert, M. Vanasse, D. Gaudet, G.A. Rouleau and B. Brais.

Journal et date d'acceptation :

Neurology, accepté le 25 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NLSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

DANIEL GAUDET.....		02/16/2005
Coauteur	Signature	Date
.....
Coauteur	Signature	Date
.....
Coauteur	Signature	Date
.....
Coauteur	Signature	Date
.....
Coauteur	Signature	Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Two mutations in the *HSN2* gene explain the high prevalence of HSAN2 in French Canadians.

Auteurs :

K. Roddier, T. Thomas, G. Marleau, A.M. Gagnon, M.J. Dicaire, A. St-Denis, I. Gosselin, A.M. Sarrazin, A. Larbrisseau, M. Lambert, M. Vanasse, D. Gaudet, G.A. Rouleau and B. Brais.

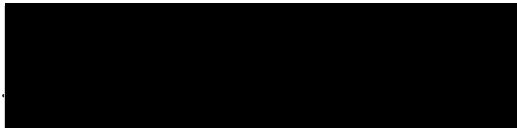
Journal et date d'acceptation :

Neurology, accepté le 25 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NHSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

VANASSE, MICHEL
Coauteur



17 février 2005
Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Two mutations in the *HSN2* gene explain the high prevalence of HSAN2 in French Canadians.

Auteurs :

K. Roddier, T. Thomas, G. Marleau, A.M. Gagnon, M.J. Dicaire, A. St-Denis, I. Gosselin, A.M. Sarrazin, A. Larbrisseau, M. Lambert, M. Vanasse, D. Gaudet, G.A. Rouleau and B. Brais.

Journal et date d'acceptation :

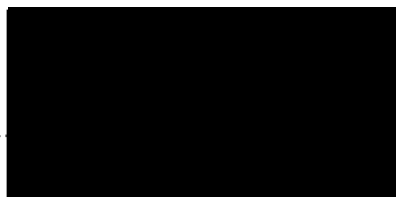
Neurology, accepté le 25 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NNSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

Geneviève Marleau

Coauteur



17 février 05

Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Two mutations in the *HSN2* gene explain the high prevalence of HSN2 in French Canadians.

Auteurs :

K. Roddier, T. Thomas, G. Marleau, A.M. Gagnon, M.J. Dicaire, A. St-Denis, I. Gosselin, A.M. Sarrazin, A. Larbrisseau, M. Lambert, M. Vanasse, D. Gaudet, G.A. Rouleau and B. Brais.

Journal et date d'acceptation :

Neurology, accepté le 25 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NLSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

ANIK ST-DENIS [Signature] 05-02-22
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Two mutations in the *HSN2* gene explain the high prevalence of HSN2 in French Canadians.

Auteurs :

K. Roddier, T. Thomas, G. Marleau, A.M. Gagnon, M.J. Dicaire, A. St-Denis, I. Gosselin, A.M. Sarrazin, A. Larbrisseau, M. Lambert, M. Vanasse, D. Gaudet, G.A. Rouleau and B. Brais.

Journal et date d'acceptation :

Neurology, accepté le 25 janvier 2005.

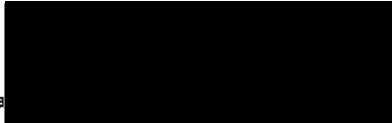
Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NLSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

Anne-Marie SARRAZIN

Coauteur

Signature



Date

25/1/2005

Coauteur

Signature

Date

Coauteur

Signature

Date

Coauteur

Signature

Date

Coauteur

Signature

Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Two mutations in the *HSN2* gene explain the high prevalence of HSN2 in French Canadians.

Auteurs :

K. Roddier, T. Thomas, G. Marleau, A.M. Gagnon, M.J. Dicaire, A. St-Denis, I. Gosselin, A.M. Sarrazin, A. Larbrisseau, M. Lambert, M. Vanasse, D. Gaudet, G.A. Rouleau and B. Brais.

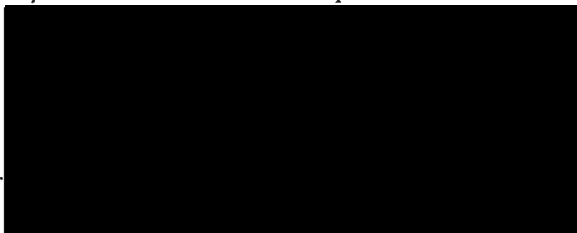
Journal et date d'acceptation :

Neurology, accepté le 25 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NLSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

GUY ROULEAU
.....
Coauteur



28/2/05
.....
Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Two mutations in the *HSN2* gene explain the high prevalence of HSN2 in French Canadians.

Auteurs :

K. Roddier, T. Thomas, G. Marleau, A.M. Gagnon, M.J. Dicaire, A. St-Denis, I. Gosselin, A.M. Sarrazin, A. Larbrisseau, M. Lambert, M. Vanasse, D. Gaudet, G.A. Rouleau and B. Brais.

Journal et date d'acceptation :

Neurology, accepté le 25 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NHSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

ALBERT LARBRISSEAU	[Signature redacted]	17/02/05
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Two mutations in the *HSN2* gene explain the high prevalence of HSAN2 in French Canadians.

Auteurs :

K. Roddier, T. Thomas, G. Marleau, A.M. Gagnon, M.J. Dicaire, A. St-Denis, I. Gosselin, A.M. Sarrazin, A. Larbrisseau, M. Lambert, M. Vanasse, D. Gaudet, G.A. Rouleau and B. Brais.

Journal et date d'acceptation :

Neurology, accepté le 25 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NHTA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

MARIE Lambert		29 mars 2005
Coauteur	Signature	Date

Coauteur	Signature	Date

Coauteur	Signature	Date

Coauteur	Signature	Date

Coauteur	Signature	Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Mutations in *senataxin* responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy.

Auteurs :

Antoine Duquette, Katel Roddier, Julia Mc Nabb-Baltar, Isabelle Gosselin, Anik St-Denis, Marie-Josée Dicaire, Lina Loisel, Damian Labuda, Luc Marchand, Jean Mathieu, Jean-Pierre Bouchard and Bernard Brais.

Journal et date d'acceptation :

Annals of Neurology, accepté le 4 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NLSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

Isabelle Gosselin
Coauteur

14-02-05
Date

M. JOSÉE DICAIRE
Coauteur

17-2-2005
Date

ANTOINE DUQUETTE
Coauteur

17/02/05
Date

Lina Loisel
Coauteur

12/03/2005
Date

Bernard Brais
Coauteur

05-03-20
Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Mutations in *senataxin* responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy.

Auteurs :

Antoine Duquette, Katel Roddier, Julia Mc Nabb-Baltar, Isabelle Gosselin, Anik St-Denis, Marie-Josée Dicaire, Lina Loisel, Damian Labuda, Luc Marchand, Jean Mathieu, Jean-Pierre Bouchard and Bernard Brais.

Journal et date d'acceptation :

Annals of Neurology, accepté le 4 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NHS2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-français : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

.....	[REDACTED]	05.02.16
Coauteur Signa		Coauteur Signature Date		
.....			
Coauteur Signat		Coauteur Signature Date		
.....			
Coauteur Signat		Coauteur Signature Date		

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Mutations in *senataxin* responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy.

Auteurs :

Antoine Duquette, Katel Roddier, Julia Mc Nabb-Baltar, Isabelle Gosselin, Anik St-Denis, Marie-Josée Dicaire, Lina Loisel, Damian Labuda, Luc Marchand, Jean Mathieu, Jean-Pierre Bouchard and Bernard Brais.

Journal et date d'acceptation :

Annals of Neurology, accepté le 4 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NHSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

JEAN-PIERRE BOUCHARD
Coauteur



18/FEV./2005
Date

..... Coauteur Signature Date
..... Coauteur Signature Date
..... Coauteur Signature Date
..... Coauteur Signature Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Mutations in *senataxin* responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy.

Auteurs :

Antoine Duquette, Katel Roddier, Julia Mc Nabb-Baltar, Isabelle Gosselin, Anik St-Denis, Marie-Josée Dicaire, Lina Loisel, Damian Labuda, Luc Marchand, Jean Mathieu, Jean-Pierre Bouchard and Bernard Brais.

Journal et date d'acceptation :

Annals of Neurology, accepté le 4 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NLSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

ANIK ST-DENIS
Coauteur



05-02-2005
Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Mutations in *senataxin* responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy.

Auteurs :

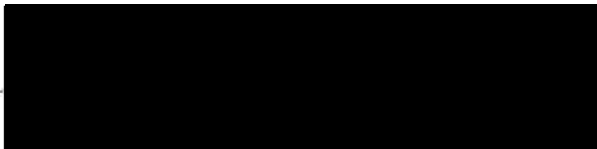
Antoine Duquette, Katel Roddier, Julia Mc Nabb-Baltar, Isabelle Gosselin, Anik St-Denis, Marie-Josée Dicaire, Lina Loisel, Damian Labuda, Luc Marchand, Jean Mathieu, Jean-Pierre Bouchard and Bernard Brais.

Journal et date d'acceptation :

Annals of Neurology, accepté le 4 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NLSA2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

JULIA MCNABB-BALTAR..... 02/03/05
Coauteur  Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Mutations in *senataxin* responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy.

Auteurs :

Antoine Duquette, Katel Roddier, Julia Mc Nabb-Baltar, Isabelle Gosselin, Anik St-Denis, Marie-Josée Dicaire, Lina Loisel, Damian Labuda, Luc Marchand, Jean Mathieu, Jean-Pierre Bouchard and Bernard Brais.

Journal et date d'acceptation :

Annals of Neurology, accepté le 4 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NHS2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec



.....
Coauteur



.....
21/3/05
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Katel Roddier
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

Mutations in *senataxin* responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy.

Auteurs :

Antoine Duquette, Katel Roddier, Julia Mc Nabb-Baltar, Isabelle Gosselin, Anik St-Denis, Marie-Josée Dicaire, Lina Loisel, Damian Labuda, Luc Marchand, Jean Mathieu, Jean-Pierre Bouchard and Bernard Brais.

Journal et date d'acceptation :

Annals of Neurology, accepté le 4 janvier 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Katel Roddier inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Identification des mutations responsables de la NHS2 et de l'AOA2 dans la population canadienne-française : Deux nouveaux exemples de maladies à effet fondateur au Québec

DAMIAN LABUDA		30/03/05
Coauteur	Signature	Date

Coauteur	Signature	Date

Coauteur	Signature	Date

Coauteur	Signature	Date

Coauteur	Signature	Date

