



Université de Montréal

**Caractérisation clinique et génétique d'une famille canadienne-française atteinte de  
la neuropathie héréditaire sensitive avec rétinite pigmentaire et ataxie**

**Par**

**Maria Lisa Putorti**

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

En vue de l'obtention du grade de Maîtrise en biologie moléculaire

Avril, 2010

© Maria Lisa Putorti, 2010

Université de Montréal

Faculté de médecine

**Ce mémoire intitulé :**

**Caractérisation clinique et génétique d'une famille canadienne-française atteinte de la neuropathie héréditaire sensitive avec rétinite pigmentaire et ataxie**

**Présenté par :**

**Maria Lisa Putorti**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

<sup>Dr</sup> Daniel Sinnett

Président-rapporteur

<sup>Dr</sup> Bernard Brais

Directeur de recherche

<sup>Dr</sup> Jacques Michaud

Membre du jury

## Résumé

La complexité de l'étude des neuropathies héréditaires provient de leur hétérogénéité clinique et génétique et de la diversité des fibres composant les nerfs périphériques. Cette complexité se reflète dans les nombreuses classifications différentes. Les neuropathies héréditaires se classifient entre autres selon leur mode de transmission et leur atteinte sensitive, autonome et motrice. Les neuropathies héréditaires sensibles et autonomiques (NHSA) se présentent avec une perte de la sensation distale aux membres, accompagnée d'autres manifestations selon le type de NHSA. L'étude des NHSA est facilitée lorsqu'il existe des grappes de familles originaires de régions du Québec où des effets fondateurs pour des maladies récessives ont déjà été identifiés. Nous avons recruté une grande famille canadienne-française originaire de Paspébiac dans la Baie-des-Chaleurs dans laquelle nous avons identifié quatre cas atteints d'une neuropathie héréditaire sensitive avec rétinite pigmentaire et ataxie (NHSRPA). Nous avons émis l'hypothèse que nous étions en présence d'une nouvelle forme de neuropathie héréditaire sensitive récessive à effet fondateur. Afin d'identifier la position chromosomique du gène muté responsable de la NHSRPA, nous avons tout d'abord complété un criblage du génome en génotypant des marqueurs microsatellites «single tandem repeat» (STR) sur des individus clés et nous avons ensuite procédé à une analyse de liaison génétique paramétrique. Ces études nous ont permis de lier cette famille au chromosome 1 et de définir un premier intervalle candidat de 6,7 Mb. Grâce à un génotypage de marqueurs «single nucleotide polymorphism» (SNP), nous avons réduit l'intervalle candidat à 5,3 Mb au locus 1q32,2-q32,3. Cette région contient 44 gènes candidats. Une revue plus fine de la littérature a fait ressortir qu'une famille espagnole et une américaine de souche hollandaise souffrant de la même maladie avaient déjà été liées au même locus. L'origine possiblement basque de notre famille gaspésienne nous a poussé à comparer l'haplotype porteur avec celui de la famille espagnole qui, quoi que gitane, provient du pays basque espagnol. Ces travaux ont démontré le partage d'une région de 203 kb. Afin de rétrécir davantage notre intervalle candidat, nous avons comparé les haplotypes des cas entre les deux familles et nous avons identifié un dernier intervalle candidat de 60 SNP au locus 1q32,3. Cette région ne contient que quatre gènes candidats dont le plus intéressant est le gène «activating transcription factor» (ATF3). À ce jour, aucune mutation n'a été trouvée dans le gène ATF3 et les gènes FAM71A, BATF3 et NSL1. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin d'identifier le gène muté responsable de la NHSRPA.

## **Mots clés**

Neuropathie héréditaire sensitive, rétinite pigmentaire, ataxie, effet fondateur, criblage génomique, cartographie de l'homozygoté et identité par la descendance

## Abstract

Hereditary neuropathies study's complexity comes from their clinical and genetic heterogeneity and the peripheral nerves fibers' diversity. This complexity leads to numerous different classifications. Hereditary neuropathies are classified based on the transmission mode and the sensitive, autonomic and motor affection. Hereditary sensory and autonomic neuropathies (HSAN) present themselves with members' distal loss and other manifestations depending on the HSAN type. HSAN study can be facilitated when there are existing family grapes originating from Quebec regions where recessive diseases founder effects have been identified. We have recruited a large French-Canadian family originating from Paspébiac in the Baie-des-Chaleurs in which we have identified four cases affected by a hereditary sensory neuropathy with retinitis pigmentosa and ataxia (HSNRPA). We have hypothesized that we were in presence of a new form of recessive hereditary sensitive neuropathy with founder effect. In order to identify the HSNRPA causing mutated gene chromosomal position, we first completed a genome wide scan by genotyping microsatellite single tandem repeat (STR) markers on informative individuals and we have then proceeded to a parametric genetic linkage analysis. These studies allowed us to link this family to chromosome 1 and define a first candidate interval of 6.7 Mb. Second to the single nucleotide polymorphism (SNP) markers genotyping, we have reduced the candidate interval at 5.3 Mb on locus 1q32.2-q32.3. This region contains 44 genes. A finer literature review made us realize that a Spanish family and an American from Dutch origin suffering from the same disease had already been linked to the same locus. The possible Gaspesian family's Basque origins brought us to compare their carrier haplotype with the Spanish family's, although Gypsy but coming from the Spanish Basque country. This work has demonstrated a shared region of 203 kb. In order to further refine our candidate interval, we have compared the haplotypes of the cases between the two families and we have identified a last candidate interval of 60 SNP at locus 1q32.3. This region contains only four candidate genes, the activating transcription factor (ATF3) gene being the most interesting one. Until today, no mutation has been found in the ATF3 gene and in the FAM71A, BATF3 and NSL1 genes. Further experiments will be necessary in order to identify the HSNRPA causing mutated gene.

## **Key words**

Sensory hereditary neuropathy, retinitis pigmentosa, ataxia, founder effect, genome-wide scan, homozygosity mapping and identity by descent

## Table des matières

Résumé	iii
Mots clés	iv
Abstract	v
Key words	vi
Table des matières	vii
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xi
Liste des sigles et abréviations	xii
Remerciements	xv
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Neuropathies héréditaires</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Neuropathies héréditaires sensitives et autonomiques</b>	<b>1</b>
1.2.1 Point de vue clinique	1
1.2.2 Point de vue moléculaire	2
1.2.3 Point de vue génétique	3
<b>1.3 Classification des neuropathies héréditaires sensitives dominantes</b>	<b>4</b>
1.3.1 Neuropathie héréditaire sensitive IA	4
1.3.2 Neuropathie héréditaire sensitive IB	4
1.3.3 Neuropathie héréditaire sensitive IC	4
1.3.4 Neuropathie héréditaire sensitive ID	5
<b>1.4 Classification des neuropathies héréditaires sensitives et autonomiques récessives</b>	<b>5</b>
1.4.1 Neuropathie héréditaire sensitive autonome II	5
1.4.2 Neuropathie héréditaire sensitive autonome IIB	6
1.4.3 Neuropathie héréditaire sensitive autonome III	6
1.4.4 Neuropathie héréditaire sensitive autonome IV	6
1.4.5 Neuropathie héréditaire sensitive autonome V de l'enfance	7
1.4.6 Neuropathie héréditaire sensitive autonome V congénitale	7
<b>1.5 Mécanismes moléculaires pathogéniques</b>	<b>10</b>
<b>1.6 Maladies à effets fondateurs québécois</b>	<b>12</b>



<b>1.7 Approches pour identifier les gènes causant les maladies</b>	<b>13</b>
1.7.1 Clonage positionnel	13
1.7.2 Marqueurs génétiques	14
1.7.3 Cribles génomiques et analyses de liaison	14
1.7.4 Cartographie de l'homozygoté	15
<b>1.8 Projet de Maîtrise</b>	<b>16</b>
1.8.1 Recrutement de la famille atteinte de la NHRPA	16
1.8.2 Phénotype de la NHRPA	19
1.8.2.1 Rétinite pigmentaire	19
1.8.3 Hypothèse	23
1.8.4 But et objectifs	23
1.8.5 Rationalisation	23
<b>CHAPITRE 2 RÉSULTATS</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Résultats préliminaires</b>	<b>24</b>
2.1.1 Matériel et méthodes	24
2.1.1.1 Crible génomique	24
2.1.1.2 Cartographie fine	24
2.1.1.3 Analyse de liaison	25
2.1.2 Identification du locus lié à la NHRPA	27
2.1.3 Séquençage des gènes candidats	33
2.1.3.1 Séquençage du gène SYT14	33
2.1.3.2 Séquençage du gène SERTAD4	33
2.1.3.3 Séquençage du gène HHAT	34
2.1.3.4 Séquençage du gène KCNH1	34
2.1.3.5 Séquençage du gène CR621662	34
2.1.3.6 Séquençage du gène RCOR3	34
2.1.3.7 Séquençage du gène RD3	34
2.1.3.8 Séquençage du gène INTS7	35
2.1.3.9 Séquençage du gène DTL	35
2.1.3.10 Séquençage du gène PPP2R5A	35
2.1.3.11 Séquençage du gène SNORA16B	35
2.1.3.12 Séquençage du gène TMEM206	35
2.1.3.13 Séquençage du gène NENF	36
2.1.3.14 Séquençage du gène CR624623	36

2.1.3.15 Séquençage du gène TATDN3	36
2.1.3.16 Séquençage du gène LOC149643	36
2.1.3.17 Séquençage du gène FAM71A	36
2.1.3.18 Séquençage du gène BATF3	36
2.1.3.19 Séquençage du gène NSL1	37
2.1.3.20 Séquençage du gène ATF3	37
<b>CHAPITRE 3 ARTICLE</b>	<b>43</b>
3.1 Introduction	43
3.1.1 Phénotype de l'ACPRP	43
3.1.2 Cartographie du locus lié à l'ACPRP	44
3.1.3 Hypothèse	44
3.1.4 But et objectifs	44
3.1.5 Accord des coauteurs	46
3.1.6 Contributions des coauteurs	47
3.2 Transatlantic identity by descent homozygosity mapping to a 203 kb of the PCARP locus on 1q32.3	48
3.3 Conclusion	66
<b>CHAPITRE 4 DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>67</b>
Références	73
Annexe I. Amorces utilisées pour amplifier les exons des gènes candidats	xvi
Annexe II. Amorces utilisées pour amplifier l'ADNc des gènes candidats	xx
Annexe III. Amorces utilisées pour amplifier les introns des gènes candidats	xxii

## Liste des figures

### Mémoire

Figure 1. Mécanismes moléculaires pathogéniques.	11
Figure 2. Recrutement de la famille atteinte de la NHRPA.	17
Figure 3. Paspébiac.	18
Figure 4. Couches et types cellulaires dans la rétine.	22
Figure 5. Graphique des LOD scores positifs.	28
Figure 6. Haplotypes de la famille atteinte de la NHRPA.	29
Figure 7. Fréquence de l'allèle B en fonction de la position chromosomique.	31
Figure 8. Gènes se trouvant dans le premier intervalle candidat.	32
Figure 9. Fonctions d'ATF3.	41
Figure 10. Immunobuvardage de type Western contre ATF3.	42

### Article

Figure 1. Pedigree of the FC family with PCARP.	57
Figure 2. Multipoint LOD score distribution for the FC family with PCARP.	59
Figure 3. Illustration of the various candidate regions for PCARP.	61

## Liste des tableaux

### Mémoire

Table I. Caractéristiques cliniques des neuropathies sensitives héréditaires.	8
Table II. Caractéristiques génétiques des neuropathies sensitives héréditaires.	9
Table III. Caractéristiques cliniques des cas V-4 et VI-2 atteints de la NHRPA.	21
Table IV. Amorces utilisées pour amplifier les marqueurs STR.	26
Table V. Fonction, expression et variants associés aux gènes séquencés.	40

### Article

Table I. Clinical summary of two PCARP Paspebiac cases.	58
Table II. Haplotypes for the FC case VI-2 and the Spanish case V-3 of PCARP on chromosome 1q32.3.	60

### Supplementary data

Table 1. Primers used for candidate genes amplification of the gDNA.	62
Table 2. Primers used for candidate genes amplification of the cDNA.	63

## Liste des sigles et abréviations

<b>ACPRP</b>	Ataxie de la colonne postérieure avec rétinite pigmentaire
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>ADNg</b>	Acide désoxyribonucléique génomique
<b>AIMH</b>	Atrésie intestinale multiple héréditaire
<b>AOA</b>	Ataxie oculomotrice avec apraxie
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ASRACS</b>	Ataxie spastique récessive autosomale de Charlevoix-Saguenay
<b>ATF</b>	Activating transcription factor
<b>ATF3</b>	Activating transcription factor 3
<b>BATF3</b>	Basic ATF3
<b>bZIP</b>	Basic zipper
<b>CHU</b>	Centre hospitalier universitaire
<b>CHUM</b>	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
<b>cM</b>	Centi Morgan
<b>CMT</b>	Charcot-Marie-Tooth
<b>CMT2B</b>	Charcot-Marie-Tooth 2B
<b>CMT4C</b>	Charcot-Marie-Tooth 4C
<b>CRCHUM</b>	Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal
<b>CREB</b>	cAMP response element binding
<b>DF</b>	Dysautonomie familiale
<b>DMOP</b>	Dystrophie musculaire oculo-pharyngée
<b>DRG</b>	Dorsal root ganglion
<b>DTL</b>	Denticleless
<b>FAM71A</b>	Family 71A
<b>GDP</b>	Guanosine diphosphate
<b>GEF</b>	Guanosine exchange factor
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>HHAT</b>	Hedgehog acyltransferase
<b>HHH</b>	hyperornithinémie-hyperammoniémie-homocitrullinurie
<b>ICDA</b>	Insensibilité congénitale à la douleur avec anhidrose
<b>IKBKAP</b>	Inhibitor of kappa in B-cells kinase associated protein
<b>IKAP</b>	IκB kinase associated protein

<b>INTS7</b>	Integrator subunit 7
<b>kb</b>	Kilobase
<b>KCNH1</b>	Potassium channel H1
<b>LOD</b>	Logarithm of odds
<b>Mb</b>	Mégabase
<b>ng</b>	Nanogramme
<b>NENF</b>	Neuron neurotrophic factor
<b>NGF</b>	Nerve growth factor
<b>NGFB</b>	Nerve growth factor B
<b>NHMS/ACC</b>	Neuropathie héréditaire motrice et sensitive avec une agénésie du corps calleux
<b>NHMS IIB</b>	Neuropathie héréditaire motrice et sensitive IIB
<b>NHMSX I</b>	Neuropathie héréditaire motrice et sensitive liée au chromosome X de type I
<b>NHRPA</b>	Neuropathie héréditaire avec rétinite pigmentaire et ataxie
<b>NHS</b>	Neuropathie héréditaire sensitive
<b>NHS IA</b>	Neuropathie héréditaire sensitive IA
<b>NHS IB</b>	Neuropathie héréditaire sensitive IB
<b>NHS IC</b>	Neuropathie héréditaire sensitive IC
<b>NHS ID</b>	Neuropathie héréditaire sensitive ID
<b>NHSA</b>	Neuropathie héréditaire sensitive et autonome
<b>NHSA II</b>	Neuropathie héréditaire sensitive et autonome II
<b>NHSA IIB</b>	Neuropathie héréditaire sensitive et autonome IIB
<b>NHSA III</b>	Neuropathie héréditaire sensitive et autonome III
<b>NHSA IV</b>	Neuropathie héréditaire sensitive et autonome IV
<b>NHSA V</b>	Neuropathie héréditaire sensitive et autonome V
<b>NHSRPA</b>	Neuropathie héréditaire sensitive avec rétinite pigmentaire et ataxie
<b>NSL1</b>	Nnf1-17 synthetic lethal 1
<b>NTRK1</b>	Neurotrophic tyrosine receptor kinase 1
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PPP2R5A</b>	Protein phosphatase 2 regulatory 5A
<b>ProbMax</b>	Probabilité maximale
<b>RAB7</b>	Ras associated binding 7
<b>RCOR3</b>	REST corepressor 3
<b>RD3</b>	Retinal degeneration 3
<b>RT</b>	Reverse transcriptase

<b>RT-PCR</b>	Reverse transcript PCR
<b>SERTAD4</b>	SEI-1, RBT1 and TARA domain 4
<b>Shh</b>	Sonic hedgehog
<b>S-L-S-J</b>	Saguenay-Lac-Saint-Jean
<b>SNP</b>	Single nucleotide polymorphism
<b>SNORA16B</b>	Small nucleolar RNA 16B
<b>SPT</b>	Serine palmitoyltransferase
<b>SPTLC1</b>	Serine palmitoyltransferase long chain 1
<b>SRD</b>	Syndrome de Riley-Day
<b>STR</b>	Short tandem repeat
<b>SYT14</b>	Synaptotagmin 14
<b>TATDN3</b>	TatD Dnase 3
<b>TMEM206</b>	Transmembrane 206
<b>TrkA</b>	Tyrosine receptor kinase A
<b>U</b>	Unité
<b>U/μl</b>	Unité par microlitre
<b>μl</b>	Microlitre
<b>μM</b>	Micromolaire
<b>WNK1</b>	With no lysine (K) 1

## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, <sup>Dr</sup>Bernard Brais, pour m'avoir chaleureusement accueillie dans son laboratoire, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans le domaine de la biologie moléculaire qui me passionne, la génétique, et pour m'avoir guidée tout au long de mes études.

Je voudrais aussi remercier tous les membres du laboratoire, entre autres Emmanuelle, Geneviève, Julie, Marie-Josée et Roxanne, de précieux collègues qui m'ont aidée dans l'avancement de mon projet, mais avant tout qui m'ont appuyée dans les moments difficiles. Je voudrais remercier plus particulièrement Véronique qui m'a formée et qui a forgé ma pensée réflexive, Lina pour son dévouement dans le recrutement des familles, Myriam pour sa compassion dans l'évaluation des patients et pour la révision de l'article, Catherine pour sa rigueur dans la révision du mémoire et enfin Isabelle et Martine pour les beaux et mouvementés moments que nous avons passés ensemble.

Je voudrais également remercier les patients et les membres de leur famille qui nous ont fait confiance et qui ont été de fidèles sujets pour nos études génétiques et les médecins collaborateurs qui nous ont référés à ces personnes.

Je voudrais enfin remercier mes parents et mes frères qui ont cru en moi, qui m'ont supportée et qui m'ont admirée, et surtout mon futur mari, Frédéric, avec qui j'ai partagé tous les moments de tristesse, de joie, de colère, de passion...



# CHAPITRE 1 INTRODUCTION

## 1.1 Neuropathies héréditaires

Les neuropathies se divisent en deux groupes : les neuropathies acquises et les neuropathies héréditaires <sup>1</sup>. Les neuropathies héréditaires représentent 40% des neuropathies en milieu clinique <sup>1</sup>. Elles affectent une personne sur 2500 <sup>2</sup>. Les neuropathies héréditaires peuvent être facilement confondues avec les neuropathies acquises <sup>3</sup>. Par exemple, les signes et les symptômes des neuropathies héréditaires peuvent apparaître en milieu ou en fin de vie <sup>3</sup>. Il existe une hétérogénéité clinique et génétique, même lorsqu'il s'agit de la même maladie dans une même famille <sup>4</sup>. Cliniquement, les neuropathies héréditaires présentent des développements temporels, des signes et des symptômes variables <sup>3</sup>. La complexité des mécanismes impliqués provient principalement de la longueur de l'axone pouvant atteindre plus d'un mètre chez l'humain <sup>3</sup>. Ceci nécessite des interactions structurales, métaboliques et dynamiques complexes afin de préserver sa fonction <sup>3</sup>. De nombreuses classes de protéines se trouvent impliquées dans l'intégrité et la régénération des nerfs, notamment celles jouant un rôle dans les interactions entre les facteurs neurotrophiques et leurs ligands, le transport vésiculaire, le métabolisme des sphingolipides et le recyclage des composés de la membrane <sup>3; 5</sup>. Les neuropathies héréditaires se divisent en deux groupes : celui dans lequel la neuropathie prend une place majeure dans la maladie et celui dans lequel elle prend une place secondaire ou mineure <sup>4; 6</sup>. Nous nous intéresserons seulement au premier groupe. Les neuropathies héréditaires se classifient selon leur mode de transmission et l'importance relative de l'atteinte sensitive, autonome et motrice <sup>7; 8</sup>.

## 1.2 Neuropathies héréditaires sensibles et autonomiques

### 1.2.1 Point de vue clinique

Les neuropathies héréditaires périphériques représentent les maladies héréditaires les plus communes du système nerveux <sup>9; 10</sup>. Elles affectent les nerfs sensitifs, autonomiques et moteurs <sup>9; 10</sup>. Les neuropathies héréditaires sensibles (NHS) sont aussi

connues comme les neuropathies héréditaires sensitives et autonomiques (NHSA)<sup>11; 12</sup>. Elles constituent un des plus petits sous-groupes de neuropathies héréditaires<sup>11; 12</sup>. Les NHSA forment un groupe cliniquement et génétiquement hétérogène de faible prévalence<sup>3; 7; 8; 10; 12</sup>. Les différents sous-types de NHSA se distinguent par leur mode de transmission, l'âge d'apparition, le type de fibre impliqué et le gène muté responsable<sup>3; 7; 8; 10; 12</sup>. Dans chaque type de NHSA, les populations de fibres nerveuses affectées peuvent être différentes<sup>5; 13</sup>. Ceci facilite leur diagnostic lors d'une biopsie nerveuse<sup>5; 13</sup>. L'élément clé aidant le plus au diagnostic est le degré de dysfonction sensitif et autonome<sup>13</sup>. Ceci étant dit, plusieurs formes de NHSA ne se distinguent pas facilement de façon clinique, même si la cause génétique diffère<sup>4</sup>. Les NHSA comprennent un nombre grandissant de maladies affectant le développement et la survie des neurones sensitifs et autonomiques<sup>5</sup>. Les NHSA se caractérisent principalement par une atrophie et une dégénérescence des neurones périphériques sensitifs et autonomiques, mais il existe aussi une atteinte concomitante motrice variable<sup>2; 11; 12</sup>. Lorsque les neuropathies périphériques font partie d'un syndrome génétique, elles peuvent s'accompagner d'autres manifestations<sup>2</sup>. Dans les NHSA, la perte de la sensation de la température et de la douleur prédomine aux membres distaux<sup>5; 10</sup>. De nombreuses complications peuvent survenir, entre autres des modifications de la peau et des ongles, des articulations de Charcot, des ulcérations des doigts et des orteils, des fractures spontanées, des ostéomyélites et de l'automutilation<sup>5; 10</sup>. Plusieurs de ces complications nécessitent des traitements prolongés d'antibiothérapie et malheureusement aussi des amputations des doigts, des mains, des orteils et des pieds et même des jambes chez certains patients<sup>5; 10; 12</sup>.

### 1.2.2 Point de vue moléculaire

L'étude des NHSA a mené à une meilleure compréhension de la complexité du système nerveux<sup>13</sup>. Le développement du système nerveux sensitif est intimement relié à celui du système nerveux autonome<sup>5</sup>. Ces deux systèmes sont dérivés des cellules multipotentes de la crête neuronale et partagent donc une origine embryonnaire<sup>5</sup>. Ceci explique qu'un défaut génétique affectant la migration initiale des cellules neuronales multipotentes puisse causer une diminution des cellules sensitives et autonomiques et une apparition congénitale de la maladie, tandis qu'un défaut affectant le développement tardif d'une seule population de cellules puisse causer une diminution de l'atteinte sensitive et autonome dans certains sous-types de NHSA<sup>5</sup>. Dans le domaine de la neurologie, il arrive qu'un défaut génétique dans une protéine ubiquitaire cause une pathologie affectant

une seule population de neurones<sup>5</sup>. Ceci pourrait être relié à certaines particularités des différents types cellulaires<sup>5</sup>. En fait, les neurones font partie des cellules les plus différenciées du corps et expriment donc leurs propres variants d'épissage<sup>5</sup>. Également, la longueur de l'axone fait en sorte que les neurones sensitifs dépendent du transport des organelles et des protéines cytosquelettiques sur de longues distances afin d'assurer leur survie<sup>5</sup>. Certaines protéines ubiquitaires doivent donc s'exprimer et interagir de façon spécifique dans certains types de neurones<sup>5</sup>.

### 1.2.3 Point de vue génétique

Les recherches génétiques des dernières années ont démontré que des mutations dans des gènes différents peuvent causer le même phénotype et que des mutations dans le même gène peuvent causer différents phénotypes<sup>4</sup>. Il existe souvent des différences phénotypiques entre des cas présentant la même maladie ainsi qu'à l'intérieur des familles<sup>8; 12</sup>. Les études génétiques ont permis une meilleure classification des sous-types de NHSA<sup>5</sup>. L'identification des gènes causant les maladies a approfondi nos connaissances sur le développement normal et pathologique des systèmes nerveux sensitif et autonome. Malheureusement, il n'existe toujours pas de traitement efficace contre aucune des formes de NHSA. C'est pourquoi l'identification des gènes mutés est essentielle afin de prévenir ces maladies par le conseil génétique. Les NHS se distinguent selon l'âge d'apparition, le phénotype, le mode de transmission, le locus et le gène muté (Tab.I et II). Les NHS IA, IB, IC et ID se présentent de façon tardive et se transmettent selon un mode de transmission dominant, tandis que les NHSA II, IIB, III, IV et V se présentent de façon précoce et se transmettent selon un mode de transmission récessif<sup>13</sup>. Aucune NHSA n'a de préférence pour un sexe. Certaines NHSA sont plus fréquentes dans certaines populations, comme la NHS AII et la NHS AIII qui sont plus fréquentes dans les populations canadienne-française et juive ashkénaze respectivement. Pour l'ensemble des NHSA, la pénétrance est complète, mais il existe une variabilité marquée dans l'expression du phénotype. Les tests génétiques ne sont disponibles que pour certaines NHSA.

## 1.3 Classification des neuropathies héréditaires sensibles dominantes

### 1.3.1 Neuropathie héréditaire sensitive IA

La neuropathie héréditaire sensitive IA (NHS IA) apparaît à l'âge adulte<sup>3-5; 11; 14</sup>. Elle présente une diminution de la sensation de la température et de la douleur, une atteinte autonome faible et une atteinte motrice variable<sup>3-5; 11; 14</sup>. Les personnes atteintes souffrent d'une fonte musculaire, d'une force distale faible, de blessures, de fractures, d'ostéomyélite, d'ulcérations, parfois de mutilations, d'absence de sudation et de surdité<sup>3-5; 11; 14</sup>. La NHS IA atteint plus sévèrement les hommes<sup>3-5; 11; 14</sup>. Elle se transmet selon un mode dominant<sup>3-5; 11; 14</sup>. Les personnes atteintes proviennent de différents pays, incluant l'Angleterre, l'Australie, l'Autriche, la Belgique, le Canada, le Portugal et la République tchèque<sup>12</sup>. Le gène muté «serine palmitoyltransferase long chain 1» (SPTLC1) codant pour la protéine «serine palmitoyltransferase» (SPT) se trouve sur le locus 9q22,2<sup>3-5; 11</sup>. La protéine SPT est liée au réticulum endoplasmique<sup>3-5; 11; 14</sup>. Elle est une enzyme clé pour la régulation des niveaux de sphingolipides dans les cellules<sup>3-5; 11; 14</sup>. Cette régulation prévient l'accumulation toxique des intermédiaires des sphingolipides, incluant les bases sphingoides et la céramide<sup>3-5; 11; 14</sup>.

### 1.3.2 Neuropathie héréditaire sensitive IB

La neuropathie héréditaire sensitive IB (NHS IB) apparaît à l'âge adulte<sup>3-5; 11; 14</sup>. Elle présente une diminution de la sensation<sup>3-5; 11; 14</sup>. Les personnes atteintes souffrent rarement d'ulcérations, d'un reflux gastrique, d'une toux pouvant mener à la syncope et d'une surdité<sup>3-5; 11; 14</sup>. La NHS IB se transmet selon un mode dominant<sup>3-5; 11</sup>. Le gène muté inconnu se trouverait au locus 3p22-24<sup>3-5; 11</sup>.

### 1.3.3 Neuropathie héréditaire sensitive IC

La neuropathie héréditaire sensitive IC (NHS IC), aussi nommée Charcot-Marie-Tooth 2B (CMT 2B) et neuropathie héréditaire motrice et sensitive IIB (NHMS IIB), apparaît à l'âge adulte<sup>3-5; 11; 14</sup>. Elle présente une diminution de la sensation et une atteinte motrice<sup>3-5; 11; 14</sup>. Les personnes atteintes souffrent de fonte musculaire, d'ulcérations, de

mutilations, d'amputations et de fatigue<sup>3-5; 11; 14</sup>. La NSH IC se transmet selon un mode dominant<sup>3-5; 11</sup>. Les personnes atteintes proviennent de l'Angleterre, de l'Autriche, de la Belgique, de l'Écosse, des États-Unis, et de la République tchèque<sup>12</sup>. Le gène muté «ras associated binding 7» (RAB7) codant pour la protéine Rab7 se trouve au locus 3q21,3<sup>3-5; 11</sup>. Elle se localise aux endosomes<sup>12</sup>. La protéine Rab7 est liée à la protéine Ras7<sup>12</sup>. Elle lie la molécule «guanosine triphosphate» (GTP) et l'hydrolyse<sup>12</sup>. La protéine Rab7 régule le trafic membranaire intracellulaire<sup>12</sup>. Elle joue un rôle important dans la voie endocytaire<sup>12</sup>.

### **1.3.4 Neuropathie héréditaire sensitive ID**

La neuropathie héréditaire sensitive ID (NHS ID) apparaît à l'âge adulte précoce<sup>3-5; 11; 14</sup>. Elle présente une diminution de la sensation de la température et de la douleur et une atteinte motrice variable<sup>3-5; 11; 14</sup>. Les personnes atteintes souffrent de déformations osseuses, d'ulcérations et de mutilations<sup>3-5; 11; 14</sup>. La NSH ID se transmet selon un mode dominant<sup>3-5; 11</sup>. Le locus est toujours inconnu<sup>3-5; 11</sup>.

## **1.4 Classification des neuropathies héréditaires sensibles et autonomiques récessives**

### **1.4.1 Neuropathie héréditaire sensitive autonome II**

La neuropathie héréditaire sensitive autonome II (NHS II) apparaît à l'enfance<sup>3-5; 11; 14; 15</sup>. Elle présente une diminution de la sensation de la température, de la douleur et de la proprioception et une atteinte autonome faible<sup>3-5; 11; 14; 15</sup>. Elle s'accompagne d'une diminution des fibres myélinisées à la biopsie du nerf sural<sup>3-5; 11; 14; 15</sup>. Les personnes atteintes souffrent de fractures, de plaies cutanées, d'ulcérations, d'amputations et rarement d'hypertension et de sudation excessive<sup>3-5; 11; 14; 15</sup>. La NSAH II se transmet selon un mode récessif<sup>3-5; 11</sup>. Les personnes atteintes proviennent de l'Autriche, de la Belgique, du Canada, de France, de l'Italie et du Liban<sup>12</sup>. Dans la littérature, plus de la moitié des cas décrits sont d'origine canadienne-française<sup>16</sup>. Il existe un effet fondateur à Terre-Neuve pour d'autres mutations<sup>17</sup>. Il en existe un autre au Québec dans la région de Lanaudière pour une autre mutation<sup>12</sup>. Une étude a d'ailleurs décrit 16 cas appartenant à

treize familles originaires du Sud du Québec, parmi lesquelles 75% des cas provenaient de la région de Lanaudière<sup>16</sup>. L'histoire de la région de Lanaudière explique la fréquence élevée des porteurs de deux mutations et ainsi la prévalence élevée de la maladie comparativement à d'autres régions dans le monde<sup>16</sup>. Le gène muté «with no lysine (K) 1» (WNK1) codant pour la protéine WNK1 se trouve au locus 12p13,33<sup>3-5; 11</sup>.

#### **1.4.2 Neuropathie héréditaire sensitive autonome IIB**

La neuropathie héréditaire sensitive autonome IIB (NHSA IIB) est congénitale<sup>3-5; 11; 14</sup>. Elle présente une diminution de la sensation<sup>3-5; 11; 14</sup>. Les personnes atteintes souffrent d'une fonte musculaire<sup>3-5; 11; 14</sup>. La NHSA IIB se transmet selon un mode récessif<sup>3-5; 11</sup>. Le locus est toujours inconnu<sup>3-5; 11</sup>.

#### **1.4.3 Neuropathie héréditaire sensitive autonome III**

La neuropathie héréditaire sensitive autonome III (NHSA III), aussi nommée le syndrome de Riley-Day (SRD) ou la dysautonomie familiale (DF), est congénitale<sup>3-5; 11; 14; 18</sup>. Elle présente une diminution de la sensation de la température et de la douleur et une atteinte autonome<sup>3-5; 11; 14; 18</sup>. Les personnes souffrent d'une diminution des réflexes ostéo-tendineux, d'hypotension posturale, de crises hypertensives, d'une perturbation de l'homéostasie de la température corporelle, de fièvres, de sudation excessive, d'absence de larmes, d'une cornée hypoactive, de reflux gastrique avec vomissements et aspiration, d'absence de la papille fongiforme de la langue, de dysphagie, de sous-alimentation, d'arrêt respiratoire et d'une peau marbrée.<sup>3-5; 11; 14; 18</sup>. La NHSA III se transmet selon un mode récessif<sup>3-5; 11; 18</sup>. Les personnes atteintes proviennent de familles originaires de l'Europe de l'Est et de souche juive ashkénaze<sup>12</sup>. Le gène muté «inhibitor of kappa in B-cells kinase associated protein» (IKBKAP) codant pour la protéine «IκB kinase associated protein» (IKAP) se trouve au locus 9q31<sup>3-5; 11; 18</sup>.

#### **1.4.4 Neuropathie héréditaire sensitive autonome IV**

La neuropathie héréditaire sensitive autonome IV (NHSA IV), aussi nommée l'insensibilité congénitale à la douleur avec anhidrose (ICDA), est congénitale<sup>3-5; 11; 14</sup>. Elle

présente une diminution de la sensation de la température et de la douleur et une atteinte motrice légère<sup>3-5; 11; 14</sup>. Elle s'accompagne de fibres démyélinisées à la biopsie du nerf sural<sup>3-5; 11; 14</sup>. Les personnes atteintes souffrent d'une absence de sudation, d'une peau plus épaisse, d'articulations de Charcot, d'automutilation, de fièvres pouvant mener au décès et d'un retard cognitif<sup>3-5; 11; 14</sup>. La NHSA IV se transmet selon un mode récessif<sup>3-5; 11</sup>. Les personnes atteintes proviennent de différents pays avec une plus haute prévalence chez les Arabes Bédouins-Israéliens<sup>12</sup>. Le gène muté «neurotrophic tyrosine receptor kinase 1» (NTRK1), aussi nommé «tyrosine receptor kinase A» (TrkA), codant pour la protéine TrkA se trouve au locus 1q21<sup>3-5; 11</sup>. La protéine TrkA est un récepteur neurotrophique tyrosine kinase phosphorylé en réponse à un facteur de croissance neuronal<sup>12</sup>. Le complexe formé du ligand et du récepteur maintient la survie des neurones ganglionnaires sympathétiques et des neurones sensitifs nociceptifs dans les ganglions de la racine dorsale<sup>12</sup>.

#### **1.4.5 Neuropathie héréditaire sensitive autonome V de l'enfance**

Cette neuropathie héréditaire sensitive autonome V (NHSA V) apparaît pendant l'enfance<sup>3-5; 11; 14</sup>. Elle présente une diminution de la sensation de la température et de la douleur et une atteinte autonome faible<sup>3-5; 11; 14</sup>. Elle s'accompagne de fibres démyélinisées à la biopsie<sup>3-5; 11; 14</sup>. Les personnes atteintes souffrent d'articulations de Charcot<sup>3-5; 11; 14</sup>. La NHSA V de l'enfance se transmet selon un mode récessif<sup>3-5; 11</sup>. Les personnes atteintes proviennent du Pakistan et de la Suisse<sup>12</sup>. Le gène muté «nerve growth factor B» (NGFB) codant pour la protéine NGFB se trouve au locus 1p13,1<sup>3-5; 11</sup>.

#### **1.4.6 Neuropathie héréditaire sensitive autonome V congénitale**

Cette neuropathie héréditaire sensitive autonome V (NHSA V) est congénitale<sup>3-5; 11; 14</sup>. Elle présente une diminution de la sensation de la température et de la douleur<sup>3-5; 11; 14</sup>. Elle s'accompagne d'une perte des fibres myélinisées à la biopsie<sup>3-5; 11; 14</sup>. Les personnes atteintes souffrent de modifications trophiques des doigts et des orteils, de fractures sans douleur, d'ulcérations et d'absence de sudation<sup>3-5; 11; 14</sup>. La NHSA V congénitale se transmet selon un mode récessif<sup>3-5; 11</sup>. Le gène muté TrkA se trouve au locus 1q21<sup>3-5; 11</sup>.

**Table I. Caractéristiques cliniques des neuropathies sensitives héréditaires.**

<b>Maladie</b>	<b>Apparition</b>	<b>Phénotype</b>
<b>NHS IA</b>	Adulte	Diminution de la sensation de la température et de la douleur, atteinte autonome faible, atteinte motrice variable, fonte musculaire, force distale faible, blessures, fractures, ostéomyélite, ulcérations, parfois des mutilations, absence de sudation, surdité et atteinte plus sévère chez les hommes
<b>NHS IB</b>	Adulte	Diminution de la sensation, rarement des ulcérations, reflux gastrique, toux pouvant mener à la syncope et surdité
<b>NHS IC (CMT 2B) (NHMS IIB)</b>	Adulte	Diminution de la sensation, atteinte motrice, fonte musculaire, ulcérations, mutilations, amputations et fatigue
<b>NHS ID</b>	Adulte précoce	Diminution de la sensation de la température et de la douleur, atteinte motrice variable, déformations osseuses, ulcérations et mutilations
<b>NHSA II</b>	Enfance	Diminution de la sensation de la température, de la douleur et de la proprioception, atteinte autonome faible, diminution des fibres myélinisées à la biopsie du nerf sural, fractures, plaies cutanées, ulcérations, amputations, rarement une hypertension et sudation excessive
<b>NHSA IIB</b>	Congénitale	Diminution de la sensation et fonte musculaire
<b>NHSA III (SRD) (DF)</b>	Congénitale	Diminution de la sensation de la température et de la douleur, atteinte autonome, diminution des réflexes ostéo-tendineux, hypotension posturale, crises hypertensives, perturbation de l'homéostasie de la température corporelle, fièvres, sudation excessive, absence de larmes, cornée hypoactive, reflux gastrique avec vomissements et aspiration, absence de la papille fongiforme de la langue, dysphagie, sous-alimentation, arrêt respiratoire et peau marbrée
<b>NHSA IV (ICDA)</b>	Congénitale	Diminution de la sensation de la température et de la douleur, atteinte motrice légère, fibres démyélinisées à la biopsie du nerf sural, absence de sudation, peau plus épaisse, articulations de Charcot, automutilation, fièvres pouvant mener au décès et retard cognitif
<b>NHSA V</b>	Enfance	Diminution de la sensation de la température et de la douleur, atteinte autonome faible, fibres démyélinisées à la biopsie et articulations de Charcot
<b>NHSA V</b>	Congénitale	Diminution de la sensation de la température et de la douleur, perte des fibres myélinisées à la biopsie, modifications trophiques des doigts et des orteils, fractures sans douleur, ulcérations et absence de sudation



**Table II. Caractéristiques génétiques des neuropathies sensibles héréditaires.**

<b>Maladie</b>	<b>Transmission</b>	<b>Locus</b>	<b>Gène</b>	<b>Protéine</b>
<b>NHS IA</b>	Dominante	9q22,2	SPTLC1	Sérine palmitoyltransférase (SPT)
<b>NHS IB</b>	Dominante	3p22-24	Inconnu	Inconnue
<b>NHS IC</b> <b>(CMT 2B)</b> <b>(NHMS IIB)</b>	Dominante	3q21,3	RAB7	Protéine liant le GTP et associée à Ras 7 (Rab7)
<b>NHS ID</b>	Dominante	Inconnu	Inconnu	Inconnue
<b>NHSA II</b>	Récessive	12p13,33	WNK1	Protéine kinase sans lysine (K) 1 (WNK1)
<b>NHSA IIB</b>	Récessive	Inconnu	Inconnu	Inconnue
<b>NHSA III</b> <b>(SRD)</b> <b>(DF)</b>	Récessive	9q31	IKBKAP	Protéine associée à IκB (IKAP)
<b>NHSA IV</b> <b>(ICDA)</b>	Récessive	1q21	NTRK1 (TrkA)	Récepteur tyrosine kinase 1 (TrkA)
<b>NHSA V</b>	Récessive	1p13,1	NGFB	Facteur de croissance neuronal beta (NGFB)
<b>NHSA V</b>	Récessive	1q21	NTRK1 (TrkA)	Récepteur tyrosine kinase 1 (TrkA)

## 1.5 Mécanismes moléculaires pathogéniques

La complexité de la morphologie des neurones les oblige à orchestrer une multitude de signaux afin de préserver leur intégrité<sup>19</sup>. Cette intégrité se préserve en grande partie à l'aide du ligand «nerve growth factor» (NGF)<sup>19</sup>. Le ligand NGF se lie au récepteur TrkA<sup>19</sup>. Le complexe NGF/TrkA doit parcourir une grande distance dans l'axone jusqu'au corps cellulaire afin de médier ses effets sur la transcription<sup>19</sup>. Ce chemin s'effectue à l'aide des endosomes qui servent de moyen de transport au complexe NGF/TrkA<sup>19</sup>. En fait, le complexe NGF/TrkA a été retrouvé dans des vésicules recouvertes de clatrine, dans des endosomes précoces et dans des endosomes tardifs<sup>19</sup>. Le transport vésiculaire du complexe NGF/TrkA se déroule en partie à l'aide de la dynectine<sup>19</sup>. La protéine Rab7 se situe sur la membrane intracellulaire des endosomes du côté cytosolique et est impliquée dans le transport vésiculaire<sup>19</sup>. En plus de réguler la dynectine, la protéine Rab7 interagit avec le récepteur TrkA, provoque son accumulation dans les endosomes, transforme les endosomes précoces en des endosomes tardifs et induit ainsi la croissance neuronale<sup>19</sup>. Le bon fonctionnement de la protéine Rab7 dépend de l'échange d'une molécule «guanosine diphosphate» (GDP) par une molécule GTP à l'aide du facteur «guanosine exchange factor» (GEF)<sup>20</sup>. La protéine IKAP se situe dans le cytosol et est également impliquée dans le transport vésiculaire<sup>20; 21</sup>. La protéine IKAP se lie au facteur GEF, permet sa localisation et régule ainsi négativement l'exocytose<sup>20; 21</sup>. La protéine SPT est aussi probablement impliquée dans le transport vésiculaire<sup>22</sup>. La protéine SPT catalyse la condensation de la sérine et du palmitoyl-CoA pour produire du 3-kétosphinganine<sup>22</sup>. Le 3-kétosphinganine se métabolise en sphingosine et ensuite en céramide<sup>22</sup>. La céramide se métabolise entre autres en sphingolipides et ceux-ci se font recyclés vers l'appareil de Golgi par la protéine Rab7<sup>22</sup>. Enfin, la protéine WNK1 jouerait un rôle dans la maintenance de l'axone, mais celui-ci reste encore à être élucidé<sup>23</sup>. Le neurone peut s'étendre sur plus d'un mètre chez l'humain, d'où l'importance d'un transport axonal efficace pour permettre aux diverses protéines d'agir dans le but d'assurer son intégrité. Les protéines SPT, Rab7, WNK1, IKAP, TrkA et NGFB affectées dans les NHTA semblent toutes être impliquées dans le transport vésiculaire et dans la maintenance du neurone. Plusieurs études suggèrent que ces protéines médient leurs effets par une voie moléculaire commune<sup>24</sup>. Dans le modèle illustré suivant, la protéine IKAP active le facteur GEF, en permettant sa localisation, qui active la protéine Rab7, en lui donnant un composé GTP, qui active le complexe NGF/TrkA, en l'internalisant, résultant en la croissance du neurone (Fig. 1). Aussi, la protéine Rab7 recycle les sphingolipides, produits à l'aide de la protéine SPT, vers l'appareil de Golgi.

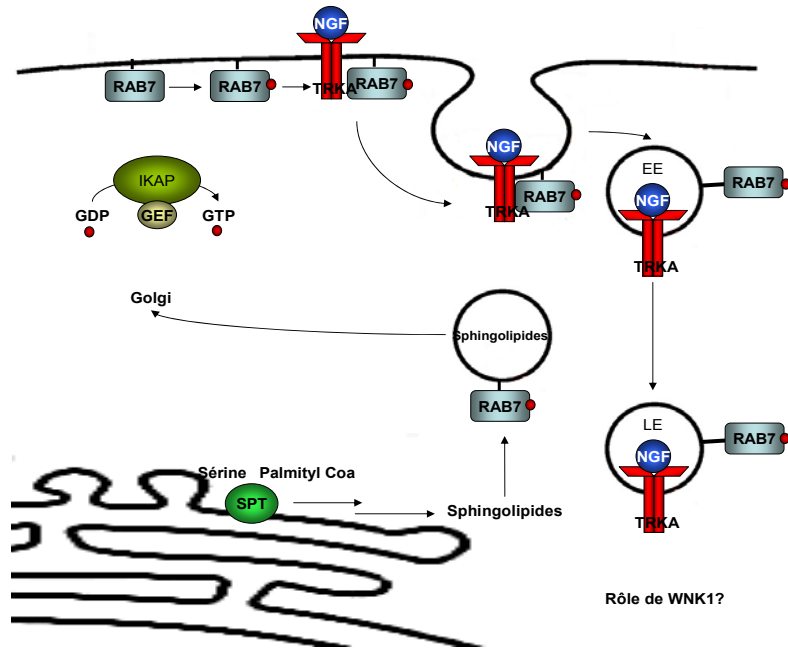


Figure 1. Mécanismes moléculaires pathogéniques.

## 1.6 Maladies à effets fondateurs québécois

Le Québec compte plus de sept millions d'habitants<sup>25-28</sup>. Environ six millions de ceux-ci sont d'origine canadienne-française et descendent d'environ dix milles immigrants, dont uniquement 1 600 femmes<sup>25-28</sup>. Ces immigrants sont venus de France s'installer en Nouvelle-France entre 1608 et 1760<sup>25-28</sup>. Parmi les pionniers, seule une minorité a eu beaucoup de descendants<sup>28</sup>. Les 2 600 pionniers arrivés avant 1680 représentent les deux tiers du pool génétique de la population québécoise actuelle<sup>26-28</sup>. Il existe donc un patrimoine génétique partagé par la population canadienne-française<sup>25-28</sup>. Ceci étant dit, il existe aussi une grande diversité génétique, car les pionniers provenaient de plusieurs régions de la France<sup>28</sup>. De plus, la période écoulée depuis la fondation de la population étant relativement petite en comparaison au nombre de ses pionniers, la dérive génétique n'aurait peut-être pas significativement réduit la diversité génétique<sup>28</sup>. Au moment de la conquête anglaise, la majorité des soixante milles Canadian-Français demeurait le long du fleuve Saint-Laurent<sup>25-27</sup>. Après la conquête anglaise, le Québec a connu une croissance démographique élevée dû à un taux élevé de fécondité<sup>25-27</sup>. Au cours du 19<sup>e</sup> siècle, cette croissance a entraîné la colonisation de nouvelles régions, entre autres le Saguenay-Lac-St-Jean (S-L-S-J) et la Gaspésie<sup>25; 26</sup>. En Gaspésie, la colonisation s'est déroulée par la venue des Acadiens, des Anglo-normands, des loyalistes des États-Unis, attirés par le commerce de la pêche, des Anglais, des Canadiens-Français de la vallée du Saint-Laurent, des Écossais, des Irlandais, attirés par le commerce du bois et l'industrie navale<sup>25</sup>. Aujourd'hui, la Gaspésie compte environ 80 milles habitants, dont 80% d'entre eux sont francophones<sup>25</sup>.

L'effet fondateur se produit lors de l'établissement d'un échantillon d'une population sur un nouveau territoire<sup>25; 26</sup>. Il se compare à un goulot d'étranglement démographique illustrant la réduction de la taille de la population migrante par rapport à la population d'origine et l'extraction partielle de la diversité génétique<sup>25</sup>. L'effet fondateur se caractérise par un changement du profil des fréquences alléliques de la population migrante par rapport à la population d'origine<sup>25; 26</sup>. En d'autres termes, la population migrante ne représente pas entièrement génétiquement la population d'origine<sup>25; 26</sup>. En ce qui concerne l'effet fondateur canadien-français, les pionniers étaient issus uniquement de certaines régions de la France. Aussi, un nombre restreint de pionniers sont venu s'établir dans certaines régions éloignées du Québec, la plupart avec leur famille déjà complétée<sup>25</sup>. Également, la taille limitée de la population canadienne-française à l'époque et le hasard de la transmission génétique a accru la probabilité de faire varier les fréquences

alléliques d'une génération à l'autre en favorisant ainsi la dérive génétique attribuée à la population canadienne-française par rapport à la population française <sup>26</sup>. Dans la population canadienne-française, certains allèles rares ont resurgi, allèles auparavant masqués dans la population française, alors que d'autres se sont éteints <sup>25; 26</sup>. L'isolement linguistique, sociopolitique et religieux relatif des Canadiens-Français a favorisé l'endogamie <sup>26; 27</sup>. L'endogamie se définit comme l'union de deux individus provenant de la même population <sup>26; 27</sup>. Contrairement aux croyances populaires, cet isolement n'a pas favorisé la consanguinité <sup>26; 27</sup>. La consanguinité se définit comme l'union de deux individus reliés à moins de cinq générations <sup>26; 27</sup>. Cette endogamie a augmenté de génération en génération avec la taille limitée de la population, sa faible mobilisation et le peu de métissage <sup>26; 27</sup>. Tous ces facteurs ont contribué à augmenter l'homogénéité génétique de la population canadienne-française <sup>25</sup>. Cette homogénéité explique pourquoi dans certaines régions du Québec la prévalence des maladies héréditaires est plus élevée par rapport à d'autres populations, comme au S-L S-J, où il y a une douzaine de maladies héréditaires <sup>25; 26</sup>. Il ne faut toutefois pas généraliser ce phénomène au reste du Québec <sup>25; 26</sup>. L'histoire de la population canadienne-française est de grande utilité pour les généticiens qui peuvent arriver à un diagnostic plus rapidement selon l'origine géographique régionale du patient et de ses ancêtres <sup>26; 27</sup>.

## **1.7 Approches pour identifier les gènes causant les maladies**

### **1.7.1 Clonage positionnel**

Les approches permettant d'identifier les gènes causant les maladies se divisent en deux groupes : le clonage fonctionnel et le clonage positionnel <sup>29</sup>. Le clonage fonctionnel se base sur la pathophysiologie de la maladie afin d'identifier la voie biochimique impliquée et le gène causant cette maladie <sup>29</sup>. Le clonage positionnel se base sur la position du gène dans le génome <sup>29</sup>. Il consiste à identifier une région d'ADN située entre deux marqueurs génétiques et liée à un phénotype et à séquencer les gènes présents dans cette région afin de trouver le gène causant la maladie <sup>29; 30</sup>. Le succès du clonage positionnel dépend de la qualité des échantillons et de l'efficacité du génotypage <sup>29</sup>. L'objectif est de recruter beaucoup de familles contenant plusieurs cas présentant un phénotype avec des critères diagnostiques clairs <sup>29</sup>. Étant donné que la technologie ne permet pas encore facilement de séquencer tout le génome des individus atteints et de les

comparer aux individus non atteints afin d'identifier le gène causant la maladie, il faut étudier à titre de marqueurs des séquences d'ADN qui montrent des variations entre les individus <sup>31; 32</sup>. La puissance du génotypage augmente en fonction de la densité et de l'informativité des marqueurs <sup>29; 32</sup>.

### 1.7.2 Marqueurs génétiques

Les deux types de marqueurs génétiques couramment utilisés sont les marqueurs microsatellites «short tandem repeat» (STR) et les marqueurs «single nucleotide polymorphism» (SNP) <sup>31-33</sup>. Les marqueurs STR consistent en des répétitions de di-, de tri- ou de tétranucléotides <sup>31-33</sup>. Les marqueurs SNP consistent en une variation d'un nucléotide à un seul site <sup>31-33</sup>. Par rapport aux marqueurs SNP qui sont bialléliques, les marqueurs STR comportent l'avantage d'être plus polymorphiques, c'est-à-dire qu'ils possèdent plusieurs allèles <sup>32-35</sup>. Afin de contrecarrer la seule limitation des marqueurs SNP, les blocs d'haplotypes peuvent être utiles <sup>32; 34; 36</sup>. Les blocs d'haplotypes se définissent comme un groupe de marqueurs SNP rarement séparés par le phénomène de recombinaison dû à leur proximité <sup>32; 34; 36</sup>. Par rapport aux marqueurs STR, les marqueurs SNP comportent l'avantage d'être plus abondants et denses sur l'ensemble du génome <sup>32; 34; 36; 37</sup>. En fait, les marqueurs SNP se retrouvent à une fréquence moyenne de un sur mille paires de bases sur le génome humain <sup>33</sup>. Cependant, les marqueurs SNP ne se retrouvent pas à une distance régulière <sup>33</sup>. Malgré cela, la grande majorité d'entre eux se retrouve dans des régions codantes, d'où leur utilité dans des études comparatives et évolutives des génomes <sup>33</sup>. Leur densité permet de définir des régions candidates plus petites <sup>32; 34; 36; 37</sup>. Par rapport aux marqueurs STR qui mutent souvent, les marqueurs SNP comportent l'autre avantage de posséder une plus grande stabilité <sup>32; 34; 36; 37</sup>. La stabilité des marqueurs SNP permet de réduire le taux d'erreur de génotypage <sup>32; 34; 36; 37</sup>. Tous ces facteurs font en sorte qu'ils sont devenus les marqueurs génétiques de prédilection.

### 1.7.3 Cribles génomiques et analyses de liaison

Depuis la publication de la première séquence du génome humain, la position de presque tous les gènes et marqueurs est connue <sup>30; 31</sup>. Les cribles génomiques permettent de générer des données sur les marqueurs <sup>31; 34</sup>. Les analyses de liaison permettent d'analyser ces données <sup>31; 34</sup>. Elles capitalisent sur la ségrégation des gènes et des

marqueurs de génération en génération<sup>31; 34; 36</sup>. Cette ségrégation est le fruit de l'échange du matériel génétique entre une paire de chromosomes homologues par le phénomène de la recombinaison homologue durant la méiose<sup>31; 34; 36</sup>. Plus deux sites sur le génome sont rapprochés, moins la recombinaison sera susceptible de se produire<sup>32</sup>. Ainsi, lorsque des marqueurs ségrèguent avec des gènes, on parle de coségrégation. La génétique humaine porte sur l'étude d'individus atteints de la même maladie et souvent de la même mutation et recherche, grâce aux analyses de liaison, des régions chromosomiques entourant cette mutation et partagées entre les individus<sup>31</sup>. Contrairement aux analyses de liaison non paramétriques, les analyses de liaison paramétriques considèrent que le mode de transmission est connu<sup>31; 32; 36</sup>. Les analyses de liaison s'effectuent le plus souvent à l'aide d'outils informatiques qui génèrent un «logarithm of the odds» (LOD) score pour chaque marqueur génétique<sup>32; 36</sup>. Le LOD score se définit comme le ratio de la probabilité que le modèle se produise en situation de liaison génétique sur le ratio de la probabilité que ce modèle ne se produise pas en situation de non liaison génétique<sup>32; 36</sup>. Les analyses de liaison recherchent le LOD score le plus élevé déterminant la région chromosomique la plus susceptible de contenir le gène causant la maladie<sup>32; 36</sup>. Les deux programmes informatiques couramment utilisés pour effectuer ces analyses sont LINKAGE et GENEHUNTER<sup>32</sup>. Contrairement au programme GENEHUNTER, le programme LINKAGE comporte l'avantage de pouvoir analyser des pedigree de grande taille et de complexité élevée<sup>32</sup>. Contrairement au programme LINKAGE, le programme GENEHUNTER possède l'avantage de pouvoir analyser beaucoup de marqueurs génétiques<sup>32</sup>. Les analyses de liaison peuvent se dérouler en deux points ou en multipoints. Les analyses de liaison en deux points considèrent chaque marqueur génétique individuellement<sup>36</sup>. Les analyses de liaison en multipoints considèrent le nombre de marqueurs liés ensemble<sup>36</sup>. Par rapport aux analyses de liaison en deux points, les analyses de liaison en multipoints possèdent une plus grande puissance et fournissent plus d'informations, cependant elles dépendent du positionnement, parfois mauvais, des marqueurs génétiques<sup>36</sup>.

#### **1.7.4 Cartographie de l'homozygoté**

La cartographie de l'homozygoté ou «homozygosity mapping» s'applique à l'étude des familles consanguines et des populations à effet fondateur présentant des individus atteints d'une maladie récessive<sup>29; 38</sup>. Par rapport à d'autres enfants, le génome des enfants provenant de familles consanguines ou de populations à effet fondateur risque

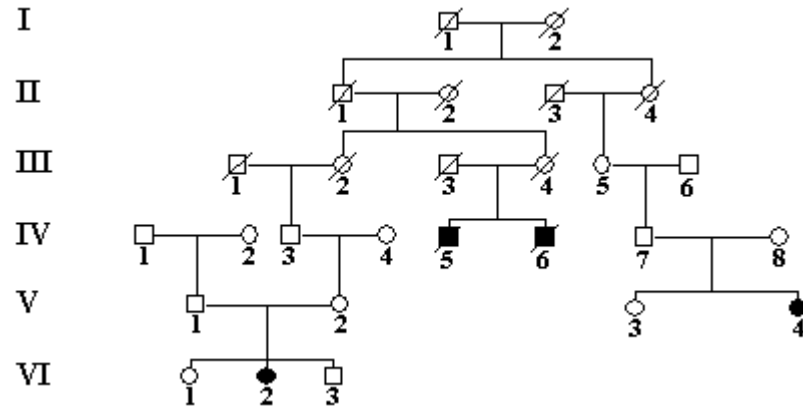
de posséder un plus grand nombre de régions homozygotes à cause des haplotypes partagés entre les parents<sup>29; 32</sup>. Ces régions d'homozygosit  se distribuent au hasard chez tous les enfants, sauf que les enfants atteints possèdent nécessairement la même région chromosomique homozygote pour le gène causant la maladie<sup>29; 38</sup>. La cartographie de l'homozygosit  est particulièrement utile lors de l'étude de familles présentant des cas assez éloignés au niveau généalogique, de telle sorte que les cas ne partagent pas beaucoup de régions chromosomiques homozygotes et que la région partagée contenant le gène causant la maladie se repère facilement<sup>29; 38</sup>. En ce sens, les populations fondatrices jeunes avec un certain niveau de consanguinité lointaine sont les populations idéales pour compléter des études de cartographie de l'homozygosit <sup>29</sup>.

## **1.8 Projet de maîtrise**

### **1.8.1 Recrutement de la famille atteinte de la NHRPA**

Le recrutement de familles présentant des individus atteints de la même maladie et provenant de la même région facilite les études génétiques grâce à l'homog nit  régnant au sein de ces familles. Nous avons recruté une grande famille canadienne-française originaire de Paspébiac dans la Baie-des-Chaleurs dans laquelle nous avons identifié quatre individus atteints d'une forme de neuropathie héréditaire sensitive avec rétinite pigmentaire et ataxie (NHRPA) (Fig. 2 et 3). La ville de Paspébiac est reconnue pour la présence de maladies génétiques à effets fondateurs, telles que la CMT4C<sup>39</sup>. Elle est également reconnue pour ses grandes vagues d'immigration de pêcheurs basques<sup>40</sup>.





**Figure 2. Recrutement de la famille atteinte de la NHRPA.** Les carrés représentent les hommes. Les cercles représentent les femmes. Les lignes diagonales représentent les individus décédés. Les carrés et les cercles coloriés en noir représentent les individus atteints de la NHRPA.



**Figure 3. Paspébiac.** La ville Paspébiac se trouve dans la Baie-des-Chaleurs en Gaspésie.

## 1.8.2 Phénotype de la NHSRPA

Les individus V-4 et VI-2 atteints de la NHSRPA ont 16 et 15 ans respectivement (Tab. III). Les cas IV-5 et IV-6 décédés auraient 49 et 51 ans respectivement. Les cas V-4 et VI-2 ont été diagnostiqués à 18 et 9 mois respectivement. Ils ont commencé à marcher à quatre et deux ans respectivement. Le cas VI-2 a arrêté de marcher à huit ans. La cognition des cas V-4 et VI-2 est normale. Ils souffrent d'une diminution de la sensibilité tactile, de la perception de la vibration et de la proprioception, de réflexes absents, d'une scoliose, de difformités orthopédiques, d'une fatigue musculaire distale intrinsèque aux mains et aux pieds, d'infection du tract urinaire, d'incontinence urinaire et fécale et d'une rétinite pigmentaire. La biopsie chez le cas V-4 montre une perte axonale. Un test génétique chez le cas IV-2 a permis d'exclure la possibilité que le gène causant la maladie soit celui causant la NHSA2, notamment pour les deux mutations les plus communes au Québec. La NHSRPA se caractérise par la perte d'axones dans les nerfs périphériques résultant en la diminution de la sensation dans les membres situés aux extrémités du corps et s'accompagnant d'une mauvaise guérison des plaies suite à des blessures. La présence de troubles visuels, tels que la vision périphérique diminuée et la rétinite pigmentaire, et l'ataxie distingue cette neuropathie des autres NHS. Dans d'autres ataxies, telles que l'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2, l'ataxie de Friedreich, les ataxies spinocérébelleuses de types 1, 2, 3, 4, 6, 7, et 25 et le syndrome spinocérébelleux avec neuropathie axonale, une neuropathie peut aussi être présente, mais elle est toujours clairement sensitivo-motrice et le syndrome cérébelleux domine la présentation clinique<sup>2</sup>. Aucun gène causant une NHS liée à une rétinite pigmentaire et une ataxie n'a été rapporté dans la littérature.

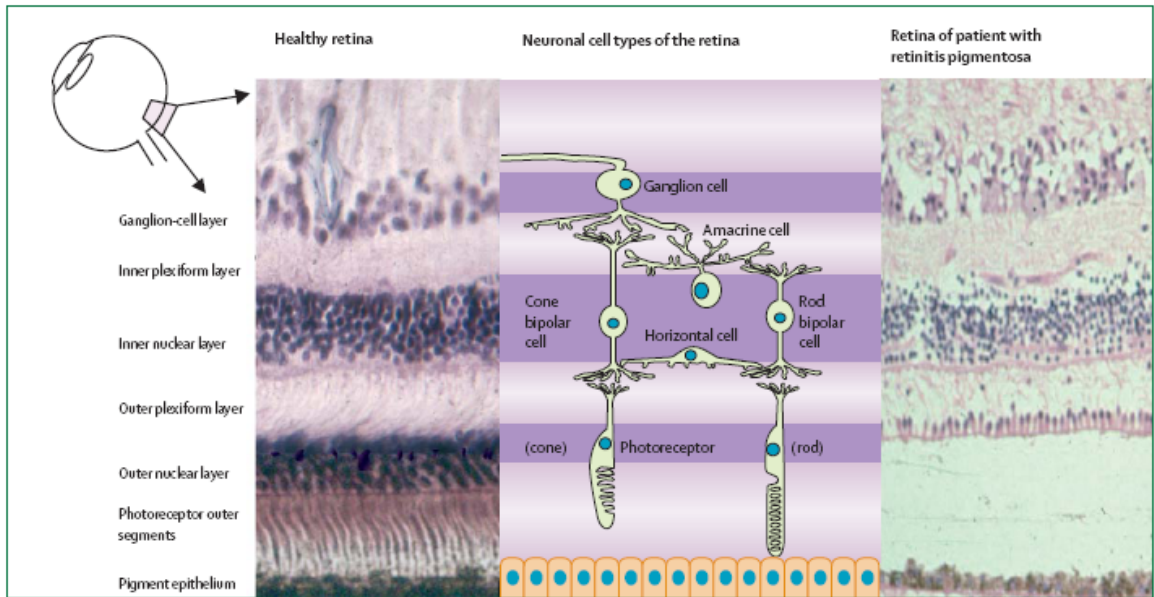
### 1.8.2.1 Rétinite pigmentaire

La rétinite pigmentaire peut constituer le syndrome en soi ou faire partie d'un syndrome plus complexe<sup>41; 42</sup>. Elle implique une dégénération progressive de la rétine, plus précisément une dystrophie des photorécepteurs, c'est-à-dire les cônes et les bâtonnets<sup>41-44</sup>. La couche nucléaire externe de la rétine consiste en des noyaux des photorécepteurs (Fig. 8)<sup>42</sup>. Les cônes médient la vision dans la lumière<sup>42; 44</sup>. Les bâtonnets médient la vision dans l'obscurité<sup>42; 44</sup>. La rétinite pigmentaire se présente tout d'abord avec une difficulté d'adaptation ou une perte de la vue dans l'obscurité<sup>41-43</sup>. À ce stade, il y a une perte au niveau des bâtonnets<sup>42; 44</sup>. La rétinite pigmentaire se présente

ensuite avec une diminution du champ visuel ou de la vision périphérique entraînant une vision de tunnel <sup>41-43</sup>. À ce stade, il y a une perte au niveau des cônes <sup>42; 44</sup>. Éventuellement, la rétinite pigmentaire entraîne une perte complète de la vision centrale <sup>41-43</sup>. La couche nucléaire interne de la rétine consiste en des neurones des cellules amacriues, bipolaires et horizontales <sup>42</sup>. Cette couche de même que la couche des cellules ganglionnaires se préservent bien au début de la pathologie pour ensuite se dégrader plus tard <sup>42</sup>.

Table III. Caractéristiques cliniques des cas V-4 et VI-2 atteints de la NHRPA.

	<b>V-4</b>	<b>VI-2</b>
<b>Date de naissance</b>	20-06-1993	14-12-1994
<b>Âge en 2007</b>	14 ans	13 ans
<b>Âge au diagnostic</b>	18 mois	9 mois
<b>Âge à la marche</b>	4 ans	2 ans
<b>Âge d'arrêt de la marche</b>	---	8 ans
<b>Crises néonatales</b>	Présentes	Absentes
<b>Cognition</b>	Normale	Normale
<b>Sensibilité tactile</b>	Réduite	Réduite
<b>Perception de la vibration</b>	Réduite	Réduite
<b>Proprioception</b>	Réduite	Réduite
<b>Hypotension orthostatique</b>	---	Absente
<b>Réflexes</b>	Absents	Absents
<b>Scoliose</b>	Présente	Présente
<b>Difformités orthopédiques</b>	Présentes	Présentes
<b>Contracture</b>	Présente	Absente
<b>Articulations de Charcot</b>	Absents	Présents
<b>Ostéomyélite</b>	Présente	Absente
<b>Automutilation</b>	Absente	Présente
<b>Fatigue musculaire distale intrinsèque aux mains et aux pieds</b>	Présente	Présente
<b>Infection du tract urinaire</b>	Présente	Présente
<b>Incontinence urinaire</b>	Présente	Présente
<b>Incontinence fécale</b>	---	Présente
<b>Ouïe</b>	Présente	Présente
<b>Rétinite pigmentaire</b>	Présente	Présente
<b>Biopsie</b>	Perte axonale, muscles normaux, pas de bulbes d'oignon, pas d'inclusions anormales	---
<b>Test génétique</b>	---	NHSA II



**Figure 4. Couches et types cellulaires dans la rétine.** Comparaison entre la rétine d'un individu sain et celle d'un individu atteint de la rétinite pigmentaire <sup>42</sup>.

### **1.8.3 Hypothèse**

La famille canadienne-française recrutée contient quatre cas atteints de la NHRPA indiquant la présence d'une maladie héréditaire. Aucun parent n'est atteint et il existe des cas des deux sexes signifiant que la maladie se transmet selon un mode récessif. Étant donné que le bagage génétique d'une grande proportion des canadiens-français provient d'un petit échantillonage des Français, cela a provoqué un changement du profil des fréquences alléliques. Ce changement a fait resurgir certains allèles rares et avec ceux-ci certaines maladies rares. La famille décrite est la seule à avoir été caractérisée cliniquement au Québec pour la maladie qu'elle transmet. Ces indices nous ont poussés à émettre l'hypothèse que la NHRPA représente une maladie récessive à effet fondateur pour la région de Paspébiac.

### **1.8.4 But et objectifs**

Le but était d'identifier le gène causant la NHRPA. Au départ, les objectifs étaient de caractériser cliniquement la maladie, d'identifier le locus lié à la NHRPA et d'identifier la mutation causant la NHRPA.

### **1.8.5 Rationalisation**

Il est primordial d'identifier les gènes causant les NHS pour deux raisons principales. D'une part, l'identification des gènes mutés permet de cribler les porteurs dans une population cible et d'en informer les individus porteurs pour un meilleur conseil génétique. D'autre part, l'identification des gènes mutés permet de mieux comprendre les voies biochimiques affectées par la maladie pour un meilleur traitement clinique.

## CHAPITRE 2 RÉSULTATS

### 2.1 Résultats préliminaires

#### 2.1.1 Matériel et méthodes

##### 2.1.1.1 Crible génomique

Un premier crible génomique a été complété chez les cas IV-5, V-4 et VI-2 et les membres III-3, III-4, IV-1, IV-2, IV-3, IV-4, IV-7, IV-8, V-1, V-2, V-3, VI-1 et VI-3 de la famille canadienne-française à deCODE genetics (Reykjavik, Isl.). Les génotypes ont été générés pour cinq cents marqueurs STR séparés par une moyenne de huit centimorgans (cM). Un dernier crible génomique a été complété chez les cas IV-5, V-4 et VI-2 et le membre VI-1 de la famille canadienne-française au Centre d'innovation Génome Québec de l'Université McGill (Montréal, Qc, Can.). Les génotypes ont été générés pour 380 mille marqueurs SNP à l'aide de la chip «Human CNV370-Quad BeadChip» (Illumina, San Diego, Calif., É.-U.).

##### 2.1.1.2 Cartographie fine

L'intervalle candidat a été cartographié finement chez les cas IV-5, V-4 et VI-2 et les membres III-3, III-4, IV-1, IV-2, IV-3, IV-4, IV-7, IV-8, V-1, V-2, V-3, VI-1 et VI-3 de la famille canadienne-française. Les réactions «polymerase chain reactions» (PCR) ont été performées à partir de 40 nanogrammes (ng) d'ADN génomique (ADNg) dans un volume de 14 microlitres (µl) contenant du tampon de PCR 10X (Qiagen, Mississauga, Ont., Can.), de la Solution-Q 5X (Qiagen, Mississauga, Ont, Can.), un mélange d'amorces concentrées à 40 micromolaires (µM) (Tab. IV) et de la polymérase d'ADN Taq concentrée à cinq unités par microlitre (U/µl) (Qiagen, Mississauga, Ont., Can.). Les génotypes ont été générés pour les 19 marqueurs STR D1S2685, D1S2692, D1S2891, D1S1663, D1S245, D1S471, D1S491, D1S205, D1S2812, D1S2810, D1S2780, D1S425, D1S505, D1S1667, D1S217, D1S2703, D1S2646, D1S419 et D1S327 basé sur la séquence génomique de



l'intervalle candidat (<http://www.genome.ucsc.edu>, assemblage de mars 2006), au Centre d'innovation Génome Québec de l'Université McGill (Montréal, Qc, Can.).

### **2.1.1.3 Analyse de liaison**

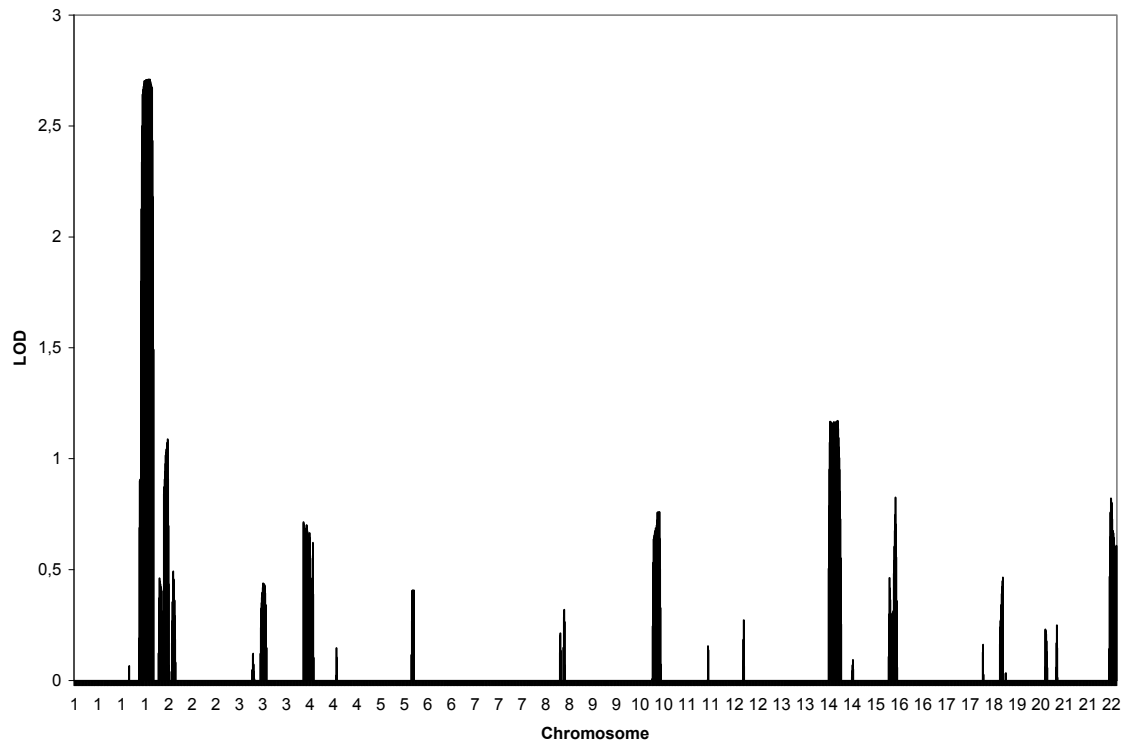
Le génotypage a été analysé avec GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems, Foster, Calif., É.-U.). L'analyse de liaison paramétrique en multipoints a été performée avec Genehunter v.2.1<sup>45</sup>. L'ordre des marqueurs et les distances génétiques entre les marqueurs ont été basés sur la carte génétique de deCODE genetics (Reykjavik, Isl.) et sur la carte physique de UCSC (<http://genome.ucsc.edu>, assemblage de mars 2006). Un cM a été considéré comme équivalent à un mégabase (Mb). Les marqueurs ont été analysés assumant des fréquences alléliques égales, lorsque celles-ci étaient inconnues et les fréquences alléliques basées sur les génotypes de 186 chromosomes d'individus canadiens-français ne participant pas à l'étude et fournies par deCODE genetics (Reykjavik, Isl.). Le phénotype de la NHRPA a été analysé comme un trait autosomique récessif avec 100% de pénétrance et avec une fréquence du gène causant la maladie estimée de 0,03 selon deCODE genetics (Reykjavik, Isl.) et de 0,0001 selon notre estimation. Aucune phénotypie n'a été incorporée dans l'analyse. Les haplotypes ont été reconstruits en une seule section avec la méthode de probabilité maximale (ProbMax) de Genehunter v.2.1<sup>45</sup>.

Table IV. Amorces utilisées pour amplifier les marqueurs STR.

<b>Marqueur STR</b>	<b>Amorce forward</b>	<b>Amorce reverse</b>
<b>D1S2685</b>	CAGCACCTTCATCTAGCACG	TGAGCCATCTCCAAGGG
<b>D1S2692</b>	GCTAACAAAAACCCACATCT	CTATAAGCAAATGGCACAAG
<b>D1S2891</b>	ACTGCTTATTCGGAGTTGGA	CCAAGAGTTTTCTTAGCAAATCAC
<b>D1S1663</b>	CAACATATGAACAGGCGGAG	AGCCTCAGAAACTGAGTCCC
<b>D1S245</b>	GACCCCTTTACCTGAGGC	CGCTTTGATAGATTTAGCACTG
<b>D1S471</b>	CCAGTAACACAGTGCCCA	CCATTAATAATTGATGATATCGATT
<b>D1S491</b>	ATCTCCCTGGCAATGATTTT	TGTCAGCAAGAANTGTGAAAGT
<b>D1S205</b>	CTGAGCACAGCAGTGGTCTC	AAGGCTTATCAAGAGCGAGG
<b>D1S2812</b>	AACATAAGGNNGGCCTGATA	TGGACTGTTGTGTCTGCC
<b>D1S2810</b>	TCAGTTCCTGGTTACCGTTA	CCGTTCTTATGAGCCTTACA
<b>D1S2780</b>	TCTGTGTTCCCTAAGTATTA AAAACC	ATCCAACCCTGACA ACTG
<b>D1S425</b>	CTAAAACAAAACACTCAGA ACCACA	ACCTAGCACAAAGGCTTCACA
<b>D1S505</b>	GGAAGGCTTGCTCTTG	CCTCACCCATGACACTG
<b>D1S1667</b>	GATGAATGGATGGATAGCTAGC	CATCGACTGTAGACACAGCG
<b>D1S217</b>	TTATAACCAACCCTGTACAG	GCACATTTCCGGTAAAAGAA
<b>D1S2703</b>	AGCTCTCCAAGTCGGGATAG	CATTTACCCAGTGTTGCAG
<b>D1S2646</b>	AGCTTAAATTGAGCAGGAAA	GGAGTAGATCATCACTGGGAG
<b>D1S419</b>	AGCTGGTCCTGTCTGGAT	CGCATGTAAGTTGGGG
<b>D1S237</b>	AGGTCCAGGTTTGAATCTTGGC	TACACCGAGGTAAGTGTTGCG

### 2.1.2 Identification du locus lié à la NHRPA

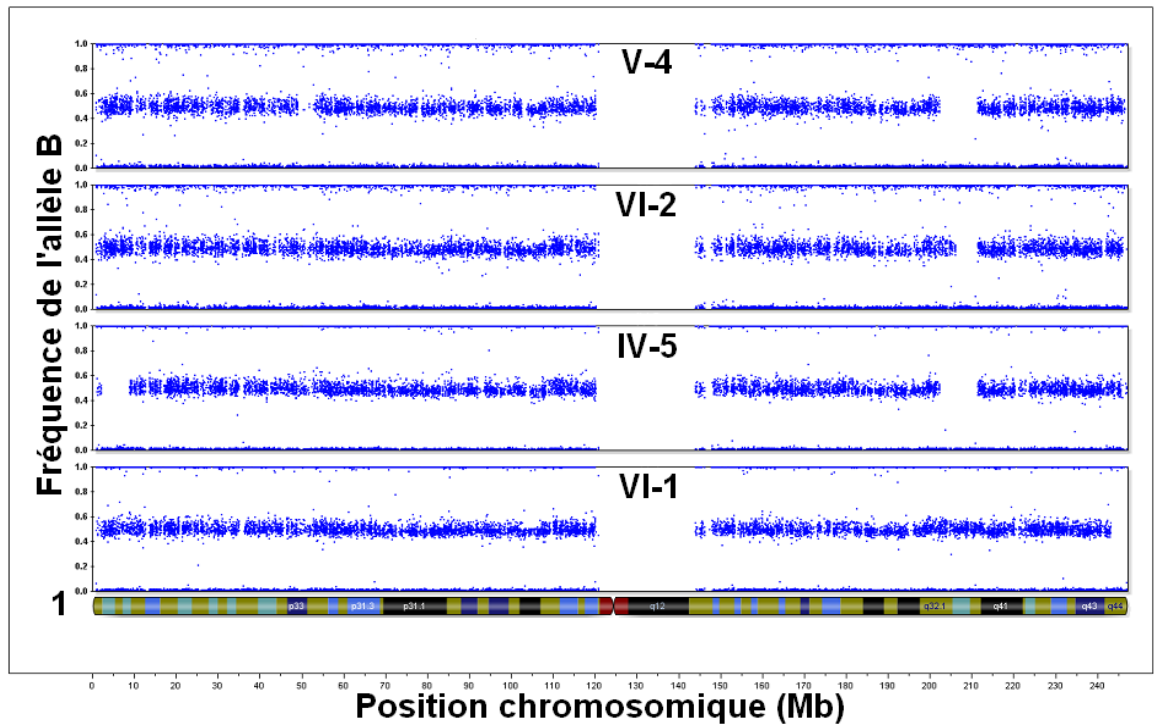
Afin d'identifier le chromosome contenant le gène causant la NHRPA, nous avons criblé le génome des cas et des membres de la famille canadienne-française avec cinq cent marqueurs STR. Afin de calculer la probabilité pour chaque chromosome de contenir le gène causant la NHRPA, nous avons procédé à une analyse de liaison paramétrique en multipoints. Le graphique des LOD scores positifs montre que le LOD score le plus élevé de 2,7 se trouve au chromosome 1 (Fig. 4). À l'aide des haplotypes, nous avons défini un premier intervalle candidat entre les marqueurs STR D1S2685 (206 056 465 pb - 206 056 795 pb) et D1S237 (212 795 931 pb - 212 796 317 pb), soit une distance de 6 739 852 pb au locus 1q32,2-q41 (données non montrées). Afin de définir davantage l'intervalle candidat, nous avons généré des données pour des marqueurs STR supplémentaires. Grâce à la recombinaison présente chez le cas VI-2, nous avons rétréci l'intervalle candidat entre les marqueurs STR D1S2692 (206 105 497 pb - 206 105 815 pb) et D1S419 (212 604 506 pb - 212 604 861 pb), soit une distance de 6 499 364 pb au locus 1q32,2-q41 (Fig. 5). Afin de définir encore davantage l'intervalle candidat, nous avons généré des données pour des marqueurs SNP. Les résultats obtenus concordent avec ceux des marqueurs STR. Les cas V-4, VI-2 et IV-5 sont homozygotes, tandis que le membre de la famille VI-1 est hétérozygote (Fig. 6). Tel qu'attendu, une recombinaison présente chez le cas VI-2 permet de rétrécir l'intervalle candidat entre les marqueurs SNP rs643930 (206 224 964 pb) et rs1434889 (211 577 854 pb), soit une distance de 5 352 890 pb au locus 1q32,2-q32,3. Dans cet intervalle candidat se trouvent 44 gènes parmi lesquels celui causant la NHRPA (Fig. 7). En procédant à une plus fine revue de la littérature, nous avons réalisé que deux autres familles, une espagnole et une américaine, avaient été cliniquement caractérisées comme présentant une ataxie de la colonne postérieure avec rétinite pigmentaire (ACPRP) et incidemment le même phénotype que notre famille canadienne-française.



**Figure 5. Graphique des LOD scores positifs.** Les génomes des cas IV-5, V-4 et VI-2 et des membres III-3, III-4, IV-1, IV-2, IV-3, IV-4, IV-7, IV-8, V-1, V-2, V-3, VI-1 et VI-3 de la famille canadienne-française ont été criblés chez deCODE genetics (Reykjavik, Isl.). Les génotypes ont été générés avec cinq cents marqueurs STR séparés par une moyenne de huit cM. Une analyse de liaison paramétrique en multipoints a été performée avec Genehunter v.2.1<sup>45</sup>. L'ordre des marqueurs, les distances génétiques entre les marqueurs et les fréquences alléliques ont été fournies par deCODE genetics (Reykjavik, Isl.). Le phénotype de la NHRPA a été analysé comme un trait autosomique récessif, avec 100% de pénétrance et avec une fréquence du gène causant la NHRPA estimée de 0,03 selon deCODE genetics (Reykjavik, Isl.). Les haplotypes ont été reconstruits en une seule section avec la méthode de ProbMax de Genehunter v.2.1<sup>45</sup>.



**Figure 6. Haplotypes de la famille atteinte de la NHRPA.** Le génome des cas IV-5, V-4 et VI-2 et des membres III-3, III-4, IV-1, IV-2, IV-3, IV-4, IV-7, IV-8, V-1, V-2, V-3, VI-1 et VI-3 de la famille canadienne-française a été criblé au locus 1q32,2-1q41. Les réactions PCR ont été effectuées. Les génotypes ont été générés à l'aide des 19 marqueurs STR D1S2685, D1S2692, D1S2891, D1S1663, D1S245, D1S471, D1S491, D1S205, D1S2812, D1S2810, D1S2780, D1S425, D1S505, D1S1667, D1S217, D1S2703, D1S2646, D1S419 et D1S327 au Centre d'innovation Génome Québec de l'Université McGill (Montréal, Qc, Can.). Le génotypage a été analysé avec GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems, Foster, Calif., É.-U.). Une analyse de liaison paramétrique en multipoints a été effectuée avec Genehunter v.2.1<sup>45</sup>. L'ordre des marqueurs et les distances génétiques entre les marqueurs ont été fournis par UCSC (<http://genome.ucsc.edu>, assemblage de mars 2006). Les fréquences alléliques ont été assumées comme égales. Le phénotype de la NHRPA a été analysé comme un trait autosomique récessif avec 100% de pénétrance et avec une fréquence du gène causant la maladie estimée de 0,0001. Les haplotypes ont été reconstruits en une seule section avec la méthode de ProbMax de Genehunter v.2.1<sup>45</sup>. Les carrés représentent les hommes. Les cercles représentent les femmes. Les lignes diagonales représentent les personnes décédées. Les carrés et les cercles coloriés en noir représentent les personnes atteintes de la NHRPA.



**Figure 7. Fréquence de l'allèle B en fonction de la position chromosomique.** Un cribre génomique chez les cas IV-5, V-4, et VI-2 et le membre VI-1 de la famille canadienne-française a été complété au Centre d'innovation Génome Québec de l'Université McGill (Montréal, Qc, Can.). Les génotypes ont été générés pour 380 mille marqueurs SNP à l'aide de la chip Human CNV370-Quad BeadChip d'Illumina (San Diego, Calif., É.-U.).

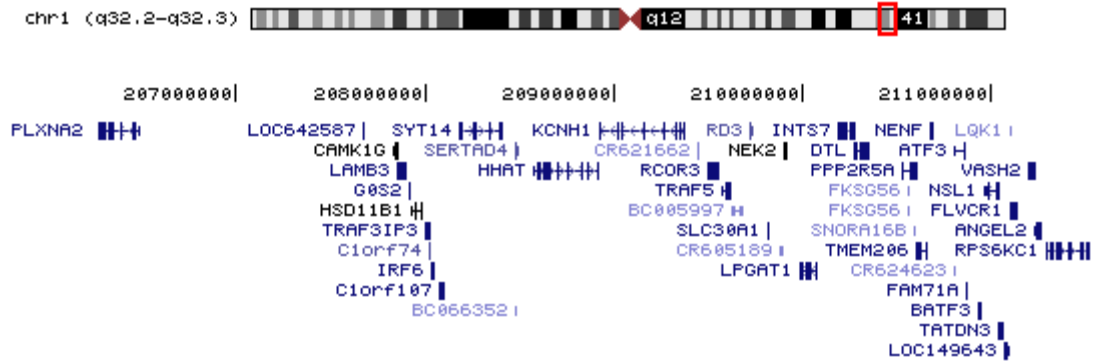


Figure 8. Gènes se trouvant dans le premier intervalle candidat.



### 2.1.3 Séquençage des gènes candidats

Afin d'identifier le gène causant la NHSRPA, nous avons procédé par une approche de séquençage de gènes candidats se trouvant dans l'intervalle candidat défini par la famille canadienne-française au locus 1q32,2-q32,3 contenant 44 gènes. Nous avons séquencé la région codante des gènes à partir de l'ADNg en les ordonnant selon leur fonction et leur expression. Nous avons priorisé les gènes exprimés dans le nerf ou la rétine et les gènes impliqués dans l'intégrité du nerf, la prolifération cellulaire et le transport vésiculaire, celui-ci étant impliqué dans les autres NHSA. Étant donné le mode de transmission récessif de la NHSRPA et les haplotypes homozygotes des cas, nous avons criblé pour des variants homozygotes chez les cas et hétérozygotes chez les parents. Nous avons trouvé des variants dans plusieurs gènes, mais la majorité de ces variants avaient déjà été caractérisés dans la littérature comme non causals. Cette section présente les gènes candidats choisis pour le séquençage.

#### 2.1.3.1 Séquençage du gène SYT14

Le gène «synaptotagmin 14» (SYT14) encode la protéine Syt14 qui s'exprime dans la rétine et qui maintient l'intégrité des synapses (Table V). Il existe un individu atteint d'une translocation de novo  $t(1;3)(q32,2;q25,1)$  affectant le gène SYT14 et causant une atrophie cérébrale et un retard du développement <sup>46</sup>. La protéine Syt14 se lie aux phospholipides et il a été proposé qu'elle puisse jouer un rôle dans le transport vésiculaire <sup>47</sup>. Les NHSA semblent toutes être causées par des gènes impliqués dans le transport vésiculaire, d'où l'intérêt accordé au gène SYT14 <sup>24</sup>. Des variants déjà connus ont été identifiés (Table V).

#### 2.1.3.2 Séquençage du gène SERTAD4

Le gène SEI-1, RBT1 and TARA domain 4» (SERTAD4) s'exprime dans le nerf périphérique (Table V). La fonction du gène SERTAD4 est inconnue <sup>48</sup>. Aucun variant n'a été identifié (Table V).

### **2.1.3.3 Séquençage du gène HHAT**

Le gène «hedgehog acyltransferase» (HHAT) encode la protéine Hhat qui s'exprime dans le nerf périphérique et qui induit la palmitoylation amino-terminale de la protéine Shh (Table V). La protéine Hhat colocalise avec la protéine Shh dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de golgi <sup>49; 50</sup>. La palmitoylation de la protéine Shh requiert le passage de la protéine Hhat à travers la voie sécrétoire <sup>50</sup>. Ainsi, la protéine Hhat pourrait jouer un rôle dans le transport vésiculaire. Aucun variant n'a été identifié (Table V).

### **2.1.3.4 Séquençage du gène KCNH1**

Le gène «potassium channel H1» (KCNH1) encode un canal potassium dépendant du voltage (Table V). Ce canal s'exprime dans le cerveau, dans les cellules photoréceptrices et les ganglions de la rétine <sup>51; 52</sup>. Aucun variant n'a été identifié (Table V).

### **2.1.3.5 Séquençage du gène CR621662**

La fonction du gène CR621662 est inconnue (Table V). Aucun variant n'a été identifié (Table V).

### **2.1.3.6 Séquençage du gène RCOR3**

Le gène «REST corepressor 3» (RCOR3) jouerait un rôle dans la répression de la transcription (Table V). Aucun variant n'a été identifié (Table V).

### **2.1.3.7 Séquençage du gène RD3**

Le gène «retinal degeneration 3» (RD3) encode la protéine Rd3 qui s'exprime dans rétine et dont la fonction est inconnue (Table V). Lorsque la protéine Rd3 est tronquée de façon prématurée, elle cause une dégénération de la rétine chez plusieurs patients <sup>53; 54</sup>. Aucun variant n'a été identifié (Table V).

### **2.1.3.8 Séquençage du gène INTS7**

Le gène «integrator subunit 7» (INTS7) encode une sous-unité qui joue un rôle dans l'épissage de l'extrémité 3' des petits ARN nucléaires U1 et U2 (Table V). Cette sous-unité se lie directement avec le domaine terminal en C de la plus grande sous-unité de la polymérase d'ARN II et est essentielle au développement normal<sup>55; 56</sup>. Aucun variant n'a été identifié (Table V).

### **2.1.3.9 Séquençage du gène DTL**

Le gène «denticleless» (DTL) s'exprime dans le nerf périphérique et sa fonction est inconnue (Table V). Aucun variant n'a été identifié (Table V).

### **2.1.3.10 Séquençage du gène PPP2R5A**

Le gène «protein phosphatase 2 regulatory 5 A» (PPP2R5A) encode une protéine qui s'exprime dans le nerf périphérique et la rétine et qui joue un rôle dans le contrôle négatif de la croissance et de la division cellulaire<sup>57</sup>. Des variants déjà connus ont été identifiés (Table V).

### **2.1.3.11 Séquençage du gène SNORA16B**

Le gène «small nucleolar H/ACA 16 B» (SNORA16B) encode un petit ARN nucléolaire dont la fonction est inconnue (Table V). Aucun variant n'a été identifié (Table V).

### **2.1.3.12 Séquençage du gène TMEM206**

La fonction du gène «transmembrane 206» (TMEM206) encode une protéine qui s'exprime dans la rétine et dont la fonction est inconnue (Table V). Aucun variant n'a été identifié (Table V).

#### **2.1.3.13 Séquençage du gène NENF**

Le gène «neuron neurotrophic factor» (NENF) encode la protéine neudésine qui s'exprime dans le cerveau, dans la moelle épinière et dans la rétine et qui possède une activité neurotrophique dans les neurones <sup>58</sup>. Un variant déjà connu a été identifié (Table V).

#### **2.1.3.14 Séquençage du gène CR624623**

La fonction du gène CR624623 est inconnue (Table V). Aucun variant n'a été identifié (Table V).

#### **2.1.3.15 Séquençage du gène TATDN3**

Le gène «TatD Dnase 3» (TATDN3) encode une désoxyribonucléase (Table V). Aucun variant n'a été identifié (Table V).

#### **2.1.3.16 Séquençage du gène LOC149643**

La fonction du gène LOC149643 est inconnue. Aucun variant n'a été identifié (Table V).

#### **2.1.3.17 Séquençage du gène FAM71A**

La fonction du gène «family 71A» (FAM71A) est inconnue (Table V). Un variant déjà connu a été identifié (Table V).

#### **2.1.3.18 Séquençage du gène BATF3**

Le gène «basic ATF3» (BATF3) encode un facteur de transcription <sup>59; 60</sup>. Aucun variant n'a été identifié (Table V).

### 2.1.3.19 Séquençage du gène NSL1

Le gène «*nnf1-17 synthetic lethal 1*» (NSL1) encode la protéine Nsl1 qui se localise à l'intérieur du kinétochore proximal à l'ADN centromérique et qui joue un rôle dans l'assemblage et l'intégrité des kinétochores, l'établissement d'une interaction entre le kinétochore et le fuseau bipolaire requise pour le checkpoint, le bon alignement, le bon nombre et la bonne ségrégation des chromosomes et la progression du cycle cellulaire<sup>61-64</sup>. Un variant déjà connu a été identifié (Table V).

### 2.1.3.20 Séquençage du gène ATF3

Le gène «*activating transcription factor 3*» (ATF3) encode une protéine qui s'exprime dans le nerf périphérique et qui joue un rôle dans la régulation de la transcription (Table V). Trois variants déjà connus ont été identifiés (Table V).

Les facteurs «*activating transcription factor*» (ATF) font partie de la famille des facteurs de transcription qui possèdent un domaine «*basic zipper*» (bZIP)<sup>65</sup>. Le gène ATF3 fait partie de cette famille. Le gène ATF3 humain possède quatre exons distribués sur quinze kilobases<sup>65</sup>. Il possède une boîte TATA consensus et des sites de liaison pour des facteurs de transcription incluant AP-1, ATF/CRE, E2F, Myc/Max et NF-kappa B<sup>65</sup>. La protéine ATF3 possède une masse moléculaire de 22 kD et 181 acides aminés<sup>65</sup>. La région basique du domaine bZIP permet à ATF3 de lier l'ADN<sup>65</sup>. La région zipper du domaine bZIP permet à ATF3 de former des homodimères et des hétérodimères avec d'autres protéines incluant ATF2, c-Jun, Jun B et JunD<sup>65-68</sup>. ATF3 s'exprime à un faible niveau dans les cellules quiescentes<sup>65</sup>. L'induction de son expression survient suite à différentes conditions pathophysiologiques<sup>69; 70</sup>. Suite à la coupure du nerf périphérique, l'induction de l'expression d'ATF3 survient dans les neurones sensitifs des «*dorsal root ganglion*» (DRG) et moteurs de la moelle épinière<sup>71</sup>. ATF3 consiste donc à un marqueur neuronal de choix lors de blessures infligées aux nerfs du système nerveux<sup>71</sup>. Il existe plusieurs variants d'épissage d'ATF3 dont les principaux sont «*ATF3*» et «*ATF3ΔZip*» et les autres sont «*ATF3Δzip2*», «*ATF3Δzip2a*» et «*ATF3Δzip2b*»<sup>72</sup>. La protéine encodée par le variant ATF3 possède un domaine bZIP, se lie à l'ADN et réprime la transcription de nombreux gènes en stabilisant les cofacteurs inhibiteurs<sup>72</sup>. La protéine encodée par le variant ATF3Δzip ne possède pas de domaine bZIP, ne se lie pas à l'ADN et active la transcription de nombreux gènes en séquestrant les cofacteurs inhibiteurs<sup>72</sup>. La protéine

encodée par le variant ATF3  $\Delta$ zip2 ne possède pas de domaine bZIP, ne se lie pas à l'ADN et inhibe la répression de la transcription par le variant ATF3<sup>69</sup>. Il existe plusieurs promoteurs alternatifs et plusieurs sites initiateurs pour la transcription d'ATF3 dont leur induction dépend du stimulus<sup>73</sup>. L'usage de l'un ou de l'autre des promoteurs déterminerait la destinée de la cellule<sup>73</sup>. Par exemple en absence du NGF, la régulation d'ATF3 survient de façon positive<sup>74</sup>. ATF3 médie également ses effets sur la transcription en se liant à d'autres protéines<sup>75</sup>. Dans les tissus sains, ATF3 hétérodimérise avec gadd153/Chop10, ne lie pas le site consensus et ne réprime pas la transcription<sup>75</sup>. Dans les tissus stressés, l'homodimère d'ATF3 s'induit<sup>75</sup>. ATF3 peut aussi se réprimer et réprimer son propre répresseur gadd153/Chop10<sup>76; 77</sup>. ATF3 joue de nombreux rôles antagonistes notamment l'apoptose et le cancer (Fig. 8)<sup>78</sup>. ATF3 médie ses effets sur l'apoptose et le cancer en activant ou en réprimant la transcription de gènes impliqués dans l'une ou dans l'autre destinée cellulaire<sup>79</sup>. La voie de p38 induit ATF3 qui médie ses effets apoptotiques<sup>80</sup>. ATF3 induit l'apoptose en réprimant la tumorigénicité médiée par Ras<sup>81; 82</sup>. L'hétérodimère ATF3/c-Jun médie l'apoptose par la voie de EGF/Ras/Raf<sup>81; 82</sup>. Suite à une lésion du nerf et à l'induction de la voie de c-jun, ATF3 contribue à sa régénération en augmentant la croissance cellulaire des neurones blessés<sup>83; 84</sup>. ATF3  $\Delta$ zip2 réprime l'activité anti-apoptotique de NF-kappa B en séquestrant les cofacteurs de la transcription CBP/p300<sup>85</sup>. Suite à l'induction de la voie de c-Myc, ATF3 contribue à la prolifération cellulaire<sup>86</sup>. ATF3 stabilise p53 menant à de l'activité oncogénique et à de la transformation maligne<sup>87</sup>. ATF3 jouerait le rôle de suppresseur de tumeur en médiant ses effets par la voie du TGF-beta qui activerait Smad3 qui induirait l'expression d'ATF3 et son recrutement au promoteur en formant un complexe et en réprimant le facteur tumoral Id1<sup>85; 88; 89</sup>.

Suite au séquençage de la moitié des gènes contenus dans l'intervalle candidat, nous aurions pu séquencer tous les autres gènes. Nous nous sommes cependant arrêtés au gène candidat ATF3 qui nous apparaît comme celui idéal. Le gène ATF3 cadre bien avec les gènes causant les NHTA. Nous avons trouvé certaines évidences qui démontrent que le gène ATF3 pourrait être impliqué dans cette même voie biochimique. ATF3 jouerait un rôle dans la voie de NGF qui active la voie de PI3K qui active c-Fos qui induit l'expression d'ATF3<sup>90; 91</sup>. ATF3 jouerait un rôle dans la voie de Rab6 qui est impliquée dans le trafic des vésicules du golgi vers le réticulum endoplasmique et des endosomes vers le golgi et ainsi dans la fragmentation du golgi<sup>92</sup>. La fragmentation du golgi est un phénomène cellulaire identifié dans certaines maladies neurodégénératives causées par des anomalies dans le trafic vésiculaire<sup>92</sup>. ATF3 pourrait jouer un rôle dans la voie de

SPTLC1, car l'expression d'ATF3 augmente dans des cellules de DRG exprimant le gène muté SPTLC1<sup>C133W</sup> <sup>22</sup>.

L'intérêt pour ce gène nous a poussé à effectuer un immunobuvardage de type Western contre ATF3. Cependant, nous n'avons vu aucune différence entre l'expression du gène chez les cas comparativement aux contrôles (Fig. 10). Cela dit, l'immunobuvardage a été effectué à l'aide de protéines extraites de lymphocytes. Hors, certains variants d'épissage ne s'expriment que dans des tissus spécifiques. Donc, il se pourrait que la mutation causant la maladie ait un effet sur un variant d'épissage spécifique à un tissu tel que le nerf périphérique ou la rétine. Afin d'investiguer cet aspect, il faudrait procéder à des buvardages de type Northern à l'aide d'autres tissus comme le nerf périphérique ou la rétine pour vérifier l'existence d'autres variants d'épissage. De nombreuses études ont été réalisées sur le gène ATF3 et beaucoup d'entre elles ont démontré qu'il existe plusieurs variants d'épissage du gène ATF3 <sup>72</sup>. Ces différents variants s'activent suite à diverses conditions pathophysiologiques, homodimérisent ou hétérodimérisent avec d'autres protéines, se lient ou non à l'ADN et activent ou répriment la transcription de gènes cibles en fonction de toutes ces conditions <sup>65; 66; 69; 70; 72</sup>. Les neurones font partie des cellules les plus différenciées du corps et certaines protéines ubiquitaires doivent s'exprimer de façon spécifique dans les neurones <sup>5</sup>. Le gène ATF3 pourrait en faire partie. Nous sommes en train de séquencer les introns du gène ATF3 afin de potentiellement trouver une mutation présente dans un variant d'épissage, mais nos résultats ne sont pas concluants au moment du dépôt de ce mémoire.

Table V. Fonction, expression et variants associés aux gènes séquencés.

Gène	Fonction <sup>1</sup>	Expression Nerf périphérique/ Rétine <sup>1</sup>	SNP <sup>1</sup>	Variant <sup>1</sup>	Fréquence du génotype chez les atteints (HapMap CEU) <sup>1,2</sup>
<b>SYT14</b>	Intégrité des synapses	Rétine	rs2307890 rs2494187 rs17188183 rs17188190	c.675_677delAGA c.1164+80A>T c.1362T>C g.38555015G>A	--- 0,034 0,033 0,033
<b>SERTAD4</b>	Inconnue	Nerf périphérique	---	---	---
<b>HHAT</b>	Palmitoylation de hedgehog	Nerf périphérique	---	---	---
<b>KCNH1</b>	Canaux potassium	---	---	---	---
<b>CR621662</b>	Inconnue	---	---	---	---
<b>RCOR3</b>	Répression de la transcription	---	---	---	---
<b>RD3</b>	Inconnue	Rétine	---	---	---
<b>INTS7</b>	Épissage des petits ARNs nucléaires U1 et U2	---	---	---	---
<b>DTL</b>	Inconnue	Nerf périphérique	---	---	---
<b>PPP2R5A</b>	Contrôle de la croissance et de la division cellulaire	Nerf périphérique et rétine	rs17042034 rs1774249 rs10019	c.-438G>T c.564C>T g.6052156T>A	--- 0,136 0,133
<b>SNORA16B</b>	ARN nucléolaire	---	---	---	---
<b>TMEM206</b>	Inconnue	Rétine	rs518793 rs3767863 rs3767862 rs3767861 rs2275712	c.-107G>C g.6055486C>T g.6055481G>A g.6055332G>A g.6135608C>G	0,073 --- 0,145 0,208 0,103
<b>NENF</b>	Activité neurotrophique	Rétine	---	---	---
<b>CR624623</b>	Inconnue	---	---	---	---
<b>ATF3</b>	Régulation de la transcription	Nerf périphérique	rs11119988 rs1126526 rs10475	g.6305985G>A g.6311284C>T g.6311392T>C	0,271 0,017 0,633
<b>FAM71A</b>	Inconnue	---	rs3122712	c.758A>G	0,810
<b>BATF3</b>	Facteur de transcription	---	---	---	---
<b>NSL1</b>	Localisation aux kinétochores	---	rs3738800	c.313+35G>A	0,052
<b>TATDN3</b>	Déoxysyribonucléase	---	---	---	---
<b>LOC149643</b>	Protéine hypothétique	---	---	---	---

<sup>1</sup> Ces données ont été tirées du site web de UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>).<sup>2</sup> La population HapMap CEU se constitue de résidents de l'Utah avec des ancêtres de l'Europe du Nord et de l'Ouest.



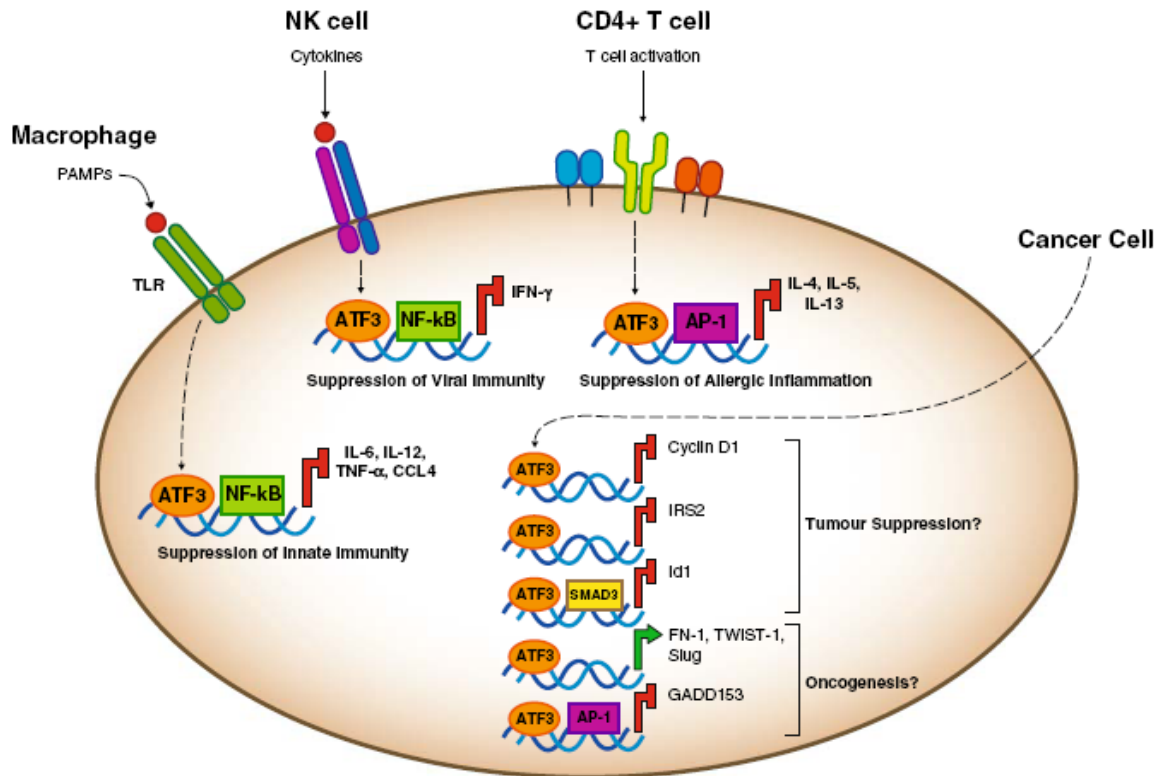
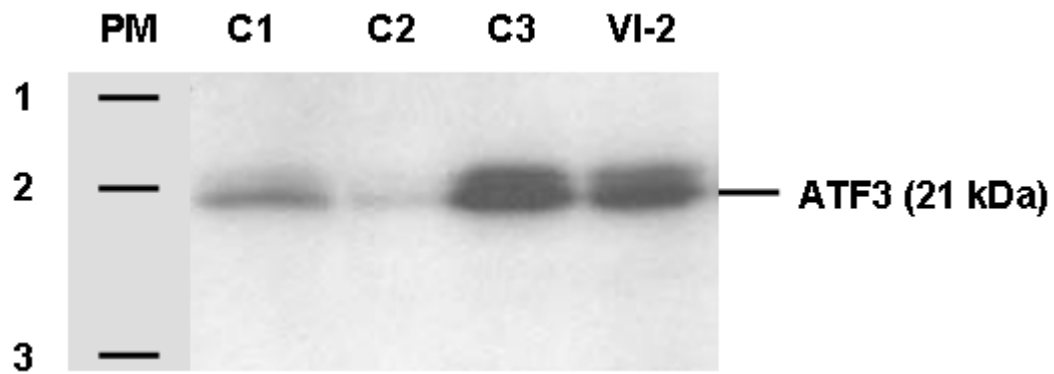


Figure 9. Fonctions d'ATF3 <sup>65</sup>.



**Figure 10. Immunobuvardage de type Western contre ATF3.** Les numéros 1, 2 et 3 représentent les bandes indiquant les poids moléculaires 37,1 kDa, 25,9 kDa et 19,4 kDa, respectivement. Le temps d'exposition a été d'une durée de 5 minutes. PM = poids moléculaire ; C1 = contrôle 1 ; C2 = contrôle 2 ; C3 = contrôle 3 et VI-2 = cas espagnol.

## CHAPITRE 3 ARTICLE

### 3.1 Introduction

#### 3.1.1 Phénotype de l'ACPRP

Berciano et Polo ont identifié deux familles originaires de Cantabrie au Nord de l'Espagne et issues d'une population gitane dans lesquelles ils ont identifié sept individus atteints d'une neuropathie sensitive avec rétinite pigmentaire et ataxie (NSRPA) autosomique récessive<sup>93</sup>. L'âge d'apparition de la NSRPA se situait entre deux et quatorze ans<sup>93</sup>. L'âge à l'examen clinique se situait entre quatre et quarante ans avec une médiane de vingt-deux ans<sup>93</sup>. Les cas présentaient un phénotype homogène et souffraient d'une ataxie cérébelleuse progressive, d'une rétinopathie pigmentaire, d'une perte de l'acuité visuelle, d'une vision tubulaire, d'une absence de potentiel d'action des nerfs sensitifs distaux, d'une absence de réflexes ostéotendineux et d'une dysarthrie cérébelleuse<sup>93</sup>.

Nee et Higgins ont identifié une famille américaine originaire de la Hollande et issue d'une population sectaire dans laquelle ils ont identifié six individus atteints d'une ataxie sensitive de la colonne postérieure avec rétinite pigmentaire (ACPRP) autosomique récessive<sup>94</sup>. Les cas étaient âgés entre huit et trente-neuf ans<sup>94</sup>. Les six cas présentaient un phénotype homogène et souffraient d'une diminution de la sensation de la vibration et de la position, d'une absence des réflexes, d'une scoliose, d'une instabilité à la démarche, d'une rétinite pigmentaire, d'une déglutition difficile, d'une achalasia et de vomissements biliaires<sup>94</sup>. Berciano a affirmé que l'appellation «ataxie de la colonne postérieure et rétinite pigmentaire» était plus approprié que l'appellation «ataxie cérébelleuse, rétinite pigmentaire et neuropathie», car l'ataxie cérébelleuse représentait seulement un signe mineur de la maladie<sup>95</sup>. Berciano et Higgins ont donc convenu que leurs familles présentaient le même phénotype<sup>95</sup>. Higgins et Loveless ont décrit davantage la maladie comme une diminution de la proprioception, une diminution des réflexes, une ataxie sensitive, une scoliose, une contracture des doigts, un handicap visuel accompagné d'un anneau de scotome rendant les atteints aveugles et limitant grandement leur mobilité, une achalasia et une dysmobilité gastro-intestinale<sup>96</sup>.

### 3.1.2 Cartographie du locus lié à l'ACPRP

Higgins et Loveless ont criblé le génome des individus de leur famille américaine avec des marqueurs STR et ont procédé à une analyse de liaison <sup>96</sup>. Ils ont démontré que le gène causant l'ACPRP se trouvait dans l'intervalle candidat de 8,3 cM entre les marqueurs STR D1S2692 et D1S414 au locus 1q31-q32 avec un LOD score de 8,94 <sup>96</sup>. En collaboration avec le groupe de Berciano, Loveless et Higgins ont procédé à un autre crible du génome des individus de leur famille espagnole avec des marqueurs STR ciblant le locus ACPRP et à une analyse de liaison <sup>97</sup>. Ils ont obtenu un LOD score de 3,56 pour une région de 11,6 Mb entre les marqueurs STR D1S2692 et D1S549 au locus 1q31-q32 <sup>97</sup>. Les haplotypes étant différents entre les cas des deux familles, les deux groupes ont conclu qu'il s'agissait de deux mutations indépendantes émergées de deux populations <sup>97</sup>.

### 3.1.3 Hypothèse

Aux 18<sup>e</sup> et 19<sup>e</sup> siècles, des centaines de Basques se sont établis au Québec et en Acadie dans des centres côtiers éloignés les uns des autres <sup>40</sup>. Ces Basques, pour la majorité des hommes célibataires, ont épousé des Canadiennes françaises <sup>40</sup>. Ils ont laissé une importante descendance et ils ont ainsi contribué fortement au bagage génétique de ces régions <sup>40</sup>. D'ailleurs, de nombreux patronymes dans l'est du Québec et en Acadie possèdent une origine basque <sup>40</sup>. Semblerait-il, suite au naufrage d'un navire dont l'équipage basque serait demeuré dans la région, que la ville de Paspébiac a conservé une empreinte marquée de la culture basque <sup>40</sup>. Comme de fait, la plupart des membres de la famille atteinte de la NHSRPA possèdent des patronymes d'origine basque <sup>40</sup>. Lors de la compilation des données généalogiques, nous avons identifié un ancêtre au patronyme d'origine basque-française, dont la graphie a évolué au cours du temps, venu s'établir à Paspébiac vers la fin du 18<sup>e</sup> siècle. Ces indices ont mené à l'hypothèse que la famille canadienne-française et la famille basque espagnole pourraient partager la même mutation historique qui aurait subi une migration transatlantique.

### 3.1.4 But et objectifs

Après avoir identifié le locus lié à la NHSRPA et compris qu'il était identique à celui lié à l'ACPRP, notre but fût d'identifier le gène causant la NHSRPA. Nous voulions

comparer les haplotypes entre les cas des familles canadienne-française et espagnole afin de confirmer notre hypothèse de filiation et réduire l'intervalle candidat.

### 3.1.5 Accord des coauteurs

**Nom** : Maria Lisa Putorti

**Programme et sigle** : Biologie Moléculaire – 2-466-1-0


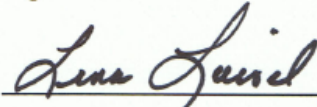
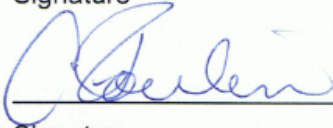
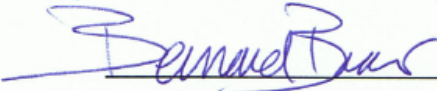
**Titre** : Transatlantic identity by descent homozygosity mapping to a 203 kb of the PCARP locus on 1q32.3

**Auteurs** : M. L. Putorti, M. Srour, L. Loisel, C. Poulin et B. Brais

**Revue** : *Brain*

**Statut** : En rédaction

**Déclaration** : À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Maria Lisa Putorti inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Caractérisation clinique et génétique d'une famille canadienne-française atteinte de la neuropathie héréditaire sensitive avec rétinite pigmentaire et ataxie».

Myriam Srour		<u>03-12-2009</u>
	Signature	Date
Lina Loisel		<u>03-12-2009</u>
	Signature	Date
Chantal Poulin		<u>2009-12-09</u>
	Signature	Date
Bernard Brais		<u>2009-12-08</u>
	Signature	Date

### **3.1.6 Contributions des coauteurs**

**Maria Lisa Putorti** : Analyse de liaison génétique, séquençage des gènes candidats et rédaction du manuscrit

**Myriam Srour** : Évaluation clinique des patients et révision du manuscrit

**Lina Loisel** : Recrutement des familles

**Chantal Poulin** : Évaluation clinique des patients et révision du manuscrit

**Bernard Brais** : Évaluation clinique des patients et rédaction du manuscrit

### **3.2 Transatlantic identity by descent homozygosity mapping to a 203 kb of the PCARP locus on 1q32.3**

**Running title : PCARP locus mapping**

**M. L. Putorti <sup>1</sup>, M. Srour <sup>1</sup>, L. Loisel <sup>1</sup>, C. Poulin <sup>2</sup> and B. Brais <sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratoire de neurogénétique de la motricité, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

<sup>2</sup> Montreal's Children Hospital of the McGill University Health Center

Correspondence to : Bernard Brais, MD, Mphil, PhD, Laboratoire de neurogénétique de la motricité, M4211-L3, Hôpital Notre-Dame, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 1560 Sherbrooke Est, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1

Telephone : (514) 890-8000, # 25560

Fax : (514) 412-7525

Keywords : hereditary sensory neuropathy ; retinitis pigmentosa ; ataxia ; genome-wide scan ; homozygosity mapping ; identity by descent

Abbreviations : DRG = dorsal root ganglion ; FC = French Canadian ; LOD = logarithm of the odds ; PCARP = posterior column ataxia and retinitis pigmentosa ; SNP = single nucleotide polymorphism ; STR = short tandem repeat



## Abstract

Hereditary sensory neuropathies are a clinically and genetically heterogeneous group of disorders. Posterior column ataxia associated with a retinitis pigmentosa (PCARP, OMIM 609033) is a rare autosomal recessive sensory neuropathy. The study of a Spanish and American family with PCARP has allowed mapping of the causative locus to a 8.3 cM region on chromosome 1q31-q32. We recruited a large French-Canadian (FC) family with four cases of PCARP. Genome-wide scanning linked this family to the previously described PCARP locus (LOD score of 3.0). Because all FC cases come from the small Paspébiac village of Gaspésie well known for its Basque settlers in the XVIIIe century, the possibility that the FC cases may share the same historical mutation with the Spanish family of Rom background was raised. Comparison of the carrier haplotype between the Spanish and FC families established that they shared a rare 60 SNP marker haplotype (rs4543871-rs3738800) which enabled us to reduce the previously reported candidate interval to a 203 kb interval which contains only four genes. The sequencing of exons and intron/exon borders of *ATF3*, *FAM71A*, *BATF3* and *NSL1* did not uncover any mutations.

## Introduction

Hereditary sensory neuropathies are a clinically and genetically heterogeneous group of disorders <sup>1-4</sup>. Berciano and Polo characterized an early-onset recessive ataxia with retinitis pigmentosa and sensory neuropathy in seven cases belonging to two Rom families from Cantabria in Northern Spain <sup>5</sup>. Nee and Higgins characterized a large American family of Dutch extraction with six cases affected by a posterior column ataxia and retinitis pigmentosa (PCARP, OMIM 609033) <sup>6</sup>. Comparing the Spanish and the American-Dutch phenotypes led to the conclusion that all cases were affected by the same condition and that it should be referred to as PCARP considering that ataxia was mostly secondary to the sensory neuropathy <sup>7</sup>. Loveless and Higgins first linked the American-Dutch family to chromosome 1q31-q32 (LOD score of 8.94) <sup>8</sup>. They defined an 8.3 cM candidate interval flanked by microsatellites markers D1S2692 and D1S414 <sup>8</sup>. In collaboration with Berciano, Loveless and Higgins linked the Spanish cases to the same locus (LOD score of 3.56, D1S2692-D1S549, 11.6 Mb) <sup>9</sup>. They observed discordant haplotypes between the two families, suggesting that two historically distinct mutations arose in the two populations <sup>9</sup>. We uncovered a large family with an autosomal recessive sensory neuropathy with retinitis pigmentosa originating from the French-Canadian (FC) village of Paspébiac. Situated in the Gaspésie region of North-Eastern Quebec, Canada, it is known for the presence of other recessive diseases with founder effects and for its founding by some Basque settlers in the XVIIIe century <sup>10;11</sup>. In this paper, we show that this family is linked to the PCARP locus and that they likely carry the same historical mutation as the Spanish cases, which allowed us to fine map the locus to a 203 kb candidate interval containing only four genes.

## Subjects and methods

### *Clinical assessment*

Cases and family members were recruited from the Montreal's Children Hospital of the McGill University Health Center and from the neuromuscular clinic of the Centre de Réadaptation Marie-Enfant of the CHU Hôpital Sainte-Justine. Cases underwent a detailed neurological examination by experienced neurologists (B. B., C. P. and M. S.). Geographical and genealogical data were collected by a research nurse (L. L.). This research project was approved by the institutional ethics committee of the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Informed consent was obtained from participating cases and family members. DNA from Spanish cases IV-2, IV-10, IV-14, V-1 and V-3 were generously provided by Dr J. J. Higgins and Dr J. Berciano<sup>9</sup>.

### *Genome-wide scan and fine mapping*

A first microsatellite genome-wide scan was performed at deCODE genetics (Reykjavik, IC) on cases IV-5, V-4 and VI-2 and family members III-3, III-4, IV-1, IV-2, IV-3, IV-4, IV-7, IV-8, V-1, V-2, V-3, VI-1 and VI-3 belonging to a FC family. Genotypes were generated for 500 STR markers separated by an average of 8 cM. Another SNP genome-wide scan was performed on cases VI-2 belonging to the FC family and on case V-3 belonging to the Spanish family<sup>9</sup>. Genotypes were generated for 620 000 SNP markers separated by an average of 4.7 kb based on the genomic sequence of the candidate region (<http://www.genome.ucsc.edu>, Mar 2006 assembly) using the Human 610-Quad BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) at the Genome Quebec Innovation Centre of the McGill University (Montreal, QC, CA).

### *Linkage analysis*

Multipoint parametric linkage analysis was performed using Genehunter v.2.1<sup>12</sup>. Marker order and genetic distances were based on the deCODE genetic map (Reykjavik, IC) and UCSC physical map (<http://genome.ucsc.edu>, Mar 2006 assembly). Allele frequencies provided by deCODE genetics (Reykjavik, IC) and based on genotypes of 186

chromosomes from FC individuals not participating in this study were used. The PCARP phenotype was analyzed as an autosomal recessive trait with 100% penetrance and with an estimated disease gene frequency of 0.001. No phenocopies were incorporated into the analysis. The haplotypes were reconstructed in a single section using the maximum probability method of Genehunter v.2.1<sup>12</sup>.

#### *Sequencing of candidate genes (ATF3, FAM71A, BATF3 and NSL1)*

DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using the Genra Puregene Blood Kit (Qiagen, Mississauga, ON, CA) or from saliva using the Oragene DNA Extraction Kit (DNA Genotek, Kanata, ON, CA). RNA was extracted from immortalized lymphoblasts using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The RNA samples were treated with the Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to obtain the reverse transcriptase products. The non specific primers used for the RT-PCR were the OligodT and the Random Hexamers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The resulting RT products were used as a template for PCR amplification of the entire coding region of the genes RNA messenger transcripts with the Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech, Mountain View, CA, USA). Mutation screening of the four candidates *ATF3*, *FAM71A*, *BATF3* and *NSL1* genes was performed by genomic sequencing of the entire coding and a minimum of 30 pb of intronic flanking sequences and coding sequencing of the cDNA sequences. PCR primers used to amplify the DNA were designed using the ExonPrimer tool (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>) or the Primer3 v.0.4.0 tool (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Large sequences were divided into overlapping fragments. Primers were synthesized by Alpha DNA (Montréal, QC, CA), IDT (Coralville, IA, USA) and Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Fragments were amplified using a standard amplification mix. The PCR and RT-PCR products and primer pairs were sent to the Genome Quebec Innovation Centre of the McGill University (Montréal, QC, CA) for forward and reverse sequencing. Sequences were aligned using EditSeq v.5.02 (DNASTAR, Madison, WI, USA) and SeqMan v.5.01 (DNASTAR, Madison, WI, USA) and analysed using SeqMan v.5.01 (DNASTAR, Madison, WI, USA) and Mutation Surveyor v.3.1 (PA, USA). Polymorphisms were confirmed by amplification and sequencing of the specific region for the entire cohort.

## Results

We recruited a large FC family in which we identified four cases affected by a childhood-onset hereditary sensory neuropathy with retinitis pigmentosa (Fig. 1). The two males and two females were 16-51 years old (Tab. I). They presented orthopedic deformities, scoliosis, mild distal weakness of intrinsic hand and foot muscles, and delayed walking. Their perception of fine touch and vibration was decreased. Proprioception was absent in the feet. Deep tendon reflexes were absent. Walking became impossible in all cases. The upper limb ataxia was present but mild. Recurrent urinary tract infections and incontinence were other features. Our first literature search at the time of recruitment for a recessive sensory neuropathy associated with a retinitis pigmentosa did not uncover the publications on PCARP<sup>5-9</sup>. Therefore, we completed a genome-wide scan using STR markers and linked our family to the PCARP locus with a LOD score of 3,0 on chromosome 1q32.2-q41 (Fig. 2). A recombinant present in case VI-2 delimited a candidate interval of 6.7 Mb between STR markers D1S2692 and D1S237 (Fig. 1). SNP homozygosity mapping further refined the candidate interval to 5.3 Mb between SNP markers rs643930 and rs1434889 on chromosome 1q32.2-q32.3 (Data not shown). Considering the FC family Basque ancestors, we contacted Dr Berciano to establish if the FC cases and the Spanish cases could share the same mutation by descent, which could allow further fine mapping of the mutated gene. As shown in table II, the FC case VI-2 and the Spanish case V-3 share a 203 kb haplotype between SNP markers rs4543871 and rs3738800 at the 1q32.3 locus (Tab. II). We did not observe the same haplotype in more than 80 unrelated phased FC chromosomes (Data not shown). Together, our results are highly suggestive that indeed the Spanish-Rom mutation was introduced by one or a few immigrants to the Gaspésie region of Quebec. This allows us to substantially narrow the previously published interval from 11.6 Mb to 203 kb<sup>9</sup>.

This 203 kb candidate interval contains four known genes: *ATF3*, *FAM71A*, *BATF3* and *NSL1* (Fig. 3). Nnfl-17 synthetic lethal (*NSL1*) is a kinetochore complex component and is required for normal chromosome alignment and segregation and kinetochore formation during mitosis<sup>13-16</sup>; family 71A (*FAM71A*) is a hypothetical protein without known function; basic ATF-like 3 (*BATF3*) is a leucine zipper transcription factor and functions as a repressor when heterodimerizing with JUN<sup>17,18</sup>; and activating transcription factor 3 (*ATF3*) functions as a transcriptional repressor (longer isoform) and a transcriptional activator (shorter isoform)<sup>19-21</sup>. *ATF3* is by far the most interesting candidate gene of the four because it is highly expressed in the dorsal root ganglion (DRG) neurons<sup>19-21</sup>. *ATF3*

was shown to contribute to nerve regeneration by increasing the intrinsic growth state of injured neurons<sup>19-21</sup>. We have sequenced the complementary and genomic coding DNA of all of these genes and have found no mutations. However, we have found a rare polymorphism (rs11119988) in the *ATF3* gene with a heterozygosity of  $0.062 \pm 0.165$  situated 154 pb before the second exon, which further supports that this region is shared between the FC and Spanish families. In the UCSC database, there are no individuals sharing the same homozygote genotype as the FC and Spanish cases.

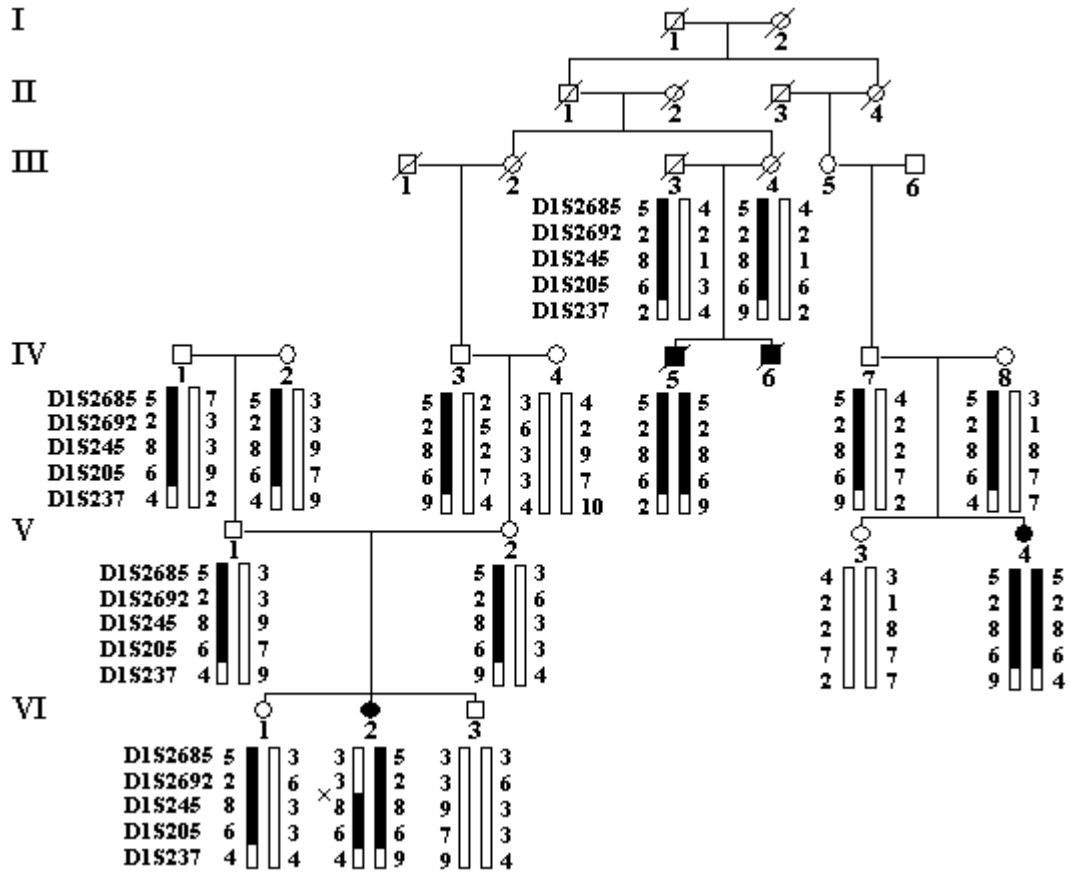
## Conclusion

Here, we report a FC family originating from Paspébiac in Gaspésie affected by PCARP (OMIM 609033). The FC, Spanish and American-Dutch families are clinically similar. The FC family is also linked to the PCARP locus on chromosome 1q32.2-q32.3 as are the Spanish and American-Dutch families. Interestingly, Paspébiac witnessed a series of settlements by Basque fishermen from France and Spain after the XVIII<sup>e</sup> century<sup>11</sup>. While assembling our genealogical and geographical data, we noticed that many family members had Basque family names. In particular, one shared Basque ancestor originated from Bidart in France near the Spanish Basque region settled in Paspébiac in the XVIII<sup>e</sup> century. Based on these observations, we decided to compare the SNP haplotypes of a FC case with a Spanish case for our locus. We discovered a rare haplotype, common for both cases, of 203 kb spanning four genes as potential disease causing. Therefore, it appears that the FC and the Spanish families are distantly related. In the candidate interval, no mutation was found to date by classical exon and exon/intron sequencing. The *ATF3* gene remains the most intriguing candidate because of its role in transcriptional activation and its high expression in DRG neurons<sup>19-21</sup>. A search for rare alternatively spliced retinal DRG transcripts is underway as is full genomic sequencing of the *ATF3* gene. This study illustrates the benefits of comparing European and FC samples in rare diseases and performing transatlantic identity by descent homozygosity fine-mapping to substantially narrow a candidate interval.

## **Acknowledgements**

We would like to thank all family members for their participation at our study. This work was supported by the Fondation de la névrite sensitive. We would like to thank Dr J. J. Higgins and Dr J. Berciano for sharing with us some DNA on the Spanish PCARP cases.

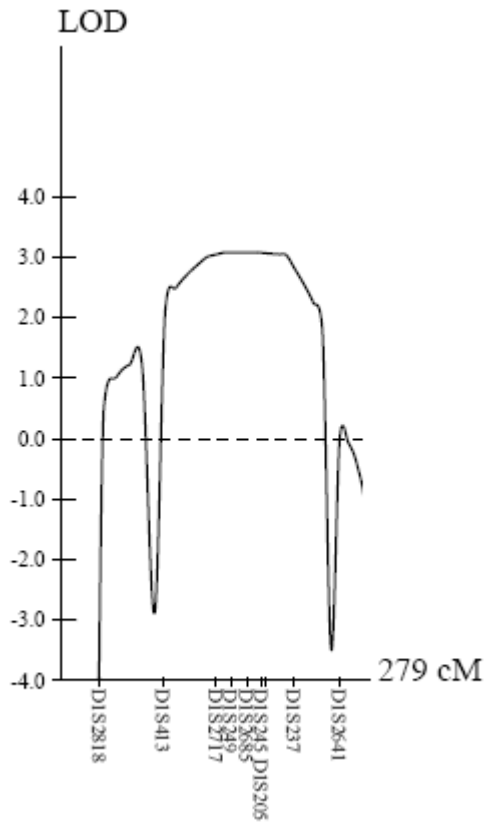




**Figure 1. Pedigree of the FC family with PCARP.** The circles represent females and the squares represent males. The black circles and squares represent affected individuals with PCARP (n = 4). Symbols of unaffected individuals are not shaded. Reconstructed haplotypes for the five chromosome 1q markers, D1S2685, D1S2692, D1S245, D1S205 and D1S237 are shown below individuals. Haplotypes segregating with the disease are represented by boxed and black shaded symbols.

**Table I. Clinical summary of two PCARP Paspebiac cases.**

	Case V-4	Case VI-2
Date of birth	20-06-1993	14-12-1994
Age in 2009	16 y	15 y
Age at exam	14 y	13 y
Age at diagnosis	18 mo	9 mo
Presentation	Osteomyelitis	Mutilation
Neonatal	Seizures	---
Walked	4 y	2 y
Stopped walking	---	8 y
Scoliosis	Yes	Yes
Retinitis Pigmentosa	Yes	Yes
Recurrent Osteomyelitis	Yes	No
Recurrent UTI	Yes	Yes
Urinary incontinence	Yes	Yes
Fecal incontinence	No	Occasional
Orthostatic hypotension	No	No
Orthopedic deformities	No major except scoliosis and finger contractures	Knees and legs
Hearing	Normal	Normal
Cognition	Normal	Normal
Charcot joints	No	Yes
Weakness	Mild distal (intrinsic hand and foot)	Mild distal (intrinsic hand and foot)
Reflexes	Absent	Absent
Vibration	Absent	Absent
Proprioception	Moderate loss	Mild loss
Fine touch	Major loss	Major loss
Nerve Biopsy	Axonal loss, no onion bulbs, no abnormal inclusions	---



**Figure 2. Multipoint LOD score distribution for the FC family PCARP.** Data are shown for the nine chromosome 1q markers, D1S2818, D1S413, D1S2717, D1S249, D1S2685, D1S245, D1S205, D1S237 and D1S2641 at the 1q32.2-q41 locus.

**Table II. Haplotypes for the FC case VI-2 and the Spanish case V-3 of PCARP on chromosome 1q32.3.** Genotypes are shown for the 60 shared SNP in black. Carrier frequencies were taken from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Marker	Position	VI-2	V-3	Frequency	Marker	Position	VI-2	V-3	Frequency
rs4543871	210824281	GG	AA	---	rs3923950	210878498	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.74
rs1877474	210824514	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.39	rs3123537	210878570	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.60
rs1105899	210825227	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.87	rs3890801	210880126	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.89
rs12401671	210825710	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.88	rs3122718	210884070	<b>CC</b>	<b>CC</b>	1.00
rs17019384	210827184	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.93	rs1553626	210893916	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.11
rs12739624	210827680	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.83	rs2501841	210894464	<b>CC</b>	<b>CC</b>	0.82
rs11119982	210831467	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.39	rs2501842	210895371	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.57
rs17019421	210832706	<b>AA</b>	<b>AA</b>	1.00	rs2456821	210908485	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.83
rs6682064	210834463	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.13	rs2501846	210908557	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.19
rs11119983	210834951	<b>CC</b>	<b>CC</b>	0.13	rs2492789	210911657	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.79
rs1567710	210835051	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.77	rs2501849	210913232	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.48
rs6670396	210835520	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.87	rs12754070	210923344	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.80
rs9430097	210838504	<b>CC</b>	<b>CC</b>	0.20	rs2501857	210923955	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.80
rs17019438	210839560	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.71	rs906363	210925420	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.88
rs3795837	210839951	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.92	rs2221593	210940054	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.87
rs17019442	210840963	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.84	rs9658807	210943525	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.88
rs12564392	210842152	<b>CC</b>	<b>CC</b>	0.97	rs2244935	210967110	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.94
rs3125296	210844909	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.18	rs12747251	210969712	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.51
rs4951629	210853506	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.95	rs15702	210978459	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.75
rs11571536	210853543	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.92	rs2174780	210986030	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.10
rs11571537	210853648	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.97	rs1507358	210991984	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.27
rs10475	210860236	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.82	rs6540762	210992480	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.25
rs1126700	210860472	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.92	rs12404885	210993790	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.27
rs11119989	210862315	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.98	rs11120012	210995829	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.52
rs7533306	210864513	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.79	rs4951638	210997838	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.62
rs3122712	210865600	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.28	rs11808846	211010204	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.73
rs3122713	210866493	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.87	rs10863997	211014143	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.22
rs3795842	210866572	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.28	rs1007036	211017987	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.25
rs17019491	210871588	<b>GG</b>	<b>GG</b>	0.10	rs3738803	211022542	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.78
rs3123536	210876229	<b>AA</b>	<b>AA</b>	0.87	rs3738800	211027489	AA	GG	---

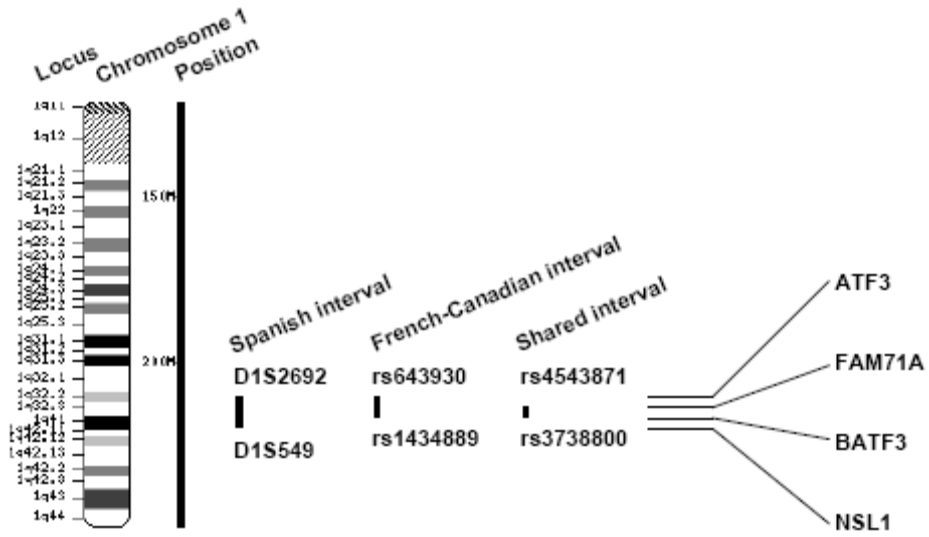


Figure 3. Illustration of the various candidate regions for PCARP.

## Supplementary material

**Table 1. Primers used for candidate genes amplification of the gDNA.** Genes are ordered according to their centromeric-telomeric position.

Fragment	Forward primer	Reverse primer
ATF3_promalternatif	CCGAAC TTGCATCACCAGT	CGGCGGACTGGTTACTTAGA
ATF3_exon1	CAGGATGATGGAAGGCTGTC	GAACTGCTCACTTTCCCACC
ATF3_exon2	GGTGTGGAGGTCTGGTGG	AGAACATGCCCAACACACAG
ATF3_exon3	GCTAGCATTGCCCTTGTCTG	GGGAAACTATAACCAAGTAGGGG
ATF3_exon4_1	CCAGGTACACCCCTGCATC	CTGCCTGAATCCTAACGGTG
ATF3_exon4_2	TTTAGGCCTTAACACACTGGC	TGGAGAGTCCTAACCCCTTGG
ATF3_exon4_3	AACACAAAATCCATGGGCAG	ATAATGGGGAGGGAAAGGC
ATF3_exonalternatif	GGCAACACGGAGTAAACGAC	CGAGCACCGAGGACTCAC
ATF3_3'UTRsupp	CAGAATCGACTAAGCCACCA	TCTGAGCCTTCAGTTCAGCA
FAM71A_exon1_1	AACAAAGGGGTATGTGACAGC	GGGCTGGTACGTGCAATG
FAM71A_exon1_2	GCACCGATATTTGAGAGCG	CTGTAGATGTTTTGGGGATGG
FAM71A_exon1_3	ACCTCTGCTGCTTATGCTGG	GACCTGCTGGAGGACTTTTG
FAM71A_exon1_4	AAGAAGGGAAAAGGACAGGG	TGCAGCACAGTTGACATCAC
BATF3_exon1	AAAAACACCGACCCCAAAC	GCTCAGGAGCCATTCCAG
BATF3_exon2	CTGTTGTGAGCCATTGGTA	AACACTGGGCTGGAAGGAC
BATF3_exon3	TCATGGGCAAGAGGTGAAC	GTGGCTGTGGGAGAGTGG
NSL1_exon1	GTTTCAGCTGCAGCGTCC	GCGTGGGATCTTTCTGAATC
NSL1_exon2	TTTCCTCTGTCACAAATCTGG	ACTCCCCTAGTAAACA ACTTCTTG
NSL1_exon3	CTTGCCATATTTGTTTTCTTC	AACAAAATGTCAC TTATCTCCACG
NSL1_exon4	TTCCTCAAAGAATGGTACTGACTC	GGGAGAATATCCTTGATGCTG
NSL1_exon5	TTAAGCTGAGGTGAATCGTCC	GATTTATTTAAAGGACCGCTGAG
NSL1_exon6_1	GGGCAACAAAGCAAGACTTC	TTTTCTCAGACTTCTCCCAGTG
NSL1_exon6_2	AACATAATTTGACTTGGA ACTAATGG	CTGCTATTGGTCATGCTTTTC
NSL1_exon6_3	GGCAGACAGCTGAGATTTG	GGCCAGGGAAAGAGGTC
NSL1_exon6_4	AGGCACATGGGAGTTAAGGC	CATATACAGCCATGTGAGCACC
NSL1_exon6_5	ACTAAGCCATGGTGGTTCCC	CAACACAGCAAGACCTTGTTTC
NSL1_exon6_6	CACTGCCTAAGGCTGGAAAG	GCGATGGCGTGATCTTG
NSL1_exon6_7	GAGGCTGGGAATTGGAGAC	CAGGTGCAGTGGCTCATTC
NSL1_exon6_8	GTTTCAAACAGGCGTGTGC	CAAGTCTCAGGTATTTATGGACTG
NSL1_exon6_9	TCATGTAGCTCTGTGGCCC	GGCTCCTAGCCTCTCCC
NSL1_exon6_10	GCAATTTGCCGTCAGTTAGG	TGATCATGGCATGTAGTAAGCAC
NSL1_exon6_11	TCCACTTTATGCCTGGAATTG	GCCCCTAGAGCTAGTCCACC
NSL1_exon6_12	CAAAGGGTTGTGAAACAGCTC	CAAGTGGAGGAAGATAGTCCTAAG
NSL1_exonalt	CTCTTCCGGAGGCTGAGG	CGATCATATCACTGGCAAACA
NSL1_reprise1	ATTCAGTGGGAGGGCTGG	GACCAGCCACATAGCGAAAC
NSL1_reprise2	TACTGCAACCTCTGCC	TCGAGTGTGCTGTGTTTTGG
NSL1_reprise3	AAAATTACCTCCAAGGCATCC	CATCCTTTAGCCTCCCAGTG
NSL1_repriseinterne1	ACAAGGTCTTGCTGTGTTGC	TCCCATACCCATTAGCAGTCA

**Table 2. Primers used for candidate genes amplification of the cDNA.** Genes are ordered according to their centromeric-telomeric position

Fragment	Amorce forward	Amorce reverse
SYT14_ADNc1	CGCATCATGGCGATTGAA	TTTACCCAGCGCTTCATCTT
SYT14_ADNc2	TTGATGCTGCTCCTTTTTTCTC	TGAGCATCTTGGACTGTTGC
SYT14_ADNc3	ATTGCAGCCACCACCATATC	GGATGCTGGTTTTTGCTCTC
SYT14_ADNc4	AAGCTTCTGGTAACAGTGACAGC	CTCTGCGGATGGATGTCTTG
SYT14_ADNc5	AAAACACTTGATAGGTGGACAGG	AAAGCATTTTTGGTAGAAGGTTGA
ATF3_ADNc1	CCAACCATGCCTTGAGGATA	GCTGCTTCTCGTTCTTGAGC
ATF3_ADNc2	GAAAAAGAGGGCGACGAGAAA	CTGGTCCAAGACCCACTCTG
ATF3_ADNc3	AAGAGGCGACGAGAAAGAAA	GTTCTCTGCTGCTGGGATTC
ATF3_ADNc4	TGGGAGGACTCCAGAAGATG	CTAACGGTGGGCATCCTG
ATF3_ADNc5	CAGCAGCAGAGAACCATCAA	GCACACACAATTTCTGGACA
ATF3_ADNc6	CAGGCAGCAGTGTCTGTACC	AGGACCTGCCATCATACTGC
ATF3_ADNc7	GGCAATGTA CTCTCCGATG	TGGTTTTCAAACATCTCTCCA
ATF3_ADNc8	ATGATGGCAGGTCCTCTGTT	TGAGAATTTACAGAAACATCAGAA
ATF3_ADNc9	GTGGTACCCAGGCTTTAGCA	CCATGTCTTGTTCCAATATTTA
FAM71A_ADNc1	GAGAGGGTCGTCACCTTCCTG	CACTGGTGAGGCAGGTCTCT
FAM71A_ADNc2	ACAGCAATCATCCGTGCTC	TCTCCCCTTTTGGTGATCTG
FAM71A_ADNc3	TGTGCTGAAAGACAACCATGA	GTACAAACCTCAGGGGCAGA
FAM71A_ADNc4	ATTGATGTGCACAACCGTGT	GCTGGAATGCCACAGGTA CT
FAM71A_ADNc5	AACAGCTGCGCCTGAAGTT	AGATGTTTTGGGGATGGATG
FAM71A_ADNc6	CCGTGAACCTTCAAGGAAAG	GTTGCCTTTGTTTCCTCCTG
FAM71A_ADNc7	CATCCATCCCCAAAACATCT	TGCATCCATGTCTGCTTCTG
FAM71A_ADNc8	CTCCAAACAGCACGAAGGTG	TTTTGGGCAATCTTGTCTCC
FAM71A_ADNc9	AGAGCAAGAGCAGCCTGAGT	TCCTCAGGAAAGAGCTGACC
FAM71A_ADNc10	AGGTCCTCATT CAGCCACAG	GGGCTTCAAAGGTC ACTGTC
FAM71A_ADNc11	AGGAACGTCAGAGCCAACCT	TGATTCTTTATTTAAACGGCAGTA
BATF3_ADNc1	CAGACGTGGGACGGGAAG	AGCCTTCTGGGTCTGCTTCT
BATF3_ADNc2	GAGAGCGGGAAGCCTGAG	GAGGCACTGGCACAAAGTT
BATF3_ADNc3	ATGAGAGCCTGGAGCAAGAA	GCACAAGGGCTCTGTGAGTT
BATF3_ADNc4	ACACTCCTCTGCCAGCA	CAGGAAAAGGAAGTGTATTGTGC
NSL1_ADNc1	CCCACAGTTCCGACGAAAA	TGATTTTCACTAACTGATCTTCAA
NSL1_ADNc2	GCTCTGCCGAGGAGATT	GTTTCCCCTCTGCATTTCAA
NSL1_ADNc3	CCCAGAAAGATCCTGGAATG	CAGAGTTTTTCTGGAAGCA
NSL1_ADNc4	TTGAAATGCAGAGGGGAAAC	ATCATATCCCCGCACAGAGA

## References

1. Auer-Grumbach, M., Mauko, B., Auer-Grumbach, P., and Pieber, T.R. (2006). Molecular genetics of hereditary sensory neuropathies. *Neuromolecular Med* 8, 147-158.
2. Houlden, H., Blake, J., and Reilly, M.M. (2004). Hereditary sensory neuropathies. *Curr Opin Neurol* 17, 569-577.
3. Klein, C.J. (2007). The inherited neuropathies. *Neurol Clin* 25, 173-207.
4. Rotthier, A., Baets, J., De Vriendt, E., Jacobs, A., Auer-Grumbach, M., Levy, N., Bonello-Palot, N., Kilic, S.S., Weis, J., Nascimento, A., et al. (2009). Genes for hereditary sensory and autonomic neuropathies: a genotype-phenotype correlation. *Brain* 132, 2699-2711.
5. Polo, J.M., Calleja, J., Combarros, O., and Berciano, J. (1991). Hereditary ataxias and paraplegias in Cantabria, Spain. An epidemiological and clinical study. *Brain* 114 ( Pt 2), 855-866.
6. Higgins, J.J., Morton, D.H., Patronas, N., and Nee, L.E. (1997). An autosomal recessive disorder with posterior column ataxia and retinitis pigmentosa. *Neurology* 49, 1717-1720.
7. Berciano, J., and Polo, J.M. (1998). Autosomal recessive posterior column ataxia and retinitis pigmentosa. *Neurology* 51, 1772-1773.
8. Higgins, J.J., Morton, D.H., and Loveless, J.M. (1999). Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa (AXPC1) maps to chromosome 1q31-q32. *Neurology* 52, 146-150.
9. Higgins, J.J., Kluetzman, K., Berciano, J., Combarros, O., and Loveless, J.M. (2000). Posterior column ataxia and retinitis pigmentosa: a distinct clinical and genetic disorder. *Mov Disord* 15, 575-578.
10. Gosselin, I., Thiffault, I., Tetreault, M., Chau, V., Dicaire, M.J., Loisel, L., Emond, M., Senderek, J., Mathieu, J., Dupre, N., et al. (2008). Founder SH3TC2 mutations are responsible for a CMT4C French-Canadians cluster. *Neuromuscul Disord* 18, 483-492.
11. Desmartis, A. (2002). Les immigrations basques aux Amériques. *Le naturaliste canadien* 126, 100-104.
12. Kruglyak, L., Daly, M.J., Reeve-Daly, M.P., and Lander, E.S. (1996). Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 58, 1347-1363.
13. Euskirchen, G.M. (2002). Nnf1p, Dsn1p, Mtw1p, and Nsl1p: a new group of proteins important for chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 1, 229-240.
14. Pinsky, B.A., Tatsutani, S.Y., Collins, K.A., and Biggins, S. (2003). An Mtw1 complex promotes kinetochore biorientation that is monitored by the Ipl1/Aurora protein kinase. *Dev Cell* 5, 735-745.



15. Scharfenberger, M., Ortiz, J., Grau, N., Janke, C., Schiebel, E., and Lechner, J. (2003). Nsl1p is essential for the establishment of bipolarity and the localization of the Dam-Duo complex. *EMBO J* 22, 6584-6597.
16. Kline, S.L., Cheeseman, I.M., Hori, T., Fukagawa, T., and Desai, A. (2006). The human Mis12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation. *J Cell Biol* 173, 9-17.
17. Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097-1100.
18. Schraml, B.U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W.L., Smith, W.A., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemerski, S., et al. (2009). The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* 460, 405-409.
19. Seiffers, R., Mills, C.D., and Woolf, C.J. (2007). ATF3 increases the intrinsic growth state of DRG neurons to enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci* 27, 7911-7920.
20. Seiffers, R., Allchorne, A.J., and Woolf, C.J. (2006). The transcription factor ATF-3 promotes neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 32, 143-154.
21. Tsujino, H., Kondo, E., Fukuoka, T., Dai, Y., Tokunaga, A., Miki, K., Yonenobu, K., Ochi, T., and Noguchi, K. (2000). Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol Cell Neurosci* 15, 170-182.

### 3.3 Conclusion

L'histoire de Paspébiac nous apprend qu'il y a eu plusieurs vagues d'immigration de pêcheurs basques qui s'y sont établis. L'ancêtre commun le plus rapproché de nos cas canadiens-français possède un nom d'origine basque. Voilà pourquoi nous avons émis l'hypothèse que les cas de la famille canadienne-française pourraient porter la même mutation que les cas de la famille espagnole. Afin de valider notre hypothèse, nous avons comparé les haplotypes entre les cas des deux familles. À première vue, il n'y avait que des petits blocs d'haplotypes partagés correspondant probablement à une filiation éloignée. En observant de plus près, nous avons identifié une petite région de 0,2 Mb correspondant à 60 SNP et contenant seulement quatre gènes candidats dont celui qui causerait la NHRPA. Tous les gènes ont été séquencés, incluant ATF3, le plus intéressant, mais aucune mutation n'a été trouvée pour l'instant. Nous ne sommes toutefois pas en mesure d'exclure ces gènes, car ils peuvent être imparfaitement caractérisés. Certains variants d'épissage spécifiques à des populations neuronales n'ont peut-être pas encore été identifiés. De futures expériences permettront d'identifier le ou les variants d'épissage spécifiques aux tissus affectés par la NHRPA de même que le gène causant cette maladie.

## CHAPITRE 4 DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les neuropathies héréditaires représentent 40% des neuropathies cliniques<sup>1</sup>. Elles affectent une personne sur 2500<sup>2</sup>. Les neuropathies héréditaires doivent donc être étudiées. La complexité de leur étude provient principalement de la longueur de l'axone pouvant atteindre plus d'un mètre chez l'humain<sup>3</sup>. La longueur de l'axone nécessite des interactions structurales, métaboliques et dynamiques complexes afin de préserver la fonction du neurone<sup>3</sup>. De nombreuses classes de protéines impliquées dans l'intégrité et la régénération des nerfs jouent des rôles dans les interactions entre les facteurs neurotrophiques et leurs ligands, le transport vésiculaire, le métabolisme des sphingolipides et le recyclage des composés de la membrane<sup>3;5</sup>.

Les NHSA forment un des plus petits groupes de neuropathies héréditaires<sup>11; 12</sup>. Elles comprennent un nombre grandissant de maladies affectant la survie des neurones sensitifs et autonomiques<sup>5</sup>. Les NHSA provoquent entre autres une diminution de la sensation de la température et de la douleur<sup>5; 10</sup>. Elles s'accompagnent aussi d'autres manifestations<sup>2; 5 10 11; 12</sup>. Il n'existe pas de traitement efficace pour les NHSA. C'est la raison pour laquelle l'identification des gènes causant ces maladies graves est essentielle à leur prévention par le conseil génétique.

Seulement six gènes ont été identifiés comme causant des NSHA<sup>24</sup>. Les gènes SPTLC1, RAB7, WNK1, IKBKAP, TrkA et NGFB causent les NHSA 1A, 1C, II, III, IV et V respectivement<sup>3-5; 11</sup>. Cinq de ces gènes semblent jouer un rôle dans le transport vésiculaire<sup>24</sup>. Selon certaines évidences, le ligand NGF se lie au récepteur TrkA<sup>19</sup>. La protéine Rab7 se lie au récepteur TrkA, provoque son accumulation dans les endosomes et transforme les endosomes précoces en des endosomes tardifs<sup>19</sup>. La protéine IKAP localise le facteur GEF qui active la protéine Rab7<sup>20; 21</sup>. La protéine SPT catalyse la formation des sphingolipides qui se font recycler vers l'appareil de Golgi par la protéine Rab7<sup>22</sup>. La protéine WNK1 aurait un rôle dans la maintenance de l'axone, mais son rôle reste à être élucidé<sup>23</sup>. Cette voie biochimique induit la croissance du neurone<sup>19</sup>.

Les mutations dans le gène SPTLC1 identifiées jusqu'à présent sont des mutations faux-sens causant une substitution d'acide aminé. Une première mutation faux-sens (c.398G>A ; p.Cys133Tyr) dans l'exon 5 a été identifiée dans des familles d'origine autrichienne<sup>12</sup>. Une deuxième mutation faux-sens (c.399T>G ; p.Cys133Trp) dans l'exon

5 a été identifiée dans des familles d'origine anglaise, australienne et canadienne <sup>12</sup>. Ces deux mutations ont également été identifiées dans des familles d'origine portugaise et tchèque <sup>9; 12; 24</sup>. Une mutation faux-sens (c.431T>A ; p.Val144Asp) dans l'exon 6 a été identifiée dans une famille d'origine australienne-anglaise <sup>12; 24</sup>. Deux autres mutations faux-sens (c.992C>T ; p.Ser331Phe et c.1055C>T ; p.Ala352Val) ont été identifiées <sup>10</sup>. Une mutation faux-sens (c.1160G>C ; p.Gly387Ala) dans l'exon 13 a été identifiée dans des familles d'origine belge <sup>12; 24</sup>.

Les mutations dans le gène RAB7 identifiées jusqu'à présent sont également des mutations faux-sens causant une substitution d'acide aminé. Une mutation faux-sens (c.385C>T ; p.Leu129Phe) dans l'exon 3 a été identifiée dans des familles d'origine autrichienne, belge et tchèque <sup>10</sup>. Une mutation faux-sens (c.471G>C ; p.Lys157Asn) dans l'exon 4 a été identifiée dans des familles d'origine anglaise <sup>10</sup>. Une autre mutation faux-sens (c.482A>C ; p.Asn161Thr) dans l'exon 4 a été identifiée <sup>10</sup>. Encore une autre mutation faux-sens (c.484G>A ; p.Val162Met) dans l'exon 4 a été identifiée dans des familles d'origine autrichienne, écossaise et en provenance des États-Unis <sup>10</sup>.

Les mutations dans le gène WNK1 identifiées jusqu'à présent sont des mutations non-sens causant un codon stop prématuré et des délétions et des insertions causant un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré. Quatre délétions (c.254delC ; p.Pro85HisfsX14, c.594delA ; p.Glu198fsX207, c.947delC ; p.Pro316fsX317 et c.1064\_1065delTC ; p.Ile355AsnfsX361) dans l'exon 1 causant une substitution d'acide aminé, un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré ont été identifiées <sup>3; 10; 17; 98</sup>. Deux mutations non-sens (c.217C>T ; p.Gln73X et c.550C>T ; p.Gln184X) dans l'exon 1 ont été identifiées <sup>10</sup>. Deux autres mutations non-sens (c.868C>T ; p.Arg290X et c.943C>T ; p.Gln315X) ont été identifiées <sup>16; 17</sup>. Une insertion (c.918\_919insA ; p.Ser307fs) dans l'exon 1 causant un décalage du cadre de lecture a été identifiée chez un atteint porteur de la mutation non-sens (c.943C>T ; p.Gln315X) et dans des familles provenant de la Nouvelle-Écosse <sup>3; 16; 17</sup>. Une autre insertion (c.1089\_1090insT ; p.Gln364SerfsX16) dans l'exon 1 causant une substitution d'acide aminé, un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré a été identifiée <sup>10</sup>. La délétion (c.254delC ; p.Pro85HisfsX14) et l'insertion (c.1089\_1090insT ; p.Gln364SerfsX16) ont été identifiées chez un atteint hétérozygote <sup>99</sup>. Une autre insertion (c.1134\_1135insT ; p.Asp379fsX379) causant un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré a été identifiée <sup>100</sup>. La mutation non-sens (c.217C>T ; p.Gln73X) et l'insertion (c.1134\_1135insT ; p.Asp379fsX379) ont été identifiées chez un atteint hétérozygote <sup>10</sup>.

Les mutations dans le gène *IKBKAP* identifiées jusqu'à présent sont presque exclusivement des mutations faux-sens causant une substitution d'acide aminé, mais il y a également une mutation, dite commune, dans le site donneur d'épissage (c.2204+6T>C ; M711fsX714) de l'intron 20 causant un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré qui a été identifiée dans des familles d'origine ashkénaze, européenne de l'Est et juive <sup>10</sup>. Une mutation faux-sens (c.2087G>C ; Arg696Pro) dans l'exon 19 a été identifiée dans des familles d'origine juive ashkénaze, dont les atteints étaient porteurs de la mutation commune <sup>10</sup>. Une mutation faux-sens (Pro914Leu) dans l'exon 26 a été identifiée chez un atteint porteur de la mutation commune <sup>3</sup>.

Les mutations dans le gène *TrkA* identifiées jusqu'à présent comprennent également des mutations faux-sens causant une substitution d'acide aminé, mais aussi des délétions et des insertions dans le site donneur d'épissage causant un décalage du cadre de lecture, un variant d'épissage aberrant et un codon stop prématuré. Une délétion dans le site donneur d'épissage (c.354\_359+3delTCGCCTGAA) de l'exon 3 causant deux variants d'épissage aberrants, l'un sautant les exons 2 et 3 et l'autre sautant l'exon 3, a été identifiée dans des familles d'origine turque <sup>10</sup>. Deux mutations dans le site donneur d'épissage (c.359+5G>T et IVS15+3A>C) ont été identifiées <sup>10</sup>. Une délétion (c.543delG ; p.Gly181GlyfsX16) et une insertion (c.1877-1878insA ; p.Gln626GlnfsX7) causant un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré ont été identifiées <sup>10</sup>. Une mutation faux-sens (c.1697G>A ; p.Arg565Gln) dans l'exon 14 causant un épissage alternatif aberrant a été identifiée <sup>10</sup>. Une autre mutation faux-sens (c.2281C>T ; p.Arg761Trp) a été identifiée <sup>10</sup>.

Une seule mutation dans le gène *NGFB* a été identifiée jusqu'à présent. C'est une mutation faux-sens (c.661C>T ; p.Arg221Trp) dans l'exon 3 causant une substitution d'acide aminé identifiée dans des familles d'origine pakistanaise <sup>9; 10; 24</sup>.

Nous avons identifié une grande famille canadienne-française originaire de Paspébiac dans la Baie-des-Chaleurs dans laquelle nous avons identifié quatre individus atteints de la NHRPA. La NHRPA correspond à une nouvelle forme de NHS, malgré son étiquetage nosographique antérieur de PCARP. La ville de Paspébiac est reconnue pour la présence de maladies héréditaires à effets fondateurs, telles que la CMT4C et un sous-type d'albinisme récessif indéterminé <sup>39</sup>. Ces éléments nous ont poussés à émettre l'hypothèse que la NHRPA soit une maladie récessive à effet fondateur pour la région de Paspébiac.

Plus d'une vingtaine de maladies héréditaires sont associées à la population canadienne-française<sup>26</sup>. Certaines maladies, telles que l'ataxie spastique récessive autosomale de Charlevoix-Saguenay (ASRACS), l'atrésie intestinale multiple héréditaire (AIMH) et la neuropathie héréditaire motrice et sensitive avec une agénésie du corps calleux (NHMS/ACC) se retrouvent presque exclusivement dans la population canadienne-française<sup>26; 27; 101</sup>. L'ASRACS affecte un individu sur 1519 dans la région de Charlevoix et un individu sur 1952 dans la région de Saguenay, où le taux de porteur est de un sur 22<sup>27; 101</sup>. Il existe deux mutations à effet fondateur canadien-français pour la NHMS/ACC<sup>27; 101</sup>. L'AIMH est plus fréquente dans la Beauce<sup>27</sup>.

D'autres maladies, telles que l'ataxie de Friedrich, la cystinose, la dysplasie ectodermale hidrotique de Clouston, la dystrophie musculaire oculo-pharyngée (DMOP), la maladie de Tay-Sachs, la NHSAll, la pseudo-carence en vitamine D-Richet, le syndrome hyperornithinémie-hyperammoniémie-homocitrullinurie (HHH) et la tyrosinémie, sont plus fréquentes dans la population canadienne-française que ailleurs dans le monde<sup>26</sup>. L'ataxie de Friedrich est plus fréquente au Nouveau-Brunswick et dans la région de Rimouski<sup>101</sup>. Il existe cinq mutations fondatrices pour la cystinose qui affecte un individu sur 6237 dans la région du S-L-S-J avec un taux de porteurs de un sur 39<sup>27</sup>. Il existe une mutation fondatrice pour la dysplasie ectodermale hidrotique de Clouston qui est plus fréquente dans la région du Sud-ouest du Québec<sup>27</sup>. La DMOP est plus fréquente dans la région de Montmagny-L'Islet et affecte un individu sur mille au Québec<sup>25; 27</sup>. Il existe une mutation fondatrice pour la maladie de Tay-Sachs qui est plus fréquente dans la région du Bas Saint-Laurent, avec un taux de porteurs de 7,6 %, dans la région de la Gaspésie et dans la région du S-L-S-J<sup>25; 27</sup>. Il existe deux mutations fondatrices pour la NHSAll qui est plus fréquente dans la région de Lanaudière<sup>25; 27; 101</sup>. La pseudo-carence en vitamine D-Richet affecte un individu sur 2946 dans la région de Charlevoix-S-L-S-J avec un taux de porteurs est de un sur 27<sup>27</sup>. Le syndrome HHH est plus fréquent dans la région Sud du Québec<sup>27</sup>. La tyrosinaémie est plus fréquente dans la région du S-L-S-J et affecte un individu sur 1846 avec un taux de porteurs de un sur 22<sup>27</sup>.

Enfin, d'autres maladies, telles que l'ataxie oculomotrice avec apraxie (AOA), la neuropathie héréditaire motrice et sensitive liée au chromosome X de type I (NHMSX I) et le syndrome de Leigh, sont causées par des mutations fondatrices dans la population canadienne-française sans y être plus fréquentes que ailleurs dans le monde<sup>26</sup>. Il existe une mutation fondatrice pour l'AOA qui est plus fréquente dans la région de la Gaspésie avec un taux de porteurs de un sur 28<sup>101</sup>. Il existe une mutation fondatrice pour le

syndrome de Leigh qui est plus fréquent dans la région du S-L-S-J avec un taux d'individus affectés de un sur 2178 <sup>27</sup>. Il existe une mutation fondatrice pour la NHMSX I qui est plus fréquente dans la région de Portneuf <sup>101</sup>.

Nous avons tout d'abord complété un crible génomique avec des marqueurs STR. Nous avons ensuite performé une analyse de liaison en assumant le phénotype de la NHRPA comme se transmettant selon un mode récessif avec une pénétrance complète. Connaissant l'histoire de Paspébiac et la relative homogénéité dans sa population, nous nous attendions à trouver une région homozygote partagée par les cas. Comme de fait, l'analyse de liaison a fait ressortir une région homozygote au chromosome candidat 1 au locus 1q32,2-q32,3 contenant une quarantaine de gènes. La grande taille de l'intervalle candidat se reflète dans le petit nombre de cas et rend difficile l'identification du gène causant la NHRPA. Le recrutement d'autres familles canadiennes-françaises présentant des cas identiques à ceux de la NHRPA pourrait grandement nous aider dans notre quête d'identification du gène causal en raffinant l'intervalle candidat.

Nous avons revu finement la littérature dans laquelle nous avons trouvé des publications relatant des cas provenant de deux familles américaine et espagnole présentant le même phénotype que celui des cas provenant de la famille canadienne-française et liés au même locus. Cette littérature confirme la validité de nos résultats. Plusieurs pionniers de la famille canadienne-française de même que les membres de la famille espagnole provenaient du pays basque. Cette ville de près de 3 400 habitants a connu tôt dans son histoire des vagues d'immigration de pêcheurs espagnols basques <sup>40</sup>. Les trois familles canadienne-française, espagnole et américaine sont les seules familles à avoir été caractérisées pour la rare maladie qu'elles transportent. Nous croyons donc que les cas canadiens-français et espagnols possèdent des ancêtres communs et sont homozygotes pour la même mutation.

Nous avons défini un dernier intervalle candidat avec des marqueurs SNP en comparant les haplotypes des cas canadiens-français et espagnols. La comparaison des haplotypes entre les cas canadiens-français et espagnols a permis de réduire le grand intervalle candidat en un petit intervalle candidat au locus 1q32,3 contenant seulement quatre gènes, c'est-à-dire ATF3, FAM71A, BATF3 et NSL1. L'ADN codant a été séquencé à partir de l'ADNg et de l'ADNc, afin de vérifier la possibilité qu'une mutation intronale cause un épissage alternatif, mais aucune mutation n'a été identifiée. Nous croyons avoir obtenu une bonne densité lors de la comparaison des haplotypes entre les cas canadiens-

français et espagnols et que la plus grande région homozygote partagée entre les cas au locus 1q32,3 représente le bon intervalle candidat. Néanmoins, il reste une possibilité qu'une future densité plus grande révèle un intervalle candidat mieux défini. La comparaison des haplotypes entre les cas canadiens-français et américains pourrait confirmer cet intervalle candidat dans la mesure où ces deux familles auraient des ancêtres communs.

Habituellement, les régions codantes seulement sont criblées afin d'identifier le gène responsable d'une maladie <sup>102</sup>. L'ADN qui encode pour des protéines ne représente que 2 % de l'ADN génomique <sup>102</sup>. Lorsqu'aucune mutation codante n'a été identifiée, les régions régulatrices sont ensuite criblées <sup>102</sup>. Pourtant, les humains sont plus polymorphiques dans les régions régulatrices que dans les régions codantes <sup>102</sup>. Il arrive souvent que des mutations ne sont pas identifiées dans des gènes candidats pour lesquels il existe une grande évidence d'association avec la maladie <sup>102</sup>. De nombreuses maladies sont associées à des SNP se trouvant dans des régions non codantes <sup>102</sup>. Selon les statistiques datant d'avril 2009 et compilées par la base de données des mutations génétiques humaines, 1459 mutations régulatrices causant des maladies héréditaires humaines ont été identifiées dans plus de 700 gènes <sup>102</sup>. De plus, entre 1 % et 2 % des mutations ponctuelles causant des maladies se retrouvent dans des régions non codantes <sup>102</sup>. La majorité de ces mutations régulatrices se retrouvent dans les éléments proximaux et distaux du promoteur, et ce dans une distance de 1 kb à partir du site de début de la transcription <sup>102</sup>. Généralement, les mutations régulatrices perturbent un élément du mécanisme de la transcription <sup>102</sup>. Ces SNP contrôleraient l'expression de gènes cibles ou seraient liés à d'autres variants possédant une activité régulatrice <sup>102</sup>. Les mutations régulatrices sont responsables d'un vaste ensemble de phénotypes neurologiques <sup>102</sup>. De nouvelles technologies permettent de cribler le génome entier, telles que le séquençage du génome et le séquençage des exons. Le séquençage du génome sera relativement bientôt plus accessible <sup>103</sup>. Le séquençage des exons a permis d'identifier les gènes causant des maladies héréditaires par l'utilisation d'un petit nombre d'individus affectés <sup>104</sup>. Afin d'identifier le gène causant la NHRPA, il faudrait compléter le criblage des gènes candidats. L'identification du gène causal permettra un meilleur conseil génétique, une compréhension accrue de la maladie ainsi que le possible développement de traitements.



## Références

1. Herrmann, D.N. (2008). Experimental therapeutics in hereditary neuropathies: the past, the present, and the future. *Neurotherapeutics* 5, 507-515.
2. Scherer, S.S. (2006). Finding the causes of inherited neuropathies. *Arch Neurol* 63, 812-816.
3. Klein, C.J. (2007). The inherited neuropathies. *Neurol Clin* 25, 173-207.
4. Reilly, M.M. (2007). Sorting out the inherited neuropathies. *Pract Neurol* 7, 93-105.
5. Verpoorten, N., De Jonghe, P., and Timmerman, V. (2006). Disease mechanisms in hereditary sensory and autonomic neuropathies. *Neurobiol Dis* 21, 247-255.
6. Berciano, J., and Combarros, O. (2003). Hereditary neuropathies. *Curr Opin Neurol* 16, 613-622.
7. Houlden, H., Blake, J., and Reilly, M.M. (2004). Hereditary sensory neuropathies. *Curr Opin Neurol* 17, 569-577.
8. Auer-Grumbach, M., De Jonghe, P., Verhoeven, K., Timmerman, V., Wagner, K., Hartung, H.P., and Nicholson, G.A. (2003). Autosomal dominant inherited neuropathies with prominent sensory loss and mutilations: a review. *Arch Neurol* 60, 329-334.
9. Parman, Y. (2007). Hereditary neuropathies. *Curr Opin Neurol* 20, 542-547.
10. Rotthier, A., Baets, J., De Vriendt, E., Jacobs, A., Auer-Grumbach, M., Levy, N., Bonello-Palot, N., Kilic, S.S., Weis, J., Nascimento, A., et al. (2009). Genes for hereditary sensory and autonomic neuropathies: a genotype-phenotype correlation. *Brain* 132, 2699-2711.
11. Auer-Grumbach, M. (2008). Hereditary sensory neuropathy type I. *Orphanet J Rare Dis* 3, 7.
12. Auer-Grumbach, M., Mauko, B., Auer-Grumbach, P., and Pieber, T.R. (2006). Molecular genetics of hereditary sensory neuropathies. *Neuromolecular Med* 8, 147-158.
13. Axelrod, F.B., and Gold-von Simson, G. (2007). Hereditary sensory and autonomic neuropathies: types II, III, and IV. *Orphanet J Rare Dis* 2, 39.
14. Freeman, R. (2007). Autonomic peripheral neuropathy. *Neurol Clin* 25, 277-301.
15. Dupre, N., Chrestian, N., Thiffault, I., Brais, B., Rouleau, G.A., and Bouchard, J.P. (2008). [Hereditary ataxias, spastic parapareses and neuropathies in Eastern Canada]. *Rev Neurol (Paris)* 164, 12-21.
16. Roddier, K., Thomas, T., Marleau, G., Gagnon, A.M., Dicaire, M.J., St-Denis, A., Gosselin, I., Sarrazin, A.M., Larbrisseau, A., Lambert, M., et al. (2005). Two

mutations in the HSN2 gene explain the high prevalence of HSN2 in French Canadians. *Neurology* 64, 1762-1767.

17. Lafreniere, R.G., MacDonald, M.L., Dube, M.P., MacFarlane, J., O'Driscoll, M., Brais, B., Meilleur, S., Brinkman, R.R., Dadvivas, O., Pape, T., 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, 1064-1073.
18. Axelrod, F.B. (2005). Familial dysautonomia: a review of the current pharmacological treatments. *Expert Opin Pharmacother* 6, 561-567.
19. Saxena, S., Bucci, C., Weis, J., and Kruttgen, A. (2005). The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. *J Neurosci* 25, 10930-10940.
20. Rahl, P.B., Chen, C.Z., and Collins, R.N. (2005). Elp1p, the yeast homolog of the FD disease syndrome protein, negatively regulates exocytosis independently of transcriptional elongation. *Mol Cell* 17, 841-853.
21. Brennwald, P. (2005). A new function for the Elongator complex: polarization of Rab activity? *Dev Cell* 8, 454-456.
22. McCampbell, A., Truong, D., Broom, D.C., Allchorne, A., Gable, K., Cutler, R.G., Mattson, M.P., Woolf, C.J., Frosch, M.P., Harmon, J.M., et al. (2005). Mutant SPTLC1 dominantly inhibits serine palmitoyltransferase activity in vivo and confers an age-dependent neuropathy. *Hum Mol Genet* 14, 3507-3521.
23. Shekarabi, M., Girard, N., Riviere, J.B., Dion, P., Houle, M., Toulouse, A., Lafreniere, R.G., Vercauteren, F., Hince, P., Laganriere, J., et al. (2008). Mutations in the nervous system--specific HSN2 exon of WNK1 cause hereditary sensory neuropathy type II. *J Clin Invest* 118, 2496-2505.
24. Verhoeven, K., Timmerman, V., Mauko, B., Pieber, T.R., De Jonghe, P., and Auer-Grumbach, M. (2006). Recent advances in hereditary sensory and autonomic neuropathies. *Curr Opin Neurol* 19, 474-480.
25. Moreau, C., Vezina, H., and Labuda, D. (2007). [Founder effects and genetic variability in Quebec]. *Med Sci (Paris)* 23, 1008-1013.
26. Laberge, A.M. (2007). [Prevalence and distribution of genetic diseases in Quebec: impact of the past on the present]. *Med Sci (Paris)* 23, 997-1001.
27. Laberge, A.M., Michaud, J., Richter, A., Lemyre, E., Lambert, M., Brais, B., and Mitchell, G.A. (2005). Population history and its impact on medical genetics in Quebec. *Clin Genet* 68, 287-301.
28. Gagnon, A., and Heyer, E. (2001). Fragmentation of the Quebec population genetic pool (Canada): evidence from the genetic contribution of founders per region in the 17th and 18th centuries. *Am J Phys Anthropol* 114, 30-41.
29. Sheffield, V.C., Nishimura, D.Y., and Stone, E.M. (1995). Novel approaches to linkage mapping. *Curr Opin Genet Dev* 5, 335-341.

30. Altshuler, D., Daly, M.J., and Lander, E.S. (2008). Genetic mapping in human disease. *Science* 322, 881-888.
31. Schork, N.J., Thiel, B., and St Jean, P. (1998). Linkage analysis, kinship, and the short-term evolution of chromosomes. *J Exp Zool* 282, 133-149.
32. Elahi, E., Kumm, J., and Ronaghi, M. (2004). Global genetic analysis. *J Biochem Mol Biol* 37, 11-27.
33. Kim, S., and Misra, A. (2007). SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng* 9, 289-320.
34. Slate, J., Gratten, J., Beraldi, D., Stapley, J., Hale, M., and Pemberton, J.M. (2009). Gene mapping in the wild with SNPs: guidelines and future directions. *Genetica* 136, 97-107.
35. Chakraborty, R., Stivers, D.N., Su, B., Zhong, Y., and Budowle, B. (1999). The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis* 20, 1682-1696.
36. Stein, C.M., and Elston, R.C. (2009). Finding genes underlying human disease. *Clin Genet* 75, 101-106.
37. Sham, P.C., Cherny, S.S., and Purcell, S. (2009). Application of genome-wide SNP data for uncovering pairwise relationships and quantitative trait loci. *Genetica* 136, 237-243.
38. Gibbs, J.R., and Singleton, A. (2006). Application of genome-wide single nucleotide polymorphism typing: simple association and beyond. *PLoS Genet* 2, e150.
39. Gosselin, I., Thiffault, I., Tetreault, M., Chau, V., Dicaire, M.J., Loisel, L., Emond, M., Senderek, J., Mathieu, J., Dupre, N., et al. (2008). Founder SH3TC2 mutations are responsible for a CMT4C French-Canadians cluster. *Neuromuscul Disord* 18, 483-492.
40. Desmartis, A. (2002). Les immigrations basques aux Amériques. *Le naturaliste canadien* 126, 100-104.
41. Daiger, S.P., Bowne, S.J., and Sullivan, L.S. (2007). Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 125, 151-158.
42. Hartong, D.T., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (2006). Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368, 1795-1809.
43. Goodwin, P. (2008). Hereditary retinal disease. *Curr Opin Ophthalmol* 19, 255-262.
44. Hamel, C. (2006). Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis* 1, 40.
45. Kruglyak, L., Daly, M.J., Reeve-Daly, M.P., and Lander, E.S. (1996). Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 58, 1347-1363.

46. Quintero-Rivera, F., Chan, A., Donovan, D.J., Gusella, J.F., and Ligon, A.H. (2007). Disruption of a synaptotagmin (SYT14) associated with neurodevelopmental abnormalities. *Am J Med Genet A* 143, 558-563.
47. Fukuda, M. (2003). Molecular cloning, expression, and characterization of a novel class of synaptotagmin (Syt XIV) conserved from *Drosophila* to humans. *J Biochem* 133, 641-649.
48. Bennetts, J.S., Fowles, L.F., Berkman, J.L., van Bueren, K.L., Richman, J.M., Simpson, F., and Wicking, C. (2006). Evolutionary conservation and murine embryonic expression of the gene encoding the SERTA domain-containing protein CDCA4 (HEPP). *Gene* 374, 153-165.
49. Katoh, Y., and Katoh, M. (2005). Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 4, 1050-1054.
50. Buglino, J.A., and Resh, M.D. (2008). Hhat is a palmitoylacyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *J Biol Chem* 283, 22076-22088.
51. Jow, G.M., and Jeng, C.J. (2008). Differential localization of rat Eag1 and Eag2 potassium channels in the retina. *Neurosci Lett* 431, 12-16.
52. Jeng, C.J., Chang, C.C., and Tang, C.Y. (2005). Differential localization of rat Eag1 and Eag2 K<sup>+</sup> channels in hippocampal neurons. *Neuroreport* 16, 229-233.
53. Lavorgna, G., Lestingi, M., Ziviello, C., Testa, F., Simonelli, F., Manitto, M.P., Brancato, R., Ferrari, M., Rinaldi, E., Ciccodicola, A., et al. (2003). Identification and characterization of C1orf36, a transcript highly expressed in photoreceptor cells, and mutation analysis in retinitis pigmentosa. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 414-421.
54. Friedman, J.S., Chang, B., Kannabiran, C., Chakarova, C., Singh, H.P., Jalali, S., Hawes, N.L., Branham, K., Othman, M., Filippova, E., et al. (2006). Premature truncation of a novel protein, RD3, exhibiting subnuclear localization is associated with retinal degeneration. *Am J Hum Genet* 79, 1059-1070.
55. Nakagawa, H., Tategu, M., Yamauchi, R., Sasaki, K., Sekimachi, S., and Yoshida, K. (2008). Transcriptional regulation of an evolutionary conserved intergenic region of CDT2-INTS7. *PLoS One* 3, e1484.
56. Rutkowski, R.J., and Warren, W.D. (2009). Phenotypic analysis of deflated/Ints7 function in *Drosophila* development. *Dev Dyn* 238, 1131-1139.
57. Martens, E., Stevens, I., Janssens, V., Vermeesch, J., Gotz, J., Goris, J., and Van Hoof, C. (2004). Genomic organisation, chromosomal localisation tissue distribution and developmental regulation of the PR61/B' regulatory subunits of protein phosphatase 2A in mice. *J Mol Biol* 336, 971-986.
58. Kimura, I., Yoshioka, M., Konishi, M., Miyake, A., and Itoh, N. (2005). Neudesin, a novel secreted protein with a unique primary structure and neurotrophic activity. *J Neurosci Res* 79, 287-294.

59. Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097-1100.
60. Schraml, B.U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W.L., Smith, W.A., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemerski, S., et al. (2009). The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* 460, 405-409.
61. Euskirchen, G.M. (2002). Nnf1p, Dsn1p, Mtw1p, and Nsl1p: a new group of proteins important for chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 1, 229-240.
62. Pinsky, B.A., Tatsutani, S.Y., Collins, K.A., and Biggins, S. (2003). An Mtw1 complex promotes kinetochore biorientation that is monitored by the Ipl1/Aurora protein kinase. *Dev Cell* 5, 735-745.
63. Scharfenberger, M., Ortiz, J., Grau, N., Janke, C., Schiebel, E., and Lechner, J. (2003). Nsl1p is essential for the establishment of bipolarity and the localization of the Dam-Duo complex. *EMBO J* 22, 6584-6597.
64. Kline, S.L., Cheeseman, I.M., Hori, T., Fukagawa, T., and Desai, A. (2006). The human Mis12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation. *J Cell Biol* 173, 9-17.
65. Thompson, M.R., Xu, D., and Williams, B.R. (2009). ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. *J Mol Med* 87, 1053-1060.
66. Nilsson, M., Toftgard, R., and Bohm, S. (1995). Activated Ha-Ras but not TPA induces transcription through binding sites for activating transcription factor 3/Jun and a novel nuclear factor. *J Biol Chem* 270, 12210-12218.
67. Liang, G., Wolfgang, C.D., Chen, B.P., Chen, T.H., and Hai, T. (1996). ATF3 gene. Genomic organization, promoter, and regulation. *J Biol Chem* 271, 1695-1701.
68. Kaszubska, W., Hooft van Huijsduijnen, R., Ghersa, P., DeRaemy-Schenk, A.M., Chen, B.P., Hai, T., DeLamarter, J.F., and Whelan, J. (1993). Cyclic AMP-independent ATF family members interact with NF-kappa B and function in the activation of the E-selectin promoter in response to cytokines. *Mol Cell Biol* 13, 7180-7190.
69. Hashimoto, Y., Zhang, C., Kawauchi, J., Imoto, I., Adachi, M.T., Inazawa, J., Amagasa, T., Hai, T., and Kitajima, S. (2002). An alternatively spliced isoform of transcriptional repressor ATF3 and its induction by stress stimuli. *Nucleic Acids Res* 30, 2398-2406.
70. Hai, T., Wolfgang, C.D., Marsee, D.K., Allen, A.E., and Sivaprasad, U. (1999). ATF3 and stress responses. *Gene Expr* 7, 321-335.
71. Tsujino, H., Kondo, E., Fukuoka, T., Dai, Y., Tokunaga, A., Miki, K., Yonenobu, K., Ochi, T., and Noguchi, K. (2000). Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol Cell Neurosci* 15, 170-182.

72. Chen, B.P., Liang, G., Whelan, J., and Hai, T. (1994). ATF3 and ATF3 delta Zip. Transcriptional repression versus activation by alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* 269, 15819-15826.
73. Miyazaki, K., Inoue, S., Yamada, K., Watanabe, M., Liu, Q., Watanabe, T., Adachi, M.T., Tanaka, Y., and Kitajima, S. (2009). Differential usage of alternate promoters of the human stress response gene ATF3 in stress response and cancer cells. *Nucleic Acids Res* 37, 1438-1451.
74. Mayumi-Matsuda, K., Kojima, S., Nakayama, T., Suzuki, H., and Sakata, T. (1999). Scanning gene expression during neuronal cell death evoked by nerve growth factor depletion. *Biochim Biophys Acta* 1489, 293-302.
75. Chen, B.P., Wolfgang, C.D., and Hai, T. (1996). Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Mol Cell Biol* 16, 1157-1168.
76. Wolfgang, C.D., Chen, B.P., Martindale, J.L., Holbrook, N.J., and Hai, T. (1997). gadd153/Chop10, a potential target gene of the transcriptional repressor ATF3. *Mol Cell Biol* 17, 6700-6707.
77. Wolfgang, C.D., Liang, G., Okamoto, Y., Allen, A.E., and Hai, T. (2000). Transcriptional autorepression of the stress-inducible gene ATF3. *J Biol Chem* 275, 16865-16870.
78. Bottone, F.G., Jr., Moon, Y., Alston-Mills, B., and Eling, T.E. (2005). Transcriptional regulation of activating transcription factor 3 involves the early growth response-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 668-677.
79. Yin, X., Dewille, J.W., and Hai, T. (2008). A potential dichotomous role of ATF3, an adaptive-response gene, in cancer development. *Oncogene* 27, 2118-2127.
80. Lu, D., Chen, J., and Hai, T. (2007). The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases. *Biochem J* 401, 559-567.
81. Nilsson, M., Ford, J., Bohm, S., and Toftgard, R. (1997). Characterization of a nuclear factor that binds juxtaposed with ATF3/Jun on a composite response element specifically mediating induced transcription in response to an epidermal growth factor/Ras/Raf signaling pathway. *Cell Growth Differ* 8, 913-920.
82. Lu, D., Wolfgang, C.D., and Hai, T. (2006). Activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, suppresses Ras-stimulated tumorigenesis. *J Biol Chem* 281, 10473-10481.
83. Seiffers, R., Mills, C.D., and Woolf, C.J. (2007). ATF3 increases the intrinsic growth state of DRG neurons to enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci* 27, 7911-7920.
84. Pearson, A.G., Gray, C.W., Pearson, J.F., Greenwood, J.M., During, M.J., and Dragunow, M. (2003). ATF3 enhances c-Jun-mediated neurite sprouting. *Brain Res Mol Brain Res* 120, 38-45.
85. Hua, B., Tamamori-Adachi, M., Luo, Y., Tamura, K., Morioka, M., Fukuda, M., Tanaka, Y., and Kitajima, S. (2006). A splice variant of stress response gene ATF3

counteracts NF-kappaB-dependent anti-apoptosis through inhibiting recruitment of CREB-binding protein/p300 coactivator. *J Biol Chem* 281, 1620-1629.

86. Tamura, K., Hua, B., Adachi, S., Guney, I., Kawauchi, J., Morioka, M., Tamamori-Adachi, M., Tanaka, Y., Nakabeppu, Y., Sunamori, M., et al. (2005). Stress response gene ATF3 is a target of c-myc in serum-induced cell proliferation. *EMBO J* 24, 2590-2601.
87. Yan, C., and Boyd, D.D. (2006). ATF3 regulates the stability of p53: a link to cancer. *Cell Cycle* 5, 926-929.
88. Bakin, A.V., Stourman, N.V., Sekhar, K.R., Rinehart, C., Yan, X., Meredith, M.J., Arteaga, C.L., and Freeman, M.L. (2005). Smad3-ATF3 signaling mediates TGF-beta suppression of genes encoding Phase II detoxifying proteins. *Free Radic Biol Med* 38, 375-387.
89. Kang, Y., Chen, C.R., and Massague, J. (2003). A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 11, 915-926.
90. Dijkmans, T.F., van Hooijdonk, L.W., Schouten, T.G., Kamphorst, J.T., Fitzsimons, C.P., and Vreugdenhil, E. (2009). Identification of new Nerve Growth Factor-responsive immediate-early genes. *Brain Res* 1249, 19-33.
91. Hyatt Sachs, H., Schreiber, R.C., Shoemaker, S.E., Sabe, A., Reed, E., and Zigmond, R.E. (2007). Activating transcription factor 3 induction in sympathetic neurons after axotomy: response to decreased neurotrophin availability. *Neuroscience* 150, 887-897.
92. Vlug, A.S., Teuling, E., Haasdijk, E.D., French, P., Hoogenraad, C.C., and Jaarsma, D. (2005). ATF3 expression precedes death of spinal motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis-SOD1 transgenic mice and correlates with c-Jun phosphorylation, CHOP expression, somato-dendritic ubiquitination and Golgi fragmentation. *Eur J Neurosci* 22, 1881-1894.
93. Polo, J.M., Calleja, J., Combarros, O., and Berciano, J. (1991). Hereditary ataxias and paraplegias in Cantabria, Spain. An epidemiological and clinical study. *Brain* 114 ( Pt 2), 855-866.
94. Higgins, J.J., Morton, D.H., Patronas, N., and Nee, L.E. (1997). An autosomal recessive disorder with posterior column ataxia and retinitis pigmentosa. *Neurology* 49, 1717-1720.
95. Berciano, J., and Polo, J.M. (1998). Autosomal recessive posterior column ataxia and retinitis pigmentosa. *Neurology* 51, 1772-1773.
96. Higgins, J.J., Morton, D.H., and Loveless, J.M. (1999). Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa (AXPC1) maps to chromosome 1q31-q32. *Neurology* 52, 146-150.
97. Higgins, J.J., Kluetzman, K., Berciano, J., Combarros, O., and Loveless, J.M. (2000). Posterior column ataxia and retinitis pigmentosa: a distinct clinical and genetic disorder. *Mov Disord* 15, 575-578.

98. Riviere, J.B., Verlaan, D.J., Shekarabi, M., Lafreniere, R.G., Benard, M., Der Kaloustian, V.M., Shbaklo, Z., and Rouleau, G.A. (2004). A mutation in the HSN2 gene causes sensory neuropathy type II in a Lebanese family. *Ann Neurol* 56, 572-575.
99. Coen, K., Pareyson, D., Auer-Grumbach, M., Buyse, G., Goemans, N., Claeys, K.G., Verpoorten, N., Laura, M., Scaiola, V., Salmhofer, W., et al. (2006). Novel mutations in the HSN2 gene causing hereditary sensory and autonomic neuropathy type II. *Neurology* 66, 748-751.
100. Takagi, M., Ozawa, T., Hara, K., Naruse, S., Ishihara, T., Shimbo, J., Igarashi, S., Tanaka, K., Onodera, O., and Nishizawa, M. (2006). New HSN2 mutation in Japanese patient with hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2. *Neurology* 66, 1251-1252.
101. Dupre, N., Bouchard, J.P., Brais, B., and Rouleau, G.A. (2006). Hereditary ataxia, spastic paraparesis and neuropathy in the French-Canadian population. *Can J Neurol Sci* 33, 149-157.
102. Epstein, D.J. (2009). Cis-regulatory mutations in human disease. *Brief Funct Genomic Proteomic* 8, 310-316.
103. Ng, P.C., and Kirkness, E.F. (2010). Whole genome sequencing. *Methods Mol Biol* 628, 215-226.
104. Biesecker, L.G. (2010). Exome sequencing makes medical genomics a reality. *Nat Genet* 42, 13-14.



**Annexe I. Amorces utilisées pour amplifier les exons des gènes candidats.** Les gènes sont présentés selon leur ordre génétique dans l'intervalle candidat.

<b>Fragment</b>	<b>Amorce forward</b>	<b>Amorce reverse</b>
SYT14_exon1	GACACCGTTTGCTCCAAGTA	AAAAGAAAGGGCAGCCTGA
SYT14_exon2	CTTCCTAAGACCTAATTTCTGGG	AAATACAAATTATCCGCCATCC
SYT14_exon3	TTTCTGTGAAATGCCTTTATCC	GGCAGACAAACAGATCAATGG
SYT14_exon4	TTGAATGAATGCTGCTGAATG	GACAATTCACCTTTATGTAACAGC
SYT14_exon5	CAGTAGGGCCAGGTGAGG	TTCCTAGAATTTTCAGGCACAAG
SYT14_exon6	TTTGTGCCTCTGAACTAGGG	TTCTTCTTACCAAGAGGAGAAGC
SYT14_exon7	TTTGTGGCAGAATTGTTTTAC	CACAAATTATCTTCAAGGGCAAC
SYT14_exon8	ACCTAATCCAAATAAACATGGC	TGATAGGATTGAACTCCCTAATACTG
SYT14_exon9	TTGACCCTCTTTCACCCAAC	CATGGTGGACAGCTTCACTG
SYT14_exon10_1	TCAAAATGGAATTGGTCGAA	AAAATGACTGGCTCTTTTGCT
SYT14_exon10_2	TGGAAAGAACGTCTCATACTGAC	TGCTCTATTAGCTTCCTACATTGG
SYT14_exon10_3	GCTTTCGCCTGATCCAAAG	AATGAAAGTGCCTTGCCATTA
SYT14_exon10_4	TTTGCTCATAACAGCTTGAACG	TCCTGAAAAAGCTCATTGAT
SYT14_exon10_5	AAATGGCAGCTCTATGCATTC	TGTGTAATGGTGCATGTGTGT
SYT14_exon10_6	CCCTAGGGATTTATCTGGCATA	GCCAGTCGATTGCCATATTT
SYT14_exon10_7	TGCATGAAAGCTTAATAGCAAAA	TCTCAATTCTTTTACCTCTTTCTCCT
SERTAD4_exon1	ACCTCTCCTCGGAAATCCAC	TGCGAGTCCACTCGGTGA
SERTAD4_exon2	AAGATGCCAAGGCCGTC	AGACACCACCTCCTGTCCAC
SERTAD4_exon3	TCCTCTAGAAGGAAAGGAAACG	GGAAGTGGATCAAGCAACTG
SERTAD4_exon4_1	TGCCAAGAAAGAAGTATGCTATG	CCACCATCTCTGTTGGTGTG
SERTAD4_exon4_2	GCCAGGTGGATTTTATGATGATG	GCTAGTGACAGGCTCCTTGG
SERTAD4_exon4_3	CTGTATAGCAGGCATCAGCG	TGTCGAATCAAAGCTGAACAC
HHAT_exon1	CGGTTCCAGAAACGCAGG	CGGGAACCTGGGTAGGAAAC
HHAT_exon2	TCCGGGAGTGTGAACTAACTG	TGGATCATCTTCTTGAATCTTCC
HHAT_exon3	TCCAATTCTTTCAGTGCTTCAG	CCTGGATCGACTCCAAATAC
HHAT_exon4	GACTCACACTGGCCTTCTTTC	CCAAGTCTTCCGATTCTTAGC
HHAT_exon5	CCTTCAATATCACTTCCATGAGC	GAGCCCCATCACAGTTCTAC
HHAT_exon6	AGATGACGGTGGCCCTG	AACAAAACGACTCAAGAGTCAGAG
HHAT_exon7	CAAACCAAACCAACCCTCTG	GGGTTTGCTATAGGCACCTG
HHAT_exon8	ATAGCTCCTGGGGTGTGTTGG	AGGGAGAGGATAGTAGCCCG
HHAT_exon9	CCAGCAGCCACATCTTGA	AAACCATAGTGTAGCAATGTTTTC
HHAT_exon10	ACAGGATAGTCAAGCTGGGG	GGGCAGGGAATCTGATGG
HHAT_exon11	GCTGGTGACAGAGAAAGCTG	CCCAAATCCCATCCATCC
HHAT_exon12_1	CTCCAAAAGGGGACAGTTTG	TGCAGGATGTGATGAAGGAG
HHAT_exon12_2	TGAGCCCTTTGCATTCTTTC	TCTTTTGAGAGGAGTGAA TAATCAAG
HHAT_exon12_3	CTCAGTGATTCAGGTTTAGTGG	GCTGCTGCTATGCAGGTGTAC
HHAT_exon12_4	CTGCTTGGCAAAGAGATGG	CATTTTCATATTACAAGTGGGGAG
KCNH1_exon1	GTCCCAGCCTTGGTCCAC	GCGGCTCCTTAGCAGAGC
KCNH1_exon2	TCTATGTTTTGGAGGGAATCAG	ATTCCC GAATGCAGTAAACC
KCNH1_exon3	GTGTGTGTGTGTTCCACAG	AACAGCATTTAGCTGGTGGG
KCNH1_exon4	TCATTCCCAAGTCTTTGCTTC	GCCTTGACAACCTTAAATGC
KCNH1_exon5	TTGGAGGTGTCTGTTTCTGAC	TGTGCCATTGCCTCAGC
KCNH1_exon6	TGTGACCATTTGTCAATCACTG	TGTTCTGGACATCAGTCATGC
KCNH1_exon7	GGGTTGCATAAAATTGCATC	TGATCCTGCTGGCACTGTAG
KCNH1_exon8	GGCCTACTCTGAGCAAGCTG	AGGCAAGCCTCAACCCTC
KCNH1_exon9	AGAGTGCTGAAGGATGTGGG	ACTGAAGGTGGCAGTGGC
KCNH1_exon10	TCTGGGGAATAGAGGGAAGC	GCAAAGGGACTTTTCTGGTC
KCNH1_exon11_1	CAAGATAGGCAGAAGGGCTG	TTCAGTGTGGCCTCGCC

---

KCNH1_exon11_2	AAGATGCTTGCGGGAAGAG	AAGAGCACGTCTAAGCCACTG
CR621662_exon1_1	GCCAGGAGGCAGTGAATTAT	ACACATCGTTCCTCCACCAC
CR621662_exon1_2	CCTGACCAAGACCAACAGGA	TGCCTAATGGGAGAATAAGCA
CR621662_exon1_3	CACCCCAGACAGCTAGGC	CTGAGTGACACAGCGAGACC
RCOR3_exon1	ACCAATCCTCCGCCTTTG	ACTCCTAGCCCCGTCCACC
RCOR3_exon2	GCCTGGGCAGCTTACTTTG	CAACCCACTATCTTCCAAAAGG
RCOR3_exon3	ATGGGAGGTGCCTTTGG	GCACGCTGTTAGGACAGAAAC
RCOR3_exon4	GCCCCTGATTTAAAGTCCC	GGTTGCAGAAAACAGGATTG
RCOR3_exon5	TCAGTGAAATTGATATGGGATACTG	CCACTTGGCTCTTCTTGTGACG
RCOR3_exon6	GGGCAATAAGAGTGAAACGC	CAACAACCTTGGTTAACTGGGG
RCOR3_exon7	TGTGTACTTATTGCAGCAGATACTTC	TGCATAAGTGGATGGCTGAG
RCOR3_exon8	AAATAAAATTTAAGAGGGGTTTGG	CAAAGTATTAATGATGCATGTGACC
RCOR3_exon9	TTGTAGTAATCTCATGTCTGTGATTTG	GAGCCCTTTCTTGATCAATTTT
RCOR3_exon10	GAAAGGAATTTTCATTGCTGGTATC	GCTAGTCCTCTTGACAAATTAACC
RCOR3_exon11_1	TTTCCTGTGACAGCCCAAAC	GAGCCTTGACTATGAAGAGGC
RCOR3_exon11_2	TGTGGCAGTGGACTAGCATAAG	TGAAGTCCCCAGATGTAGGC
RCOR3_exon11_3	GTCCTAGCGCAGAGTCCTTG	TGATCTGTCTGTCCCTTTGC
RCOR3_exon11_4	GACATCAAGTCTTCTTAATTCAACC	GCCCATGTCTGGGATAGAAG
RCOR3_exon11_5	TGTGCATACTATACCTTTACAGCG	TGATCATAACTTACTCTTACCTCATCC
RD3_exon1_1	TTTCCAACACAATCAAACCAG	TGTCCAGATGGCATTCTGTC
RD3_exon1_2	TTTGCCAACAGCAGGTACAC	GCCCTAACTTCCAAAGGTGC
RD3_exon2	GTCCCAGCTCTCCTCTCTCC	ACTAGGTCATCCAGGCTCCC
RD3_exon3_1	AGCCCCTCGGGGTTAGAC	ACTAGCGCAGGAGAGGGAG
RD3_exon3_2	CCCATCCCAAGACGCTG	TGGACCTGTCCCTTCATAGC
RD3_exon3_3	CCTTTAACTGCAGCCAGCTC	CTTACACCCCCTTCAACCC
RD3_exon3_4	ACACTCTGGGGTTGAAGTGG	GAGGCAAAGGTTGTGGTGAG
RD3_reprise1	TGAGGCAGCTGAGTGAAATG	TCCAGATTCAAGTGAAAATCCA
INTS7_exon1	AGCTCCTTGAGCGCCTG	TCTTCTCCCAAAGCAACCAC
INTS7_exon2	GGCTTTGAATATTCTTAACTCTTACC	CCAGGTGGAAGTACTAAAAGGC
INTS7_exon3	AATATTATTAGTGTTGCTTTGGTTCC	GGGATAGTTATCACAGTTTTGCC
INTS7_exon4	ATCTGACTTTGCCTTGCCTC	AAACCTTCTTGGAACACACC
INTS7_exon5	CCTGACCTTGGAAATATTAGTTGC	CAGTTTGGGCAAATAGAAGATAC
INTS7_exon6	CAATTTTGCTAAATGAGTCACAGC	AAGACTTGTGGGCCACTTTC
INTS7_exon7	GGAGAAAGAGGCCCAAATG	TGCCACAAACATCAACAATG
INTS7_exon8	AAGCCAGAAAATGTAAATGGAG	CTAGCATGCAATGGAGTATGAG
INTS7_exon9	TTGAACCTATGAGCTGAACTGC	TAGATCAAGGCACACAGGC
INTS7_exon10	GGTTCATCCATTTAATAATTCCC	GGAGCTATGTCTGCTTAACTTTGC
INTS7_exon11	GCCTACAAGAAACCTCACCC	TGACATCAGCACACTCTTTGG
INTS7_exon12	TTTTCTCCCTTTGGGGTAG	TTCAGAACCCATGACTAAAAGG
INTS7_exon13	TCAGACTTATCCAAGGTTTGGG	CCATGACCTATTTTCATATCAGCAG
INTS7_exon14	ACTTGGTACTGCCCCATCTC	GATAATGTCTGAGTCAAACCACTG
INTS7_exon15	TGGAATGACAGTGAAAAGATGG	GGTAAGCATATCTGAGGTAGTCCG
INTS7_exon16	AAAAGGTAGAGCCCCAGACC	GGCAGGAGGTAATCTATGTTTTG
INTS7_exon17	TCCTAGCCTCAATTTTCTCACC	AGGAAACAGGCACAGAAAGG
INTS7_exon18	ATATGGGCATTTGTAGTTTTATACTG	CCAATAAACCAAAGGTAACACAC
INTS7_exon19	CTGTAACCAGTGATTAGCACAGAC	AAAACACTGGAAAACCTTCCATC
INTS7_exon20_1	TGGTCTAAATAAGCTCTTAGAACAGG	AACCACGCCCAGCTGTC
INTS7_exon20_2	ACCATGGAATGAATGCACTG	TGATCTCAACATGTGACTATTCTTG
DTL_exon1	AGCCAATCAGAGAGCGTGAC	GGAGGTGGCGTGTGTTTC
DTL_exon2	GGACAAATATTTACCTCTGAATTTG	ACTTTTCTTTGAAAGGGAAATACTC
DTL_exon3	GAAGAAAATTTTGGTGGTTTTG	GCCAGCAGAATCACACACC
DTL_exon4-5	CTACAGCTTTCCAGGCATTT	TTGACAGGGGAAAGGGTAGA
DTL_exon6	AAATGTTTGATCTCCAGTGACAG	CCCCTGGTGGTAATCAGATG

---

DTL_exon7	GCTCTGCTGGCTTCTAATTC	TTCACTTAATCAATAGCCTCCC
DTL_exon8	TTTTAGCACCTTGTTCCCTTG	TGAGACTATGTGACTGCCTCATC
DTL_exon9-10	TGCCAGAGGAGTTAGATTAAGTC	TGCCAAAGTCCTCATATGGC
DTL_exon11	TGCCAATGTCTAGTTCCTTG	TTCAGCTATATTAAGAGCCAAGAGC
DTL_exon12	TCCTAAAGCTCTCTAAGACACACTTC	ATAGATCCTGGATGG
DTL_exon13	CAAGGCCTTAAGACA	AAACATAACCAAGCAAGATCAAATC
DTL_exon14_1	TGGCAAATTGACCCT	GCCATCAAGCTCAGT
DTL_exon14_2	GCAGAGGCTTGCTCT	TTTGTATTTATGTGC
DTL_exon15_1	GCTGAAAGCAGGCTA	ACAGAACCAGGGGTC
DTL_exon15_2	GACATCCCAGTTCATGGAGG	TTTTAAACATTGCAGCCCC
DTL_exon15_3	GCCAACCCAACATCACTTTC	CCATGCAATTTAGTTGTTACAG
DTL_exon16	TTCTGACAACCTTTTTAATTCCTTTGA	TGAACAAGTAGAAGGGATTCTTGAC
DTL_reprise1	CAGTGGAGCTCACAAATACCTCA	CCATTGAAAATAGCCACTGGA
PPP2R5A_exon1_1	CTCGCCTGGGGTTCTCC	CCGAGCTTCTCCTCGCC
PPP2R5A_exon1_2	CGCCCAGAGTCAACAACCTTC	AGTCCCAACTGAGCAGGAGA
PPP2R5A_exon2	TGATGGGGTTATAGATGGGC	TATCATTGGAATGGATGGGG
PPP2R5A_exon3	TTCAGGAGCTTAGGTCTGAGG	AACATGGCGAATGTACTTTGTG
PPP2R5A_exon4	CACTAAGTTGGTAAGAAAAGGTGTG	CTCTCAGAGCTAACTTCACTTTTATTC
PPP2R5A_exon5	GCAAGAATAAAGTCAGTGTGGTAAG	TGGATGACAGAGTGAGACCC
PPP2R5A_exon6	TCTTCACCCTCCTGCCTG	ATAATTTCTCCAACCCCAGC
PPP2R5A_exon7	TGTAATCATGGATATGACAGCTTTTAG	TCAGTATTTCTCAATTTCTCTGCC
PPP2R5A_exon8	TTTCACAATTTCAATTCACAGTTG	AACTATAAAGGCTATAAAACGAAAGC
PPP2R5A_exon9-10	TACAATGCCCTTTCTGCAAC	TACAATGCCCTTTCTGCAAC
PPP2R5A_exon11	TCATTTTCAGGTATGATGTTTTTCAG	TGGAGTAACTTCCAATCTGTAATAGG
PPP2R5A_exon12	GCCAAGCTTTAACCCATTTTAG	AAGATACCTTCTGAACTGAATCAC
PPP2R5A_exon13_1	TCCAAGCTTTAGCAGAGGG	TGTGAAAAGCACATTATAAAAGGG
PPP2R5A_exon13_2	CCTTTGTCTAATCATTGGATTTATTG	CTGCCTTCAGCCTTTGAGAG
PPP2R5A_exon13_3	CCCCTTCTCTGCAATTCTC	ACCTTGGCACACAATCTTCC
C1ORF75_exon1	GGGTGAGAGCTGGTGTGAG	GAAGAGCCCTCTGCCCGC
C1ORF75_exon2	TGACAATTAAGTGACAAGCAGC	CTCCTCCTCTCCCACAGTTG
C1ORF75_exon3	GGTTGCTGGCCATCTCTG	GGCAGCTCAGGGAGTATCTG
C1ORF75_exon4	AGGTGTGAGATGATTTCCAGGG	AGGAACTTGGGGCCTTG
C1ORF75_exon5	GAGCTATGGGCTTTCCAGTC	AGCCTTGGGACATACACAGC
C1ORF75_exon6	GTGCCAGCAAAGAAACCAG	AAAGCTTCCCTCCACCTCAG
C1ORF75_exon7	CTCCTTTCGCTGGGCAC	TCAGGGCAGCATCATAATC
C1ORF75_exon8_1	CCAATAATTTGGGAAGGGC	AAGAGCATGTCAGAGGCTGG
C1ORF75_exon8_2	GCCAATGACTTTTGAATAGGG	CCTAACAAACCTTCCCTGG
C1ORF75_exon8_3	AAAAGGAACGAGTGTGACAATATG	AGCTTTTATGCCTGGCTTTG
NENF_exon1	CAATCCTAATTTCCAGGTTCCA	TCCGACTGTTGAGGACTCGT
NENF_exon2	AGTTGCACTGGAAGAGCTGG	CCTTTCCTCACACCTCCAAG
NENF_exon3	ACGTGCAAGCTCCTGGTTAC	GAAGGCTTGCTCTTGCCC
NENF_exon4	GCCAGTGCCAAACACTATCC	ATGGAAGAACAACACAGCCC
CR624623_exon1_1	GAGGCGAGAACCCTAGGGG	GGAGCTTCTTTCCAGGACC
CR624623_exon1_2	CAGATGAGAGCTGCGTTTTTC	CAGCTTCCACATGCACATC
ATF3_promalternatif	CCGAACCTTGCAATCACCAGT	CGGCGGACTGGTTACTTAGA
ATF3_exon1	CAGGATGATGGAAGGCTGTG	GAAGTGTCACTTTCCCACC
ATF3_exon2	GGTGTGGAGGTCTGGTGG	AGAACATGCCCAACACACAG
ATF3_exon3	GCTAGCATTGCCCTTGTCTG	GGGAACTATAACCAAGTAGGGG
ATF3_exon4_1	CCAGGTACACCCCTGCATC	CTGCCTGAATCCTAACGGTG
ATF3_exon4_2	TTTAGGCCTTAACACACTGGC	TGGAGAGTCCTAACCCCTTTGG
ATF3_exon4_3	AACACAAAATCCATGGGCAG	ATAATGGGGAGGGAAAGGC
ATF3_exonalternatif	GGCAACACGGAGTAAACGAC	CGAGCACCGAGGACTCAC
ATF3_3'UTRsupp	CAGAATCGACTAAGCCACCA	TCTGAGCCTTCAGTTCAGCA

---

FAM71A_exon1_1	AACAAAGGGGTATGTGACAGC	GGGCTGGTACGTGCAATG
FAM71A_exon1_2	GCACCGATATTTGAGAGCG	CTGTAGATGTTTTGGGGATGG
FAM71A_exon1_3	ACCTCTGCTGCTTATGCTGG	GACCTGCTGGAGGACTTTTG
FAM71A_exon1_4	AAGAAGGGAAAAGGACAGGG	TGCAGCACAGTTGACATCAC
BATF3_exon1	AAAAACACCCGACCCCAAAC	GCTCAGGAGCCATTCCAG
BATF3_exon2	CTGTTGTGAGCCCATTGGTA	AACACTGGGCTGGAAGGAC
BATF3_exon3	TCATGGGCAAGAGGTGAAC	GTGGCTGTGGGAGAGTGG
NSL1_exon1	GTTTCAGCTGCAGCGTCC	GCGTGGGATCTTTCTGAATC
NSL1_exon2	TTTCCTCTGTCACAAATCTGG	ACTCCCCTAGTAAACAACCTTCTTG
NSL1_exon3	CTTGCCATATTTGTTTTCTTC	AACAAAATGTCACTTATCTCCACG
NSL1_exon4	TTCCTCAAAGAATGGTACTGACTC	GGGAGAATATCCTTGATGCTG
NSL1_exon5	TTAAGCTGAGGTGAATCGTCC	GATTTATTTAAAGGACCGCTGAG
NSL1_exon6_1	GGGCAACAAAGCAAGACTTC	TTTTCTCAGACTTCTCCCAGTG
NSL1_exon6_2	AACATAATTTGACTTGGAECTAATGG	CTGCTATTGGTCATGCTTTTC
NSL1_exon6_3	GGCAGACAGCTGAGATTTG	GGCCAGGGAAAGAGGGTC
NSL1_exon6_4	AGGCACATGGGAGTTAAGGC	CATATACAGCCATGTGAGCACC
NSL1_exon6_5	ACTAAGCCATGGTGGTTCCC	CAACACAGCAAGACCTTGTTTC
NSL1_exon6_6	CACTGCCTAAGGCTGGAAAG	GCGATGGCGTGATCTTG
NSL1_exon6_7	GAGGCTGGGAATTGGAGAC	CAGGTGCAGTGGCTCATTC
NSL1_exon6_8	GTTTCAAACAGGCGTGTGC	CAAGTCTCAGGTATTTATGGACTG
NSL1_exon6_9	TCATGTAGCTCTGTGGCCC	GGCTCCTAGCCTCTCCC
NSL1_exon6_10	GCAATTTGCCGTCAGTTAGG	TGATCATGGCATGTAGTAAGCAC
NSL1_exon6_11	TCCACTTTATGCCTGGAATTG	GCCCCTAGAGCTAGTCCACC
NSL1_exon6_12	CAAAGGGTTGTGAAACAGCTC	CAAGTGGAGGAAGATAGTCCTAAG
NSL1_exonalt	CTCTTCCGGAGGCTGAGG	CGATCATATCACTGGCAAACA
NSL1_reprise1	ATTCAGTGGGAGGGCTGG	GACCAGCCACATAGCGAAAC
NSL1_reprise2	TACTGCAACCTCTGCC	TCGAGTGTGCTGTGTTTTGG
NSL1_reprise3	AAAATTACCTCCAAGGCATCC	CATCCTTTAGCCTCCCAGTG
TATDN3_exon1	TTTCGTCGGAECTGTGGG	AGCAAAGATAACACGAGGGG
TATDN3_exon2	TGCCACAACCTACATTGACATATACAG	TTTCAAGCTGTTTTGGCTTG
TATDN3_exon3	TGTATTGATGAAGCATGGCTG	AGCAAGACTCCATCTCTCAAAG
TATDN3_exon4	GGCCTTAAGTGATCCACCTG	TTTGTCTGAACCTCTAGGCTG
TATDN3_exon5	ATGTAAAGCACCAGGATGGC	TTTGGCTAAGTGGGGTGAAC
TATDN3_exon6-7	TTGCTTTTGTGCCTCACATT	CCTGCCCTTCAAGAAATCAG
TATDN3_exon8	ACACCGTACATTTATCCGCC	CACAAATTAAGGCCTGTTTTCC
TATDN3_exon9	TTTTAAGTTATTGCAGAATAAAATGC	GGCAGTATATGAGGATTCCACTG
TATDN3_exon10_1	AATCAACATTGCAGCCACAC	GGTGGTAAGAACACACTTTAGGC
TATDN3_exon10_2	CCACCACCTGAACTGAAACC	GCTCACATCTATGTTGCCAG
TATDN3_exon10_3	TTGAATACCAAGCCCAAAG	TTCAGTTTCTTAGTCTGGTTTGGAC
LOC149643_exon1	AAGGTCACCTGGCTGGTAAG	TTTGTGGCAACTTTATAGAACATAAC
LOC149643_exon2	GGTGGTGGTTGTGGTGTAT	ACCTGGGAGGCTGAGACAGA
LOC149643_exon3	AAAACAATACTCTGCCCTCCAG	AAAACCTCAAATCCTCTCTTCAAATC

---

**Annexe II. Amorces utilisées pour amplifier l'ADNc des gènes candidats.** Les gènes sont présentés selon leur ordre génétique dans l'intervalle candidat.

<b>Fragment</b>	<b>Amorce forward</b>	<b>Amorce reverse</b>
<b>SYT14_ADNc1</b>	CGCATCATGGCGATTGAA	TTTACCCAGCGCTTCATCTT
<b>SYT14_ADNc2</b>	TTGATGCTGCTCCTTTTTCTC	TGAGCATCTTGGACTGTTGC
<b>SYT14_ADNc3</b>	ATTGCAGCCACCACCATATC	GGATGCTGGTTTTTGTCTCTC
<b>SYT14_ADNc4</b>	AAGCTTCTGGTAACAGTGACAGC	CTCTGCCGATGGATGTCTTG
<b>SYT14_ADNc5</b>	AAACACTTGATAGGTGGACAGG	AAAGCATTGTTGGTAGAAGGTTGA
<b>INTS7_ADNc1</b>	GGTCCTGGGGTAGAGTTTGC	TGATGAGCATTCTTCCTCTCAG
<b>INTS7_ADNc2</b>	TGTGGATGAATTTGTGAAGAGAA	TCCTGGGATCATTCTTCAAAT
<b>INTS7_ADNc3</b>	CCTATCCGTCCACCAAATG	CATCTTGTTCAGTGCCAAA
<b>INTS7_ADNc4</b>	AGCCCAAGAGTGCTGTTACC	CCACAGACAATGCCTTCTGA
<b>INTS7_ADNc5</b>	ATGGGATGCTTGGTGACCT	GCAATGCAAGAAAGTGCTGA
<b>INTS7_ADNc6</b>	TGACTCAGGTTGCCTCAGAA	GCAAGGCTTCGAAATTCTTC
<b>INTS7_ADNc7</b>	CACAACAATTGCCATGACCT	TTTCAGCAAAGCAATGATGG
<b>INTS7_ADNc8</b>	CAGCCCATGCTGATAGTGAA	TCAACCCTTTGCTCCATCTC
<b>INTS7_ADNc9</b>	GAGTGGTTCAGCACGGATCT	TTCCATATGAAAAACCAAAGTGT
<b>PPP2R5A_ADNc1</b>	CTGAGATGTGGCCGTGAG	TGTACGGAAGATGTTAGCACTGA
<b>PPP2R5A_ADNc2</b>	GAGCAACACTGAATGAACTGGT	GCAATGCAAAGCCATTGATA
<b>PPP2R5A_ADNc3</b>	TGCACCGAATTTATGGGAAA	CCCTTTCTGCAACCTGAAAA
<b>PPP2R5A_ADNc4</b>	TCATTGAACCAACACAGTTCA	CAGAGGTGGGAGGCTTTTT
<b>C1ORF75_ADNc1</b>	GAGCCGGTAGGTCCAGGT	GAAGGGGTCCGTGTAGTTGA
<b>C1ORF75_ADNc2</b>	TATGATGCCCCAGGTATTGC	GCTGGCCTCTGGTCAATGTA
<b>C1ORF75_ADNc3</b>	GGCCTGTGAGAGTGCCTATT	GCCCCATTTCTTCAAGTGAG
<b>NENF_ADNc1</b>	ACTTGGCAGTGAAGGGAGTG	CCAGCCAGCTGATACTGACA
<b>NENF_ADNc2</b>	AGCGCTGGCCCTGGTCTC	ATGGGACCTTTATTTTTGTTTTGAT
<b>NENF_ADNc3</b>	AGGGGTAGCCAAGATGTCCT	TAGGAGGTGTCCCACCTTTGG
<b>ATF3_ADNc1</b>	CCAACCATGCCTTGAGGATA	GCTGCTTCTCGTTCTTGAGC
<b>ATF3_ADNc2</b>	GAAAAAGAGGGCGACGAGAAA	CTGGTCCAAGACCCACTCTG
<b>ATF3_ADNc3</b>	AAGAGGCGACGAGAAAGAAA	GTTCTCTGCTGCTGGGATTC
<b>ATF3_ADNc4</b>	TGGGAGGACTCCAGAAGATG	CTAACGGTGGGCATCCTG
<b>ATF3_ADNc5</b>	CAGCAGCAGAGAACCATCAA	GCACACACAATTTCTGGACA
<b>ATF3_ADNc6</b>	CAGGCAGCAGTGTCTGTACC	AGGACCTGCCATCATACTGC
<b>ATF3_ADNc7</b>	GGCAATGTACTCTTCCGATG	TGGTTTCCAACATCTCTCCA
<b>ATF3_ADNc8</b>	ATGATGGCAGGTCTCTGTT	TGAGAATTTACAGAAACATCAGAA
<b>ATF3_ADNc9</b>	GTGGTACCCAGGCTTTAGCA	CCATGTCTTGGTTCCAATATTTA
<b>FAM71A_ADNc1</b>	GAGAGGGTTCGTCACTTCCTG	CACTGGTGAGGCAGGTCTCT
<b>FAM71A_ADNc2</b>	ACAGCAATCATCCGTGCTC	TCTCCCCTTTTGGTGATCTG
<b>FAM71A_ADNc3</b>	TGTGCTGAAAGACAACCATGA	GTACAAACCTCAGGGGCAGA
<b>FAM71A_ADNc4</b>	ATTGATGTGCACAACCGTGT	GCTGGAATGCCACAGGTA
<b>FAM71A_ADNc5</b>	AACAGCTGCGCCTGAAGTT	AGATGTTTTGGGGATGGATG
<b>FAM71A_ADNc6</b>	CCGTGAACCTTCAAGGAAAG	GTTGCCTTTGTTTCTCCTG
<b>FAM71A_ADNc7</b>	CATCCATCCCCAAAACATCT	TGCATCCATGTCTGCTTCTG
<b>FAM71A_ADNc8</b>	CTCCAAACAGCACGAAGGTG	TTTTGGGCAATCTTGTCTCC
<b>FAM71A_ADNc9</b>	AGAGCAAGAGCAGCCTGAGT	TCCTCAGGAAAGAGCTGACC
<b>FAM71A_ADNc10</b>	AGGTCCTCATTGAGCCACAG	GGGCTTCAAAGGTCACTGTC
<b>FAM71A_ADNc11</b>	AGGAACGTCAGAGCCAACCT	TGATTCTTTATTTAAACGGCAGTA
<b>BATF3_ADNc1</b>	CAGACGTGGGACGGGAAG	AGCCTTCTGGGTCTGCTTCT
<b>BATF3_ADNc2</b>	GAGAGCGGGAAGCCTGAG	GAGGCACTGGCACAAAGTT
<b>BATF3_ADNc3</b>	ATGAGAGCCTGGAGCAAGAA	GCACAAGGGCTCTGTGAGTT
<b>BATF3_ADNc4</b>	ACACTCCTCTGCCAGCA	CAGGAAAAGGAAGTGTATTGTGC

---

<b>NSL1_ADNc1</b>	CCCACAGTTCCGACGAAAA	TGATTTTCATCAAACCTGATCTTCAA
<b>NSL1_ADNc2</b>	GCTCTGCCGGAGGAGATT	GTTTCCCCTCTGCATTTCAA
<b>NSL1_ADNc3</b>	CCCAGAAAGATCCTGGAATG	CAGAGGTTTTCTGGAAGCA
<b>NSL1_ADNc4</b>	TTGAAATGCAGAGGGGAAAC	ATCATATCCCCGCACAGAGA

---

**Annexe III. Amorces utilisées pour amplifier les introns des gènes candidats.** Les gènes sont présentés selon leur ordre génétique dans l'intervalle candidat.

<b>Fragment</b>	<b>Amorce forward</b>	<b>Amorce reverse</b>
NENF_intron1	CGAATTAAGACAGTTGGGGTCTTAT	CTTCGGGGCCTAGAGAGAG
NENF_intron2	GCTTTTCACCGAGGAGGAG	TAATATCAGCCCCCTGTTGG
NENF_intron3	CTGGGTTGGTTGGGACTG	CAGCACCCAAGTTTTCACT
NENF_intron4	ACCCAATAACGGTGGACTCA	AACAGGCATAGACCAGAACAATC
NENF_intron5	GTGCTGCGCTGTTGTTTG	AAATAGCCAGGTGTGGTGGT
NENF_intron6	GGCAGGAACACAGCTCACTA	CCCCTTCTGATAGCCTGCTC
NENF_intron7	GCTGGGCAAATTGGAAATAC	AATCCTCCTGCCTCGACCT
NENF_intron8	TCCTACTTGGCTGAGTGTGG	CCCACAGCAGAAACTCTTGG
NENF_intron9	TGGTATGTTCCCCATAACACC	GAATTACTGGGAGAATGGAGTTC
NENF_intron10	CTGGACAGCATCTCCTTGGT	CCAGCTTTGATGACAGAGCA
NENF_intron11	GGAGTGCAGTGGCTGATTTT	CACCCAGCAATCTCCTTTTT
NENF_intron12	TCCTCTTCGCACTTACACCTT	ACGGAGTCTAGCTCGGTTG
NENF_intron13	AGCTACCCTGGAGGCTGA	ATTACTCCAAACCGGCTCCT
NENF_intron14	TGGTAAAGGAAAGGCGGTAA	CAGAATTTCCCACCAAGAA
NENF_intron15	CTTGGGACTGTACCCATCGT	CTCCTGACTCAGCCTCCTG
NENF_intron16	GCCTAGGTGGGTGGATCA	CCGCACACAGAAATTTGGA
NENF_intron17	CACTACGACCTCTGCCTCCA	GTGGTGGTGGTGCCTGTAAT
NENF_intron18	ACTGCAACCTCTGCCTTCTG	GGTGCATCACTGCACTCTA
NENF_intron19	GGGAACATTTTTCTTGTGTTG	CCCCTACAACCTCTTTTGTG
NENF_intron20	AAGATTGTGCCACTGCACTC	CAGACAGCCATGGAAGGTTT
NENF_intron21	TTTACCCTTCGGTCCACTTG	GGAATTCAGCCTTACTGTTG
NENF_intron22	ATCCCAGCTACTTGGGAGGT	GGGAGAAAAGCCCAAGAAAG
NENF_intron23	AGGCCAGTGCCAAACACTAT	CTTATGTGGGCTCCAAGGAA
NENF_reprise1	GAGGTGGAAGAAAACCCACA	AGTAGCTGGGCATGGTGGT
NENF_reprise2	TCAGAACTCACCACCACAGC	CTCCCAACGTGAGGTGATCT
NENF_reprise3	AGGTTGCGATGAGCCAAG	GTAATCTGCCTGCCTTGACC
NENF_reprise4	AAATGATCTGCCCATCTTGG	ACAAGCATAAGCCACTGTGC
ATF3_intron1	TGCACAGCTCTCTTCTCTCG	CCTTCCCCATTTCCTCTCT
ATF3_intron2	CTGGGAGAGGGCGTAAGGT	ATCTGGTCCAACCACTGCAT
ATF3_intron3	TGGAGCCACTTGTGCAGATA	ACTGCAAACAATGGGGACA
ATF3_intron4	CCCTAATTTTCATTGCATAGGTCA	ATGCCAAGCTGCTGAACAC
ATF3_intron5	CGATAGCCCCTCCCTATCTC	TCCATCTTCTCCATTTTCAAGGA
ATF3_intron6	GCTGGCATCAGCAAATAGTG	TTGCATTTTGTCTTCTGCTTGA
ATF3_intron7	AAATTA AAAAGTGAAAATTCAATGTAGC	CCACTGCAGTAGAGTGTAGTTCC
ATF3_intron8	GCTTCTTTCATTGGGACTGC	GCCCTGGAAAACATTCTTTG
ATF3_intron9	AGATCTCCAGGGGGAGTTTG	GCAGCATCAGGATTTGGAA
ATF3_intron10	GCCTCCCCTCTATCACTTCA	CCTCTGTTATTCTATAGCTCGGTGA
ATF3_intron11	ATTGTCCCTTGGGAACCAAC	AACTGTAGCCAGGTGCGTTT
ATF3_intron12	CTGCTGTTTAGTGCCAGAGC	TTCATTTTCATGCCATCCTCA
ATF3_intron13	CTGCTGTTTAGTGCCAGAGC	CTGGGTGTTGAAGCATCATTT
ATF3_intron14	GGGTGTCCATCACAAAAGC	CCCTGTGATCCCAGTGTTTT
ATF3_intron15	GGAGGTTGAGGCTGCAAT	TTTGGAAAGACTGAGGCATGA
ATF3_intron16	TTTGAGCAGAGAAGCAACAA	GGACAGACCTCCTGCTCTTG
ATF3_intron17	AGTGGTTGGCTTTGGATCTG	ACTTGCCACCATGAGGAAAA
ATF3_intron18	AAGTCTGGGAGGTGGCTTCT	TTTCTCGTCGCCTCTTTTTTC
ATF3_intron19	GTGCCGAAACAAGAAGAAGG	GCATGAGTCAACAGCCCATA
ATF3_intron34	CCCCAAAGAGACCTATGCTG	GCCCTGCTATCTGAGTGACC
ATF3_intron35	CCTACCTACAAGGGGGAGGA	AAGAGGGCTCTAGGCAGAGG

---

<b>ATF3_intron36</b>	TGTCGACCTCTCCAGACTCA	AGGCTGAGGACAGACTCACAG
<b>ATF3_intron37</b>	TGGCTTTGTTGAGGTGTGAG	AGGGCTCATGCTGTCACTCT
<b>ATF3_intron38</b>	CATCTTCAGCACCAAGAGCA	TCCCAAGCATTATTGAACG
<b>ATF3_intron39</b>	CTCCAGGTGCAGAGAAGCTC	GCAGGATACTTGGGACGAAA
<b>ATF3_intron40</b>	CACATGCTTAGAAGCCCACA	TACCTTTTCCCTGGTGGTTG
<b>ATF3_intron41</b>	TGCTTTCCTCGGTAGCTTCT	TGGCATCATTTTGAGCATT
<b>ATF3_intron42</b>	CTGATTCCCCTCCCTGAAG	TCTTATTCCTTTCCCCAAC
<b>ATF3_intron43</b>	ACCTACCCACAAAGCAAGGA	GGCAAAGGGCAACATTTAAC
<b>ATF3_intron44</b>	TCGGTCCTGATCACTGACTCT	GAAACTAGCAGGGCTCACC
<b>ATF3_intron45</b>	TGAAATTCTGAGGCCCTGAT	CTCTCCAGAAAGGGAGAGCA
<b>ATF3_intron46</b>	GCCTGGTTTCTTGTGCATCT	AAAGAAAAGTGTGCGGAAGG
<b>ATF3_intron47</b>	GCTACGTTTGTGGGCAGATT	CATACTTTTGGAAACGTGAACA
<b>ATF3_intron48</b>	TCCTCATTTCTCCCTCAACCT	AGGAATTGCCACTCTTACCAA
<b>ATF3_intron49</b>	CGGATTGCATTCAGGTTCA	CCCCTTCAGCCTCTCAAAG
<b>ATF3_intron50</b>	CACACACCGGAGACTGTTGT	CTTCCAGGTGGATGTGTGTG
<b>ATF3_intron51</b>	TGGATGATAGAGAGACCCTGT	TCTTTGACCCTTCCACCCTA
<b>ATF3_intron52</b>	TGCAACTTTCTAGCTGGGATT	TCCTTGGGAGTGGGTATCCT
<b>ATF3_intron53</b>	GCCACCTGGACTTAGCATGT	TAAGGGTGGGACTGAACAGG
<b>ATF3_intron54</b>	GCTCTGACTGGTCACCCAAT	TGGTCAAATCACAGAAGTGA
<b>ATF3_intron55</b>	CCAGTGGAGTGGGAACAAAA	TGGGCACTTAGCAGATACCC
<b>ATF3_intron56</b>	CAAGGCAGAAGAGTGCTGTG	AACACATTAGTAAATGGGAGCTTCT
<b>ATF3_intron57</b>	GGCATGTCCAACACAGACAG	GCTGAGATGGAATCCAGGAA
<b>ATF3_intron58</b>	CCCGAGTGTTGTTTCCACTTA	GCACCGCAAGGTGACTGT
<b>ATF3_intron59</b>	TTGAGTTATGATTGTTCTGTGTTGA	TGCAGAAAAGTTAACCTCGT
<b>ATF3_intron60</b>	TGCATTCATCTGTTGATGGAC	CATTTTCGGGACAAAATGCTT
<b>ATF3_intron61</b>	TATCCAAAGCCTGAGGGAAA	ACTGCTGGTAGAGGGCTGAG
<b>ATF3_intron62</b>	CGAAAGTGAGGGAAGCTCAG	TATCTGCCTTCCAGGTGCTC
<b>ATF3_intron63</b>	TGGAAGTGTGCAAAGAGCTG	ACTCCTGATGTCCCAGAGGA
<b>ATF3_intron64</b>	TGCCCTCAGCCACTCTAGTT	CACCCTCAAAGTGACATTCAA
<b>ATF3_intron65</b>	ATAGGACCTGGCCACACATC	GGAAACTTGGGATGCTCTGA
<b>ATF3_intron66</b>	TGCCAGCCACTAGCTAAGGT	GGACATGAGCACACACAGGT
<b>ATF3_intron67</b>	CCGATGCTAGACCCAGAATG	TTGCCAATGGATGTTCTATGA
<b>ATF3_intron68</b>	ACAATCTTTGGGGGTCTTC	GGGGATTCATCCACAGGTTT
<b>ATF3_intron69</b>	TCCCTTGTCTGTTTCCAAA	TTTGGGGTCTGGTTCTGTCT
<b>ATF3_intron70</b>	GGTTGCAGAAATGGGTCTGT	ACGGGAGTGGAGTCCATTTT
<b>ATF3_intron71</b>	AATCCAAGTGCCTTCCACAC	TGTGCACACTCTCAGCACAC
<b>ATF3_intron72</b>	CACATGTCCCAGCATGAAGT	TGGAGATCTGCTCCTGTCT
<b>ATF3_intron73</b>	TCAGGATCAGACTTCCGTGA	CTCACTCAGACCACCCACCT
<b>ATF3_intron74</b>	CGTTACCAGGGCGAAAAGTA	AGGAGGGGGAAAGAGAAGGT
<b>ATF3_intron75</b>	GGTCGGGGAATAAGAACCAG	GGGCACGACCTTTCTCTAAA
<b>ATF3_intron76</b>	GCCCTCCGCTTTTGTGTTA	GTGGAGAGAGGGGGCACT

---



