



Université de Montréal

**Caractérisation clinique et génétique d'une  
nouvelle forme d'ataxie autosomique  
récessive dans la population québécoise**

par

Isabelle Thiffault

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Docteur  
en Biologie Moléculaire

Octobre 2009

© Isabelle Thiffault 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Caractérisation clinique et génétique d'une  
nouvelle forme d'ataxie autosomique récessive  
dans la population québécoise**

Présentée par :  
Isabelle Thiffault

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

D<sup>r</sup> Frédéric Charron président-rapporteur  
D<sup>r</sup> Bernard Brais directeur de recherche  
D<sup>r</sup> Damian Labuda membre du jury  
D<sup>r</sup> Jamie Engert examinateur externe  
D<sup>r</sup> Nicole Leclerc représentant du doyen

## Résumé

Les ataxies autosomiques récessives sont un groupe de troubles neurologiques hétérogènes caractérisés par une incoordination brute des mouvements musculaires impliquant le dysfonctionnement nerveux du cervelet qui coordonne le mouvement. Plusieurs formes héréditaires ont été décrites dont la plus connue : l'ataxie de Friedreich. Dans cette thèse nous rapportons l'identification et la caractérisation d'une nouvelle forme dans la population québécoise. L'ataxie récessive spastique avec leucoencéphalopathie (ARSAL; aussi connue comme l'ataxie autosomique récessive spastique de type 3 (SPAX3); OMIM 611390) est la deuxième ataxie spastique décrite dans la population canadienne française. En effet, près de 50 % de nos cas sont originaires de la région de Portneuf. En 2006, nous avons décrit les caractéristiques cliniques de cette nouvelle forme d'ataxie. Un premier criblage du génome entier, constitué de plus de 500 marqueurs microsatellites, a permis la localisation du locus sur le chromosome 2q33-34. Suite au séquençage de plus de 37 gènes candidats et afin de rétrécir cet intervalle candidat, nous avons utilisé une micro-puce d'ADN constituée de marqueurs SNP «single nucleotide polymorphism» et nous avons identifié un deuxième intervalle candidat de 0.658Mb au locus 2q33 dans lequel se trouvent moins de 9 gènes. L'identification et la caractérisation de ces mutations a nécessité l'utilisation de diverses technologies de pointe. Trois mutations (une délétion et deux réarrangements complexes) dans le gène mitochondrial tRNA-synthetase (*MARS2*) ont été identifiées dans notre cohorte. Nous émettons l'hypothèse que la nature des mutations complexes est responsable d'un dérèglement de la transcription du gène, ce qui a un impact néfaste sur la fonction mitochondriale et le tissu neuronal.

Mots-clés : Ataxie, leucoencéphalopathie, cervelet, mutation mitochondriale, *MARS2*.

## Abstract

Autosomal Recessive Ataxias are a group of heterogeneous neurological disorders consisting of gross incoordination of muscle movements implying dysfunction of parts of the nervous system that coordinate movement such as the cerebellum. Several hereditary forms exist for these patterns of neurological dysfunction. In this thesis we reported the identification and characterization of a new form in the French-Canadian population. Autosomal Recessive Spastic Ataxia with frequent Leukoencephalopathy (ARSAL; also referred to as Autosomal Recessive Spastic Ataxia type 3 (SPAX3); OMIM 611390) is the second recessive spastic ataxia originally described in the French-Canadian population. Furthermore, close to 50% of our cases share a Portneuf region origin. In 2006 we described the cardinal features of this new form of ataxia. A first genome wide scan was performed on three informative families with microsatellite (single tandem repeat) markers and a parametric linkage analysis. This allowed us to identify a candidate interval on chromosome 2q33-34. Sequencing of more than 37 genes did not uncover the putative mutation. In order to refine this candidate interval, we have a second genome scan using single nucleotide polymorphism SNP markers and we have identified a smaller candidate interval of 0.658 Mb in which there are nine genes. The use of a multimodal approach was required to uncover and characterize the three mutations (one deletion and two complex rearrangements) in the mitochondrial met-tRNA synthetase gene (*MARS2*). We suggest that complex rearrangement of the 5' region of the gene has a great impact on the gene transcription regulation, which affect its mitochondrial function and impair the neuronal tissue.

Keywords: ataxia, leukoencephalopathy, cerebellum, mutation mitochondrial, *MARS2*.

## Table des matières

RÉSUMÉ	IV
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	X
LISTE DES RESSOURCES INTERNET	XI
DÉDICACE	XIII
REMERCIEMENTS	XIV
CHAPITRE I: INTRODUCTION	1
CHAPITRE II: Caractérisation clinique et génétique d'une nouvelle forme d'ataxie dans la population québécoise: identification du locus d'une nouvelle forme d'ataxie spastique avec leucoencéphalopathie sur le chromosome 2q33-34	
▪ Contribution des auteurs	45
▪ Abrégé	47
▪ Introduction	48
▪ Méthodes	49
▪ Résultats	52
▪ Discussion	57
▪ Remerciements	61
▪ Références	69
CHAPITRE III : Analyses mutationnelles des gènes candidats se trouvant au locus 2q33-34	
▪ Introduction	74
▪ Méthodes	74
▪ Résultats	77
▪ Discussion	92
▪ Références	95

CHAPITRE IV: Identification et caractérisation des mutations dans  
le gène responsable de l'ARSAL

▪ Contribution des auteurs	100
▪ Abrégé	103
▪ Introduction/ Résultats/ Discussion	104
▪ Remerciements	109
▪ Méthodes	132
▪ Références	135
CONCLUSION	138
ANNEXE I : Table PENNCNV	i

**Liste des tableaux****CHAPITRE I**

Table 1. Classification des ataxies cérébelleuses	5
Table 2. Ataxies cérébelleuses récessives	7

**CHAPITRE II**

Table 1. Clinical Findings in French-Canadian cases of ARSAL	65
Table 2. MRI Findings in French-Canadian Cases of ARSAL	66
Table 3. Haplotype results of ARSAL for 2q33-34 markers	67
Table1. (supplementary) Position of markers, repeats and genes	68

**CHAPITRE III**

Table 1. Gènes de l'intervalle ARSAL; 2q33-34 (206-209cM)	78
Table 2. Résultats d'analyse PENNCNV	86
Table 3. Valeurs des ratios CNV	87

**CHAPITRE IV**

Table 1. Major clinical features & MARS2 mutations in ARSAL	123
Table 1. (supplementary) SUSPECTS Scores for ARSAL SNP	124
Table 2. (supplementary) ARSAL Primers and ABI®-based CNV	125
Table 3. (supplementary) Mitochondrial Protein synthesis	128
Table 4. (supplementary) t-RNA synthetase and diseases	129

**CONCLUSION**

Table 1. Comparaison entre l'ARSAL & autres AARS	150
Table 2. Classical Mitochondrial Cytopathies	158



## Liste des figures

### CHAPITRE I

Figure 1. Schéma proposé du diagnostic préférentiel	8
Figure 2. Imagerie par résonance magnétique (IRM)	12
Figure 3. Pathogenèse moléculaire des ataxies autosomiques récessives	26

### CHAPITRE II

Figure 1. Pedigrees of 17 French-Canadian ARSAL families	62
Figure 2. Sagittal and coronal T <sub>2</sub> -weighted MRI in three ARSAL cases	63
Figure 3. Multipoint LOD scores for chromosomes 2q33-34 markers	64

### CHAPITRE III

Figure 1. Graphique des résultats de SUSPECTS	77
Figure 2. Analyse du logiciel BEADSTUDIO de la région 2q33-34	79
Figure 3. Haplotypes SNP de neuf patients atteints d'ARSAL	80
Figures 4. Résultats SUSPECTS et PROSPECTR	81

### CHAPITRE IV

Figure 1. MARS2 mutation & Western Blot	111
Figure 2. Non-recurrent rearrangement involving <i>MARS2</i>	113
Figure 3. <i>MARS2</i> mRNA expression level, Steady-state levels of tRNA Met & Mitochondrial protein synthesis	115
Figure 1. (supplementary) SNP haplotype results & Array-Data Array	117
Figure 2. (supplementary) Northern Blot analysis	119
Figure 3. (supplementary) ABI®-based Copy Number Assays	120
Figure 4. (supplementary) Southern Blot analysis	122

### CONCLUSION

Figure 1. Schéma graphique de <i>MARS2</i>	143
Figure 2. Schéma graphique des données LD de HAPMAP	145

## Liste des sigles et abréviations

ABL	Abetalipoproteinemia
AARS	Aminoacyl-tRNA synthétase
AOA1 (2)	Ataxia with oculomotor apraxia
ARSACS	Autosomal Recessive Spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay
ARSAL	Autosomal recessive spastic ataxia with leukoencephalopathy
AT	Ataxia Telangiectesia
ATLD	Ataxia Telangiectesia like Disorder
AVED	Ataxia with vitamin E deficiency
cM	Centimorgans
CGH	Comparative Genome Hybridization
CNV	Variation du nombre de copies
EMG	Electromyograms
FRDA	Friedreich ataxia
GWS	Genome-wide scan
HDL3	Huntington disease-like 3
IAHSP	Infantile ascending hereditary spastic paralysis
LMN	Lower motor neuron
LOD	Logarithm of odds
LOH	Loss of heterozygosity (perte d'hétérozygotie)
LVWM	Leukoencephalopathy with vanishing white matter
Mb	Megabase
MRI	Magnetic resonance imaging
MS	Multiple sclerosis
PCR	Amplification par réactions en chaîne (Polymerase chain reaction)
PNKD	Dominant paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia
pb	Paire de bases
RT-PCR	Transcription inverse de type amplification par réactions en chaîne
SCABD	Spinocerebellar ataxia leading to blindness and deafness
SCAN1	Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy
SNP	Single nucleotide polymorphism
UMN	Upper motor neuron
U	Unité
µl	Microlitre
µM	Micromolaire

## Liste des ressources Internet

ExpASy Proteomic Tool :

[www.expasy.ch/tools/](http://www.expasy.ch/tools/)

Gene Ontology :

<http://www.geneontology.org/>

National Center for Biotechnology Information (NCBI):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

BLAST Assembled Genomes:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

PubMed:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM&itool=toolbar>

Project Ensembl:

<http://www.ensembl.org/index.html>

Tandem Repeats Finder:

<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>

Pfam database:

<http://pfam.sanger.ac.uk/>

UCSC Genome Browser website:

<http://genome.ucsc.edu/>

BLAT Search Genome (UCSC):

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start&org=Human&db=hg18&hgsid=138466647>

Primer Design Software PRIMER3:

<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

ExonPrimer:

<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/primer/ExonPrimerUCSC>

GeneCard:

<http://www.genecards.org/index.shtml>

Recherche des anticorps :

<http://www.biocompare.com/jump/2045/Antibodies.html>

Épissage alternatif et expressions (AceVIEW) :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/index.html>

Copy Number Variation Database:

<http://projects.tcag.ca/variation/>

SUSPECTS for Candidate Gene Selection:

<http://www.genetics.med.ed.ac.uk/suspects/>

PHASE pour phaser les haplotypes :

<http://www.stat.washington.edu/stephens/phase.html>

*A mon amoureux ma famille mes amis  
et tout ceux qui ont cru en moi.*

## Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu D<sup>r</sup> Bernard Brais qui a dirigé cette thèse dans la continuité de ma formation en recherche. Tout au long de ces années, il a su orienter mes recherches au bon moment en me faisant découvrir la complexité des maladies neurologiques héréditaires au travers son regard de neurologue et de généticien, ce tout en tirant partie de ma formation précédente en génétique des cancers. Malgré son horaire chargé de cliniques, de gardes et son congé «sabbatique» à Perth, il a toujours été disponible pour d'intenses et rationnelles discussions. Pour tout cela, sa confiance, sa ténacité à me pousser plus loin et son soutien en cette fin de thèse brusquée... je le remercie vivement. Je sais que ce n'est pas la fin... Merci pour tout !

Je remercie le président rapporteur de cette thèse ainsi que les autres membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.

Pour reprendre un ordre plus chronologique, je voudrais remercier deux chercheurs qui ont joué un rôle fondamental dans ma formation. Tout d'abord D<sup>r</sup> William D. Foulkes qui a su éveiller en moi dès 2000 une véritable passion pour la génétique. Grâce à lui, je garderai une intuitive mais solide formation. Puis D<sup>r</sup> Georges Chong, biochimiste pluridisciplinaire, passionné et impardonnable responsable de mon indépendance en laboratoire. Il m'a sans aucun doute apporté, à travers les centaines d'heures passées ensemble, une vision plus réaliste de la complexité des tests diagnostiques.

Je tiens à remercier D<sup>r</sup> Jean-Pierre Bouchard, D<sup>r</sup> Jean Mathieu et D<sup>r</sup> Guy A. Rouleau, neurologues et chercheurs, pour avoir très fortement contribué au recrutement et à la caractérisation clinique des patients ataxiques, me permettant de réaliser au total trois projets sur les ataxies héréditaires du Québec. D<sup>rs</sup> Hugo Bellen et Vafa Bayat précieux collaborateurs de Baylor College Houston E-U. Votre modèle drosophile de l'ARSAL est tout aussi fabuleux que la simplicité de notre collaboration !

La qualité et la continuité des données présentées ici sont le fruit d'un travail d'équipe dans le laboratoire et du soutien technique et personnel... J'ai pour cela pleinement profité de la présence et de l'efficacité de Martine Tétreault. Je ne sais pas si nous nous sommes entraînées à part égale... mais ton aide m'a souvent soulagée de beaucoup de moments éprouvants. Je vais m'ennuyer de ma partenaire des milles et une péripéties. Un grand merci à Geneviève Bernard pour ton aide en cette fin de thèse et pour tout, autant nos discussions scientifiques que nos sessions de psychologie ! Mes plus vifs remerciements à Lina Loisel, Julie Allyson et Julie Demers-Lamarche pour leur aide dont j'ai parfois peut-être abusé pour ces projets. Merci à Marie-Josée et Catherine pour votre aide tout au long de ce périple. Enfin, une pensée émue pour les autres membres et étudiants qui aussi été complices de ces années de labo: Christine Alexander, Claude Bherer, Véronique Bolduc, Jonathan Jarry, Arnaud Klein, Maria Lisa Putorti, Marie-France Rioux, Elsa Rossignol et Myriam Srour.

J'ai eu également le plaisir de collaborer avec des membres des laboratoires du Centre d'excellence en neuromique de l'Université de Montréal. Je pense en premier lieu à Claude Marineau, Daniel Rochefort, François Gros-Louis, Paul Valdmanis, Julie Gauthier, Inge Meijer, D<sup>r</sup> Alex Parker et D<sup>r</sup> Mark Samuels pour vos conseils, nos collaborations et nos échanges.

Le Centre de recherche du CHUM Notre-Dame de l'Université de Montréal, le programme de Biologie moléculaire, principalement D<sup>r</sup> Trang Hoang et M<sup>me</sup> Vivianne Jodoin, qui ont été un cadre privilégié pour effectuer une thèse.

Le Centre d'Innovation Génome Québec: un grand merci à Pierre Lepage, Alexandre Montpetit, Alexandre Belzile, Fanny Chagnon, et François Bacot pour leur aide indispensable et précieux conseils techniques.

Le Fond de la recherche en santé du Québec pour leur support financier, mais principalement pour les opportunités que vous m'avez données en me nommant à la présidence du comité permanent des affaires étudiantes (CPAE) du FRSQ et comme observatrice étudiante sur le CA. Sincères remerciements aux membres actuels du CPAE (Marie, Marie-Ève, Martin, May, et Mélanie) Sylvain Charbonneau, Michèle Dubuc, D<sup>r</sup> Murielle Gascon-Barré, Mr Cédric Pautel, D<sup>r</sup> Yves Joanette et ancien président D<sup>r</sup> Alain Beaudet. Merci aux membres du CA qui ont été un cadre privilégié d'enseignement sur le système régissant notre communauté scientifique et qui ont animé de passionnantes réflexions et discussions.

La Fondation de l'ataxie Charlevoix-Saguenay et l'Association canadienne des ataxies familiales (Fondation Claude St-Jean) pour leur support financier et personnel à la recherche.

Pour finir, ces remerciements ne pourraient être complets sans ceux destinés à Daniel, ma famille (Papa, Maman, Mélanie, David, Steven, Mel B., et mes trois poussins : Mary Lau, Coralee, et Tristan). Une pensée sincères à mes précieuses amies (Dominique M., Dominique Ma., M<sup>me</sup> Kim, Geneviève P, Nathalie, Julie A., Nadine, Marie-Christine, Stef F. «ma voisine exotique», Gen «la voisinette de rêve», Chef Ann Claude et Tao. Et tous les autres amis qui ont pimenté ma vie des dernières années... Merci pour les sourires, votre folie et votre support.



## **CHAPITRE I :**

### **INTRODUCTION AUX ATAXIES HÉRÉDITAIRES**

## Historique de l'étude des ataxies au Québec

L'ataxie (du grec ataxiā signifiant « désordre ») est définie comme étant un manque de coordination ou un désordre de l'équilibre. Le terme ataxie est typiquement employé pour qualifier la marche (ataxie à la marche), mais peut aussi être utilisé pour caractériser une instabilité du tronc en position assise (ataxie tronculaire), ou encore des mouvements imprécis des membres (ataxie appendiculaire). L'ataxie dite « cérébelleuse » est secondaire à une atteinte du système nerveux central, et plus précisément du cervelet ou de ses connections. Par contre, il est bien connu qu'un individu peut avoir une démarche ataxique à cause d'une lésion périphérique, comme c'est le cas lorsqu'un patient présente une polyneuropathie causant un déficit sensitif important; on parle alors d'ataxie sensitive. Dans l'ataxie cérébelleuse, en plus de l'incoordination présente à la marche et lors des mouvements volontaires des membres, d'autres signes d'atteinte cérébelleuse sont typiquement présents, soit des anomalies des mouvements extraoculaires (saccades et poursuites anormales), du nystagmus et des difficultés d'énonciation ou dysarthrie [1].

L'étude des ataxies au Québec a une longue histoire. Elle remonte surtout aux travaux du D<sup>r</sup> André Barbeau (1931-1986) qui, avec la collaboration précieuse de M. Claude St-Jean, a développé un groupe collaboratif sur l'étude des ataxies familiales. Les recherches du D<sup>r</sup> André Barbeau, échelonnées sur une période de 20 ans, ont largement contribué à l'avancement des connaissances dans le champ des ataxies [2;3]. Une des contributions importantes de cet effort collaboratif est la définition des critères internationaux de l'ataxie de Friedreich [4] et la mise en place d'une banque de données. L'ensemble des chercheurs sous la direction du D<sup>r</sup> Serge Melançon, en collaboration avec le D<sup>r</sup> Michel Vanasse, ont contribué grandement à l'étude de l'ataxie de Friedreich, plus particulièrement à la forme acadienne de la maladie [5;6]. Sans conteste, l'une des contributions des chercheurs québécois des plus reconnues à l'étude des ataxies a été la description, par le D<sup>r</sup> Jean-Pierre Bouchard, neurologue à l'Hôpital l'Enfant-Jésus de Québec, de l'ataxie récessive spastique de Charlevoix-Saguenay

(ARSACS ou « Autosomal Recessive Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay ») en 1978 [7;8]. Cette découverte a cristallisé un concept qui est demeuré très important pour le laboratoire du D<sup>r</sup> Bernard Brais, à savoir qu'il existe certaines formes d'ataxies plus fréquentes dans certaines régions du Québec. Dès le début des travaux du D<sup>r</sup> André Barbeau, il avait été proposé qu'il existe un grand nombre d'ataxies régionales au Québec [9;10]. Cette approche sert toujours de cadre général aux études qui se poursuivent sur les ataxies au Québec, et ce, particulièrement dans le laboratoire de D<sup>r</sup> Bernard Brais. Depuis la caractérisation de l'ARSACS, la population de l'Est du Canada, compte tenu de son héritage génétique particulier, a contribué à l'identification de diverses formes d'ataxies, soit l'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 (AOA-2, OMIM 606 002) [11]; l'ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 1 (ARCA-1, Ataxie récessive de la Beauce; OMIM 608 441) [12]; l'ataxie sensitive autosomique dominante (ADSA) [13]; l'ataxie spastique héréditaire autosomique dominante de type 1 (ASHAD-1; Sax 1; OMIM 108 600) [14]; l'ataxie récessive spastique avec leucodystrophie (ARSAL ou « Autosomal Recessive Spastic Ataxia with Leukoencephalopathy »; l'ataxie récessive de Portneuf; OMIM 611 390) [15] et l'ataxie récessive tardive (LOCA). Les caractéristiques cliniques et les causes de ces maladies neurologiques mettent en relation l'histoire des migrations des populations dans cette région ainsi que l'impact des effets fondateurs génétiques de notre population [16].

La classification des ataxies est un champ en constante évolution et constante transformation. Au moins une nouvelle forme d'ataxie est décrite tous les ans dans la littérature scientifique. Il est suggéré que les formes les plus communes et dramatiques ont été décrites, mais il reste un très grand nombre d'entre elles dont les caractéristiques cliniques, la distribution géographique et le gène muté sont encore à découvrir [1;17-19]. Les classifications contemporaines internationales des ataxies reposent maintenant sur une classification génétique. Auparavant, plusieurs formes d'ataxies étaient décrites comme une constellation de symptômes et signes cliniques. Dans ce contexte, plusieurs d'entre elles étaient associées aux noms (éponymes) des médecins qui les avaient décrites ou à celui d'un malade atteint. L'utilisation d'éponymes a été remplacée par des noms plus descriptifs des symptômes ou du gène muté. La génétique nous oblige à classer les

formes d'ataxies en fonction de leur mode de transmission plutôt que purement sur une base clinique. Dans ce contexte, les ataxies héréditaires se divisent en ataxies dominantes, récessives, liées au chromosome X ou encore à transmission mitochondriale ou maternelle [19]. Enfin, il importe de préciser qu'il existe aussi des formes non-héréditaires et acquises (Table 1) [19].

Bien que la présente introduction porte exclusivement sur les formes récessives cérébelleuses, il est important de souligner que les formes dominantes semblent être plus fréquentes à l'échelle planétaire. Plusieurs médecins québécois se sont intéressés à ces maladies. On pense particulièrement aux D<sup>rs</sup> Guy Rouleau, Frederick Andermann et Eva Andermann [20-24]. La plupart de ces ataxies appartiennent au groupe d'ataxie appelé ataxies spinocérébelleuses ou SCA (Spinocerebellar Ataxia). On compte à ce jour trente SCA appelées SCA de type un à 30. Au Québec, les études démontrent qu'il existe des familles atteintes de plusieurs de ces formes d'ataxies [20;21]. On pense notamment à la SCA2 (OMIM 183 090), plus fréquente en Gaspésie. On observe aussi des cas de SCA6 (OMIM 183 086) dans plusieurs régions du Québec dont la Montérégie. Il existe aussi des cas de SCA3 (OMIM 109 150), typiquement de descendance portugaise, surtout dans la grande région de Montréal [21]. Il existe des cas d'autres formes de SCA au Québec, mais ils sont peu nombreux à avoir été confirmés génétiquement.

**Table 1. Classification des ataxies cérébelleuses**

- 
- I. Ataxies cérébelleuses héréditaires
    - a. Ataxies cérébelleuses autosomiques dominantes (ADCA)
      - i. Ataxies épisodiques (types 1–6)
      - ii. Ataxies spinocérébelleuse (SCA) types 1–30
      - iii. Dentatorubral Pallidoluysian Atrophy (DRPLA)
    - b. Ataxies cérébelleuses autosomiques récessives
      - i. Avec mutations dans un gène
      - ii. Avec locus identifié
      - iii. Avec désordre métabolique
      - iv. Autres maladies dégénératives ou métaboliques infantiles
    - c. Ataxies cérébelleuses liées au chromosome X
      - i. Adrénoleucodystrophie.
      - ii. Fragile-X Tremor-Ataxia Syndrome (FXTAS)
      - iii. Ataxie avec anémie sidéroblastique héréditaire
      - iv. Autres syndromes congénitaux lié au X et ataxies infantiles
    - d. Ataxies cérébelleuses mitochondriales
  - II. Ataxies sporadiques
    - a. Ataxies cérébelleuses symptomatiques
      - i. Lésions structurelles, malformations
      - ii. Toxines
        - Alcool
        - Drogues
          - a. Antiépileptiques
          - b. Benzodiazépines
          - c. Lithium
          - d. Antinéoplastiques
        - Autres
          - a. Métaux lourds (ex. mercure)
          - b. Chimiques (solvants, pesticides)
      - iii. Idiopathiques
        - 1. Atrophie multi-système (MSA)
        - 2. Ataxie cérébelleuse tardive idiopathique(ILOSCA)
- 

Modifié de Klockgether, T. *Parkinsonism & related disorders. Ataxias. Parkinsonism. Relat Disord.* 13 Suppl 3, S391-S394 (2007).

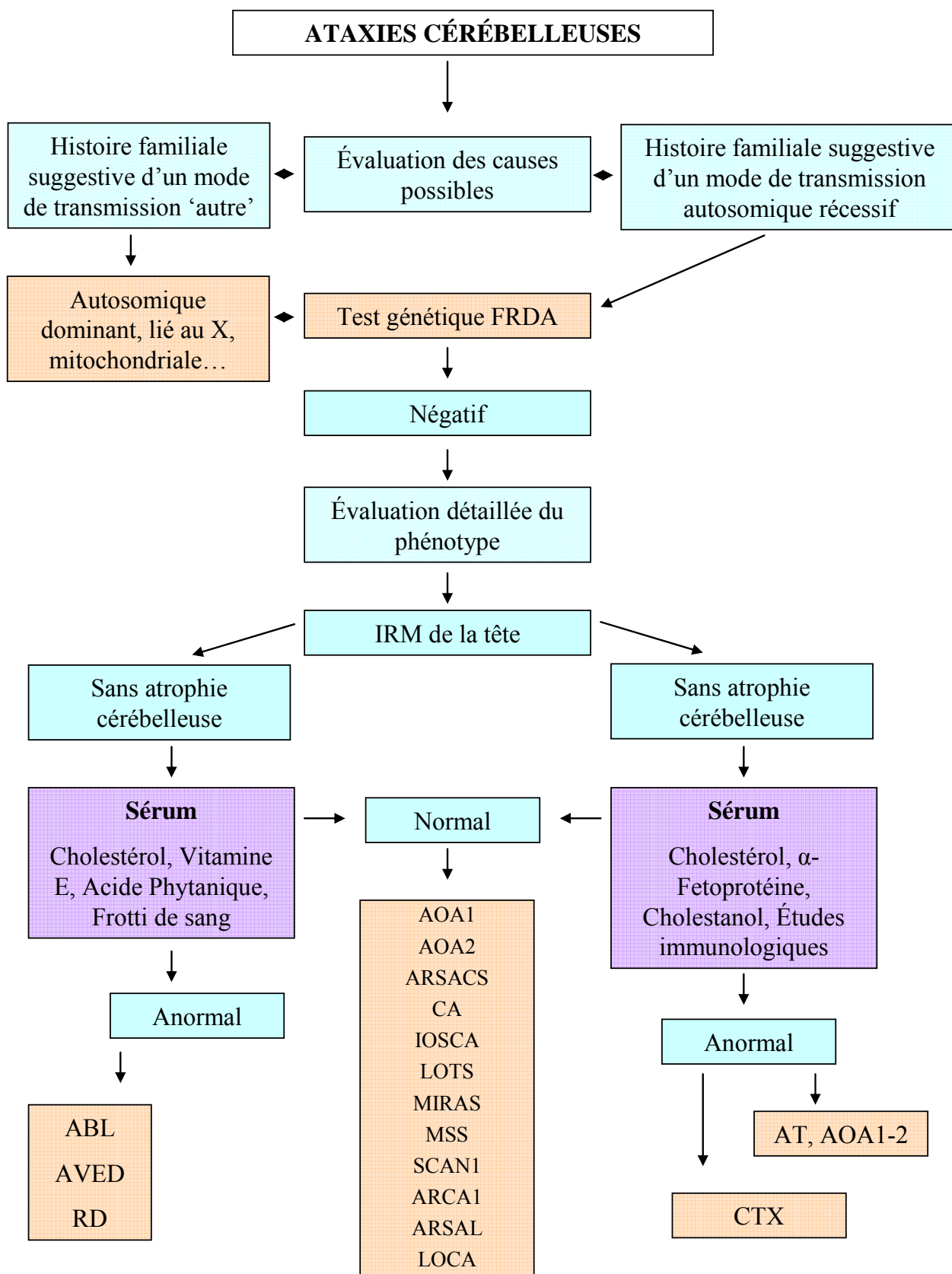
## **Diagnostic différentiel des différentes formes d'ataxie cérébelleuses autosomiques récessives**

La perte insidieuse de la marche, les troubles de l'équilibre et de la station debout, du guidage des mouvements par la vue est difficile non seulement pour le patient présentant ces symptômes mais aussi pour les cliniciens. Tel que résumé dans la Table 1, l'ataxie peut être de diverses origines; acquise, autosomique dominante, autosomique récessive, liée au chromosome X ou mitochondriale. Afin d'alléger le contenu de cette thèse, seules les formes autosomiques récessives dont le gène causal a été identifié seront traitées. La table 2 résume l'ensemble des ataxies cérébelleuses autosomiques récessives (ARCA) rapportées dans la littérature.

Les ataxies cérébelleuses autosomiques récessives constituent un groupe hétérogène de maladies neurologiques rares affectant les systèmes nerveux central et périphérique. Les ARCA's sont caractérisées par la dégénérescence ou le développement anormal du cervelet et sont transmises de façon autosomique récessive, c'est-à-dire que chacune des deux copies du gène causal d'un individu doit contenir une mutation afin que ce dernier manifeste des signes et symptômes de la maladie [18]. La majorité des formes a un début précoce, c'est-à-dire, avant l'âge de 20 ans. Les ARCA's regroupent un grand nombre de maladies rares [18]. Les plus fréquentes au sein de la population d'origine européenne sont: l'ataxie de Friedreich, l'ataxie télangiectasie et l'ataxie cérébelleuse précoce avec conservation des réflexes tendineux. Les autres formes semblent être moins répandues et peuvent être divisées en cinq types: ataxies congénitales (anomalie de développement), ataxies associées à des anomalies métaboliques, ataxies associées à des anomalies de réparation de l'ADN, ataxies dégénératives et progressives et ataxies associées à d'autres syndromes [1]. Le diagnostic différentiel de ces diverses formes nécessite une approche systématique, laquelle implique une évaluation neurologique complète, des analyses biochimiques et des investigations génétiques.

Table 2. Ataxies Cérébelleuse Récessives

Nom	Gène/Protéine	Localisation (Chr)	Age au diagnostic (rang)
<b>Avec Mutations dans un gène</b>			
Ataxie Friedrich	FRDA1	9q13-q21	2-48
Ataxie télangiectasie	ATM	11q22-q23	2-22
Ataxie avec Apraxie oculomotrice type 1	APTX	9p13	2-16
Ataxie avec Apraxie oculomotrice type 2	SETX	9q34	10-22
Ataxie Spinocérébelleuse neuropathie axonale	TDP1	14q31	Adolescence
Ataxie avec déficience en vitamine E	$\alpha$ -TTP	8q13	2-52
Abetalipoproteinémie	MPT	4q22-24	>20
Ataxie Spastique de Charlevoix Saguenay	SACS	13q12	>10
Ataxie Spinocérébelleuse Infantile	C10orf2	10q24	9-18 mois
Syndrome Ataxique Autosomique Récessif Mitochondrial	POLG	15q25	Juvenile ou adulte
Syndrome Marinesco-Sjögren	SIL1	5q31	Infantile
Ataxie des Îles Cayman	ATCA1	19p13.3	Infantile
Ataxie Cérébelleuse non progressive avec retard mental	VLDLR	9p24	Infantile
Ataxie Cérébelleuse pure ARCA1	SYNE-1	6q25	adulte
Ataxie Spastique avec Leucoencéphalopathie	MARS2	2q33-34	Juvenile ou adulte
<b>Avec Locus Identifié</b>			
Ataxie progressive Infantile		11p15	Infantile
Ataxie avec surdité et atrophie optique		6p21-23	Juvenile ou adulte
Ataxie avec retard développementale		22q11	Infantile
Ataxie Congénitale avec retard mental, atrophie optique		15q24-q26	Congénital
Ataxie Infantile non progressive		20q11-q13	Infantile
<b>Désordres métaboliques et autres syndromes associés</b>			
Leucodystrophie Métachromatique		ARSA/22q13	Juvenile ou adulte
Maladie de Krabbe	GALC	14q31	Juvenile ou adulte
Xanthomatose Cérébrotendineuse	CYP27A1	2q33-ter	Juvenile ou adulte
Niemann-Pick C	NPC1	18q11-121	Juvenile ou adulte
GM1 gangliosidose	GLB1	3p21.33	Juvenile
Maladie de Tay-Sachs disease	HEXA	15q23-24	Juvenile ou adulte
Syndrome de Wilson	ATP7B	13q14-21	3-50
Ac�ruloplasmin�mie	CP		25-60
Maladie de Refsum	PHYH, PEX7	10p11-pter, 6q22-24	Juvenile ou adulte
Sialidose	Neu1	6p21.3	Juvenile
Chor�a-acanthocytosis	CHAC	9q21	23-59
Gamma-glutamyl cystéine synthétase	GCLC	6p21	
Leucoencéphalopathie avec lésions de la substances blanches	EIF2B1, B2, B3, B4, B5	12, 14q24, 1, 2p23, 3q27	Variable





**Figure 1 : Schéma proposé du diagnostic préférentiel pour la prise en charge d'un patient présentant un phénotype d'ataxie cérébelleuse.**

Les boîtes bleues représentent les considérations cliniques ou diagnostiques; les boîtes mauves indiquent les tests sérologiques requis afin de mieux cibler les causes génétiques potentielles; les boîtes rouges indiquent les tests génétiques requis selon les considérations phénotypiques afin d'établir un diagnostic définitif. Il est important de vérifier l'imagerie par résonance magnétique (IRM de la tête) afin d'établir s'il y a présence d'atrophie cérébelleuse. Il est possible que le résultat d'imagerie soit normal en début de maladie, toutefois, selon la présentation clinique et l'histoire familiale, il est recommandé d'exclure les formes communes d'ataxies.

MIRAS = Syndrome d'ataxie cérébelleuse mitochondriale parfois causé par mutation dans POLG; FRDA = Ataxie de Friedrich; AVED = Ataxie avec déficience en vitamine E; ABL = Abetalipoprotéinémie; RD = Maladie de Refsum; LOTS = Maladie de Tay-Sachs tardive; CTX = Xanthomatose cérébrotendineuse; SCAN1 = Ataxie spinocérébelleuse avec neuropathie; AT = Ataxie téléangiectasie; AOA1-2 = Ataxie oculomotrice avec apraxie de type 1 ou 2; ARSACS = Ataxie spastique autosomique récessive de Charlevoix-Saguenay; IOSCA = Ataxie spinocérébelleuse infantile; CA = Ataxie Cayman; MSS = Syndrome de Marinesco-Sjögren; ARCA1 = Ataxie cérébelleuse pure de type 1; ARSAL = Ataxie spastique autosomique récessive avec leucodystrophie; LOCA = ataxie tardive (late-onset cerebellar ataxia).

Figure modifiée de Fogel BL, Perlman S. *Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias*. Lancet Neurol. 2007 Mar; 6(3):245-57. Review.

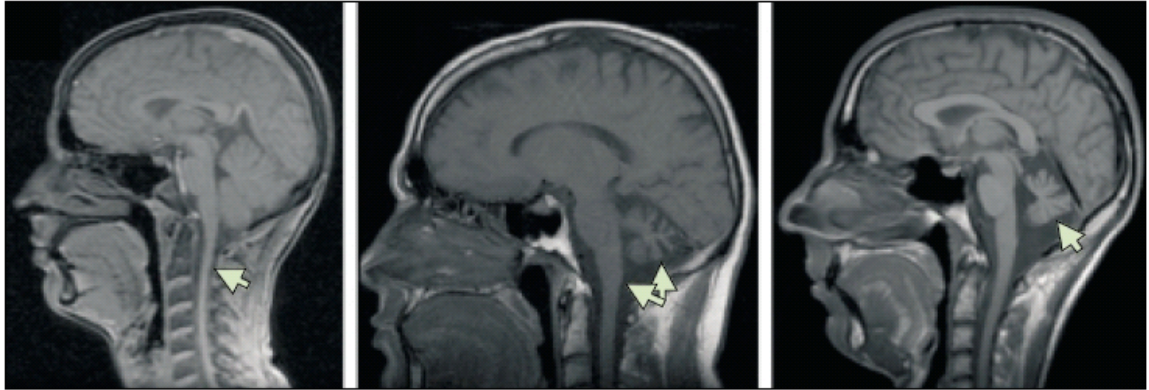
## L'ataxie de Friedreich (FRDA)

La forme la plus fréquente en Europe et dans les populations d'origine européenne est l'Ataxie de Friedreich qui a été décrite en 1863 par Nicholas Friedreich. La prévalence est de 1.7-4.7/100,000, soit une fréquence du statut de porteur de un dans 85. FRDA (OMIM 229300) est une forme progressive d'ataxie qui se présente généralement dans l'enfance et conduit le patient à une complète invalidité et à la mort en une vingtaine à une trentaine d'années. Elle se caractérise par la présence de trouble de l'équilibre, de difficulté de coordination des mouvements des membres, de difficulté de prononciation de la parole, ou plus précisément de dysarthrie. À l'examen neurologique, en plus des anomalies cérébelleuses précédemment mentionnées, on note aussi une perte des réflexes ostéo-tendineux ainsi que des signes d'atteinte sensitive, tels qu'une diminution de sensibilité au tact, une diminution de la perception de vibration et de la proprioception. On note aussi, lorsque l'atteinte est plus importante, des déformations des pieds : pieds creux et orteils en marteaux [25]. La présence de cardiomyopathie obstructive se présente quatre à cinq ans après le début des signes neurologiques, les signes ostéo-articulaires tels que les pieds creux bilatéraux et la scoliose différentient l'ataxie de Friedreich des formes similaires [26;27]. L'imagerie par résonance magnétique ne démontre pas d'atrophie cérébelleuse. Le phénotype classique a été détaillé et bien caractérisé dans la littérature. Toutefois, il est important de souligner la description de « variants » tels que la forme tardive, c'est-à-dire avec une présentation après l'âge de 25 ans et la forme avec préservation des réflexes ostéo-tendineux [1]. Cette nuance phénotypique rappelle que le diagnostic de FRDA devrait être considéré dans tous les cas de patients présentant une ataxie sporadique ou récessive.

Le gène de l'ataxie de Friedreich (FXN ou X25) est localisé sur le chromosome 9q13 et code pour une protéine de 210 acides aminés appelée frataxine [25;28]. Le gène est exprimé de façon ubiquitaire. Toutefois, son niveau d'expression diffère selon les tissus et durant le développement. Dans plus de 98% des patients, la mutation est une expansion homozygote du

triplet GAA. Ce triplet est normalement répété moins de 30 fois dans l'intron 1 du gène. Dans le cas d'un patient atteint de l'ataxie de Friedreich, le nombre de répétitions de GAA est supérieur à 60 et peut même dépasser les 1000 (FXN; OMIM 606829) [28;29]. Des mutations ponctuelles ont été décrites dans moins de 4 % des patients [25;26;28;29]. L'expansion GAA inhibe l'expression du gène de la frataxine en modifiant la structure de l'ADN, ce qui bloque la synthèse de l'ARN messager et empêche la production normale de frataxine dans les tissus, ce qui touche particulièrement la membrane des nerfs ainsi que les muscles [30]. Il est suggéré que le mosaïcisme dans les tissus atteints peut contribuer à la variabilité du phénotype observé, et ce, indépendamment de la longueur de la répétition de GAA [1]. La frataxine se localise à l'intérieur des mitochondries, organes intracellulaires essentiels pour la respiration et autres fonctions métaboliques de la cellule. Parmi les fonctions de la frataxine, on note que celle-ci est importante pour le métabolisme du fer, plus précisément pour l'assemblage des centres fer-soufre [31]. Étant donné que la majorité des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale contiennent des centres fer-soufre, la dysfonction de la frataxine entraîne une diminution importante de la synthèse des centres fer-soufre, ce qui cause un déficit fonctionnel des protéines qui contiennent ces cofacteurs, lesquels sont importants en particulier dans la chaîne respiratoire et dans le métabolisme énergétique [1]. On observe une accumulation du fer oxydé (radicaux libres) dans les mitochondries déficitaires de la frataxine tant dans les modèles expérimentaux que dans les tissus des patients atteints par l'ataxie de Friedreich [30].

Bien sûr, il existe au Québec beaucoup de cas d'ataxie de Friedreich. Toutefois, il est essentiel de souligner que malgré la présence d'un groupe important de familles dans la région de Rimouski, aucun cas n'a été confirmé dans la région du SLSJ [32]. Ceci illustre bien que la fréquence variable de porteurs de ces maladies récessives dans les différentes régions du Québec. L'ataxie de Friedreich d'origine acadienne a toujours été associée aux travaux de chercheurs québécois [6;10;32;33]. Tous les cas ont été confirmés comme étant porteurs de l'hyper expansion polymorphique du triplet répété GAA localisé dans une séquence Alu de l'intron 1 (GAA-Alu) du gène encodant pour la frataxine [32].



**Figure 2 : Imagerie par résonance magnétique (IRM) démontrant une ataxie autosomique récessive.**

L'image de gauche est une prise sagittale en T2 d'un garçon de 14 ans atteint d'ataxie de Friedreich (FRDA), le cervelet n'est pas atrophié, toutefois, la flèche démontre une faible atrophie de la colonne cervicale; l'image du centre présente une femme de 35 ans atteinte d'ataxie télangiectasie (AT), les flèches soulignent l'atrophie du cervelet et la perte de volume du tronc cérébral; l'image de droite souligne la sévère dégénérescence vermienne du cervelet d'un jeune homme de 21 ans atteint de l'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 (AOA2).

Figure modifiée de Fogel BL, Perlman S. *Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias*. Lancet Neurol. 2007 Mar; 6(3):245-57. Review.

## **Les ataxies Friedreich-like**

Bien que la plupart des syndromes ataxiques miment la présentation de l'ataxie de Friedreich, certains sont plus similaires sur plusieurs points. Ces formes incluent la maladie de Refsum, l'abêtalipoprotéinémie et l'ataxie avec déficience en vitamine E (AVED).

### **La maladie de Refsum**

La maladie de Refsum est une maladie dite « peroxysomale », c'est-à-dire, une maladie causée par une dysfonction du peroxysome, organelle nécessaire à la fonction cellulaire. Les maladies peroxysomales se divisent en deux catégories principales : la première, les anomalies de formation du peroxysome lui-même, entraînant des déficits enzymatiques multiples, et la deuxième, les anomalies enzymatiques uniques (déficience en une seule enzyme). Dans le premier groupe, on retrouve les maladies peroxysomales dans le « spectrum de Zellweger », c'est-à-dire, le syndrome de Zellweger lui-même, et les conditions qui y sont reliées (adrénoleucodystrophie néonatale et le Refsum infantile) [34;35]. Dans le deuxième groupe, c'est-à-dire une dysfonction enzymatique unique, on retrouve l'adrénoleucodystrophie et la maladie de Refsum classique, parmi d'autres [36].

La maladie de Refsum multisystémique débute typiquement entre la première et la troisième décennie (sept mois à 50 ans). La maladie se présente le plus souvent par un début insidieux de diminution de la vision nocturne (night blindness), laquelle est causée par l'apparition graduelle d'une rétinite pigmentaire [36]. Les patients développent typiquement d'autres dysfonctions affectant plusieurs systèmes, soient : une ataxie cérébelleuse, une diminution ou perte d'odorat (anosmie), une neuropathie, une surdité, une insuffisance rénale, une ichtyose, des cataractes et une cardiomyopathie [37]. L'atteinte cardiaque est souvent la cause de décès chez ces patients.

La maladie peut être diagnostiquée par l'observation d'une concentration sanguine élevée d'acide phytanique (supérieure à 200 micromoles par litre) [38].

La maladie est causée par des mutations dans le gène PHYH codant pour l'enzyme hydrolase phytanoyl-CoA (PAHX, ou PHYH; OMIM 602 026) ou le gène codant pour la peroxine-7 (PEX7; OMIM 601 757). Les mutations génétiques dans PHYH sont retrouvées dans plus de 90 % des cas. La majorité des cas ont été répertoriés en Norvège et au Royaume-Uni avec une incidence estimée de un sur 100,000 [34]. Un défaut génétique d'un des deux gènes mentionnés précédemment empêche la dégradation de l'acide phytanique, lequel est exclusivement dérivé de source exogène telle que l'alimentation. Cet acide atypique (3,7,11,15-tetraméthyl-hexadécanoïque) s'accumule dans les tissus et les liquides du corps des patients atteints de la maladie de Refsum [34;36].

Le traitement de cette maladie consiste principalement en une diète. Étant donné que les acides gras à longues chaînes se retrouvent dans plusieurs aliments tels que les produits laitiers, les viandes et le poisson. Une diète restrictive permet de limiter l'accumulation toxique d'acide phytanique dans le corps, et ce surtout dans les neurones [1].

### **L'abêtalipoprotéïnémie**

L'abêtalipoprotéïnémie, ou syndrome de Bassen-Kornzweig, est une maladie héréditaire autosomique récessive due à l'absence de l'apoprotéine  $\beta$ , constituant principal des  $\beta$ -lipoprotéines, des pré- $\beta$ -lipoprotéines et des chylomicrons. Elle est très rare, avec une prévalence estimée inférieure à un sur 1 000 000. Les caractéristiques principales de cette maladie sont : une stéatorrhée, une hypolipidémie, une acanthocytose, une ataxie progressive avec signes du motoneurone supérieur et une rétinite pigmentaire [39]. L'abêtalipoprotéïnémie sévère précoce se manifeste dès la première année de vie ou la petite enfance. Elle est souvent associée à un retard de croissance, une hépatomégalie avec stéatose, une diarrhée avec stéatorrhée et une

malabsorption des graisses. Dans les formes moins sévères et précoces, une ataxie spinocérébelleuse, une rétinite pigmentaire atypique, une acanthocytose, un taux bas de vitamines liposolubles (soient les vitamines A, D, E et K), une cytolyse majeure, voire une cirrhose peuvent survenir [39].

L'abêtalipoprotéïnémie est due à des mutations des deux allèles du gène MTTP (Microsomal Triglycerides Transfer Protein) (4q24; OMIM 157 147) [39]. Les autres formes d'hypocholestérolémie, plus sévères et précoces, sont de transmission codominante et sont dues à des mutations des deux allèles du gène APO $\beta$  (2p24-p23; OMIM 144 010). Le diagnostic repose sur le bilan lipidique après 12 h de jeûne effectué chez le patient et ses parents mesurant les taux sériques de LDL (<0,10 g/L), de triglycérides (<0,20 g/L), et d'Apo $\beta$  (<0,10 g/L). Une charge orale en lipides avec recherche de stéatorrhée et d'Apo $\beta$  tronquée, un dosage des vitamines liposolubles (A, D, E, K), une recherche d'acanthocytes (frottis sanguin), un examen neurologique complet, une échographie hépatique et un fond d'œil font également partis de l'évaluation de ces patients. La mise en évidence de mutations dans les gènes MTTP ou APO $\beta$  confirme le diagnostic [39]. Le diagnostic différentiel inclut les maladies métaboliques de surcharge hépatique, les neuropathies centrales et périphériques atypiques et les causes secondaires d'hypocholestérolémie (médicamenteuses ou systémiques). Le diagnostic prénatal est possible lorsque les mutations causales sont connues chez les deux parents. Le pronostic est sévère, l'espérance de vie est très réduite.

Une autre condition est similaire à l'abêtalipoprotéïnémie : l'hypobêtalipoprotéïnémie. La présentation clinique est superposable, mais la maladie est transmise de façon autosomique dominante. La minorité des patients atteints ont une mutation du gène ApoB.

### **L'ataxie avec déficit isolé en vitamine E**

L'ataxie avec déficit isolé en vitamine E (AVED; OMIM 277 460) est beaucoup plus fréquente en Afrique du Nord, bien que des cas ont été rapportés en Europe, en Amérique du Nord et au Japon [40-44].

L'AVED est une ataxie héréditaire très rare et sévère qui se manifeste par une neurodégénérescence progressive des voies nerveuses allant du cervelet à la moelle épinière. Ces symptômes, fort similaires à l'ataxie de Friedreich, se différencient principalement par le taux très faible de vitamine E dans le sérum [45;46]. De plus, la présence de cardiomyopathie est moins fréquente que dans l'ataxie de Friedreich, la neuropathie est typiquement plus importante, la maladie progresse plus lentement et il peut y avoir présence de titubation de la tête, de rétinite pigmentaire et de dystonie, qui sont absents dans la maladie de Friedreich [46].

Le locus génétique de l'AVED a été localisé en 1993 sur le bras long du chromosome 8 (8q.13-q13.3) [45]. Le gène responsable de l'AVED code une protéine hépatique, la protéine de transfert de l' $\alpha$ -tocopherol (TTPA; OMIM 600 413)[42;43]. Celle-ci permet le transfert et le recyclage de la vitamine E. Si cette protéine est déficiente, la vitamine E n'est plus recyclée et disparaît rapidement du corps après son absorption. De plus, cette vitamine est un antioxydant qui pourrait avoir un effet protecteur contre les lésions aux neurones causées par les radicaux libres [47]. Le traitement de supplément de vitamine E, par voie orale, chaque jour, permet une stabilisation et/ou une amélioration des symptômes si ce traitement est suivi tout au long de la vie [47;48].



## **Les Ataxies Friedreich-like avec atrophie cérébelleuse**

### **La xanthomatose cérébrotendineuse**

La xanthomatose cérébrotendineuse (CTX ; OMIM 213 700) est une forme très rare de maladie de stockage des lipides. L'atteinte neurologique est progressive. La maladie est caractérisée par des diarrhées débutant dans la tendre enfance, l'apparition de cataractes dans l'enfance, l'apparition de xanthes tendineux durant l'adolescence ou au début de l'âge adulte et enfin, par une dysfonction neurologique progressive apparaissant à l'âge adulte et incluant une démence, des symptômes psychiatriques, une dysfonction pyramidale et/ou cérébelleuse, des symptômes et signes extrapyramidaux, une neuropathie périphérique et des convulsions [49]. La diarrhée chronique dès le très jeune âge peut être la première manifestation clinique de la maladie. Par contre, dans environ 75% des cas, se sont les cataractes qui sont la première manifestation de la maladie, souvent apparaissant durant la première décennie de la vie. Les xanthes tendineux sont la caractéristique de cette maladie. Ils peuvent être localisés sur les tendons d'Achille, les tendons des extenseurs du coude ou de la main, le tendon patellaire et les tendons du cou [49;50]. Les dépôts de cholestérols sont trouvés dans pratiquement tous les tissus, mais plus particulièrement dans les tendons d'Achille, le cerveau et les poumons [49]. Le diagnostic biochimique peut être fait en démontrant des quantités anormalement élevées de cholestanol versus un taux de cholestérol plasmique faible ou normal dans le sérum des patients atteints de CTX.

La xanthomatose cérébrotendineuse est causée par des mutations dans le gène *CYP27A* [51], codant pour une hydrolase. Bien que rare, la fréquence de porteur est de un sur 108 dans la population marocaine d'origine juive séphardique [52].

### **La forme tardive de la maladie de Tay-Sachs**

La gangliosidose GM2 variante B ou maladie de Tay-Sachs est une maladie neurodégénérative due à un déficit en hexosaminidase A provoquant une accumulation du ganglioside GM2 (OMIM 272 800)[53]. La prévalence de la maladie est de un cas sur 320 000 naissances, avec un taux de porteur de un sur 300. La fréquence du taux de porteur est beaucoup plus élevée dans certaines populations, dont la population juive Ashkenazi (voir plus bas). Il existe trois formes selon l'âge de début de la maladie. La forme de l'adulte ou chronique (type 3) peut débiter vers l'âge de dix ans, mais le diagnostic n'est souvent fait qu'à l'âge adulte. Dans certain cas, le tableau clinique ressemble à une maladie de Friedreich atypique avec une ataxie spinocérébelleuse qui peut aussi être accompagnée d'un déficit intellectuel ou de troubles du comportement [53;54].

Le gène muté code pour la sous-unité alpha de l'hexosaminidase A (*HEXA* ; OMIM 606 869) et est situé sur le chromosome 15q23 [55]. Le dépistage des porteurs et le diagnostic prénatal sont recommandés dans les populations plus à risque telles que les Juifs Ashkénazes[53;56-58], Amish de Pennsylvanie, Cajun de Louisiane et pour certaines régions du Québec [53;56-58]. De façon générale, une personne sur 150 est porteuse d'un allèle muté du gène de Tay-Sachs au Québec. Toutefois, dans certaines régions, le taux est beaucoup plus élevé, soit un sur 96 au Saguenay-Lac-Saint-Jean. Le taux atteindrait des proportions plus importantes dans la communauté juive et dans la région du Bas-du-Fleuve, soit un porteur sur 30. Quant à la région de Rimouski, on parle de un porteur sur 14 [57;59;60]. Comme dans la majorité des ataxies, il n'y a pas de traitement efficace de la maladie de Tay-Sachs.

### **Le syndrome d'Alpers ou ataxie mitochondriale de type *POLG***

Le syndrome d'Alpers est dû à une déplétion en ADN mitochondrial (ADNmt) et est caractérisé par une régression psychomotrice, des crises d'épilepsie et une maladie hépatique. L'incidence est estimée à 1/100 000 - 1/250 000 naissances [61]. La plupart des patients sont asymptomatiques à la naissance et ont un développement normal pendant des semaines ou des années jusqu'à l'apparition des symptômes, survenant au cours des deux

premières années dans 80% des cas, et entre deux et 25 ans dans 20% des cas [61]. L'IRM et la spectroscopie du cerveau, d'abord normal, montrent ensuite une perte de volume cérébral, une élévation focale de lactate et une diminution en N-acétyl aspartate (NAA).

Le locus du gène a été localisé sur le chromosome 15q25. Des mutations du gène *POLG* (OMIM 174 763) codant pour l'ADN polymérase  $\gamma$  mitochondriale sont responsables d'environ 90 % des cas «classiques» et de moins de 30% des cas «Alper-like» [62]. Certaines mutations dans ce gène sont responsables du phénotype très variable [61-64]. Par exemple, la perte de l'allèle commune de dix répétitions CAG dans la séquence codante de *POLG* cause l'infertilité masculine [64]. Deux mutations ancestrales européennes semblent expliquer la fréquence élevée du taux de porteur de mutations *POLG* (soit 1 % de la population générale). La première mutation causant le syndrome d'ataxie mitochondriale (MIRAS), la W748S, a une prévalence élevée en Finlande, Norvège, Angleterre et Belgique [65]. La seconde mutation fondatrice dans *POLG*, le missense A467T, a été introduite par un chromosome ancestral européen dans les populations d'Australie, Nouvelle Zélande et aux États-Unis [63;65].

### **L'ataxie spinocérébelleuse avec neuropathie axonale**

L'ataxie spinocérébelleuse avec neuropathie axonale a été décrite dans une seule famille consanguine d'origine Saoudienne [66;67]. L'identification du locus de la maladie sur le chromosome 14q31-32 a été réalisée par étude d'homozygotie. Une substitution d'un acide aminé conservé est responsable du développement de la maladie chez les porteurs homozygotes. Le gène *TDP1* (OMIM 607 250) code pour une ADN-Tyrosyl-topoisomérase I. Il est suggéré que cette enzyme a un rôle important dans la réparation d'ADN. Ainsi, le remplacement de l'histidine à la position 493 par une arginine (H493A) modifierait la structure du site actif de l'enzyme. L'impact de ce changement structurel provoquerait la perte de fonction de *TDP1* [66;67].

## **Les ataxies cérébelleuses non Friedreich-Like**

### **L'ataxie cérébelleuse de type Caïman**

L'ataxie cérébelleuse de type Caïman (ou Cayman ataxia; OMIM 601 238) est caractérisée par un retard psychomoteur, une hypotonie et une dysfonction cérébelleuse [68]. La prévalence de ce syndrome ataxique rare est inconnue. Toutefois, tel que le suggère son appellation, un effet fondateur a entraîné une forte incidence de la maladie dans les îles Caïmans. La maladie est autosomique récessive et due à des mutations du gène *ATCAY* (localisé sur le chromosome 19p13.3), codant la protéine caytaxine [68].

### **L'ataxie télangiectasie**

Un autre groupe d'ataxies est constitué des formes impliquées dans les défauts de réparation de l'ADN. La forme la plus connue est l'ataxie télangiectasie (AT; OMIM 208 900). Sa fréquence est estimée à un cas pour 40 000 naissances [69]. Les manifestations cliniques principales de la maladie sont essentiellement recensées dans les services d'immunologie et de neurologie. En effet, cette condition associe un déficit immunitaire, typiquement un déficit en IgA, IgG, et IgE [70;71] et une ataxie cérébelleuse progressive [69;72]. Le pronostic de cette maladie est sombre, dominé par les infections sino-pulmonaires à répétition, une détérioration neurologique progressive (ataxie progressive, apraxie oculomotrice, etc.) et un risque de néoplasie augmenté, typiquement des néoplasies hématologiques, soient lymphomes et leucémies [73]. La marque de cette condition est la présence de télangiectasies cutanéomuqueuses qui, malgré le fait qu'elles aient donné leur nom à la maladie, ne sont pas toujours évidentes, du moins dans les premiers stades de la maladie. Le diagnostic est souvent difficile chez les jeunes enfants. Néanmoins, l'augmentation quasi constante de l'alpha-fœtoprotéine ainsi que les tests génétiques permettent de soupçonner et d'ensuite confirmer ce diagnostic [38;69;70]. Le gène *ATM* ou « ataxia telangiectasia mutated gene » (OMIM 607 585) dont l'altération homozygote est responsable de l'ataxie télangiectasie est localisé sur le chromosome 11q22.3 et a été caractérisé en 1995 [74;74;75]. La protéine encodée par le

gène ATM participe à des processus de contrôle du cycle cellulaire (G1 et G2-checkpoints), de réparation des cassures double-brins, de recombinaisons au cours de la méiose ou de la maturation des gènes d'immunoglobulines [69].

### **Les ataxies télangiectasie-like**

Similaires à l'AT, mentionnons les formes associées à une apraxie oculomotrice (AOAs) et la forme « Ataxia-Telangiectasia-Like Disorder » ou ATLD. Les plus connues étant les ataxies avec apraxie oculomotrice de type 1 (AOA1) et de type 2 (AOA2). Les gènes responsables de ces maladies sont respectivement *APTX*, *SETX* et *MRE1*. Tous codent pour des protéines de réparation de l'ADN. La description récente des AOA's et l'identification des gènes impliqués dans ce groupe offrent de nouvelles perspectives de diagnostic dans le domaine des ataxies autosomiques récessives. Le gène *APTX* (OMIM 606 350) est localisé sur le chromosome 9p13.3 [76]. Plusieurs dizaines de mutations ont été décrites, et ce dans plusieurs populations affectées par AOA1[77]. Quelques cas rares ont été décrits dans la population québécoise ; les familles avaient une origine portugaise. Le gène Senataxin (*SETX*; OMIM 608 465) causant AOA2, se retrouve sur le chromosome 9q34 [78]. Au Québec, un cluster de plus d'une dizaine de familles a été caractérisé par notre groupe. La majorité des familles ont un lien généalogique avec la péninsule gaspésienne, mais il existe des cas dans toutes les régions du Québec [11]. La mutation fondatrice québécoise est une substitution d'une leucine pour une arginine en position 1976 de la protéine codant pour une hélicase (L1976R). Le taux de porteurs de cette mutation est estimé à 3.5% pour les québécois d'origine anglo-normande et de 2.1 % pour les gens de la Gaspésie. Tel que décrit précédemment, même si une mutation est plus fréquente au Québec, il existe plus de cinq mutations dans la province [11]. La dernière forme d'ATLD est causée par des mutations AOA dans un gène impliqué de la recombinaison méiotique (*MRE11* ; OMIM 600 814) [79]. Ce gène, localisé sur le chromosome 11q21, code pour une protéine dont l'expression ubiquitaire est surtout notée dans les tissus en forte prolifération. La majorité des mutations identifiées sont de type nonsense ou missense. Ces dernières affectent principalement les populations du bassin méditerranéen [79-81].

### **L'ataxie spinocérébelleuse infantile ou IOSCA**

L'ataxie spinocérébelleuse infantile (ASI, plus communément appelée IOSCA ; OMIM 271 245) est une maladie neurologique héréditaire caractérisée par une atteinte précoce et sévère du système nerveux périphérique et central [82]. ASI a un effet fondateur en Finlande avec un taux de porteur de un sur 230 dans ce pays. L'ASI est caractérisée par un début précoce (entre 9 et 18 mois) d'ataxie, d'athétose, de réflexes tendineux diminués, d'ophtalmoplégie et d'une surdité neurosensorielle [82] et d'autres manifestations telles qu'une atrophie optique et une neuropathie démyélinisante sensitive. Le gène C10orf2 localisé sur le chromosome 10q24 [83] code pour une hélicase mitochondriale nommée Twinkle. La mutation c.1523A>G (p.Y508C) est la plus fréquente dans la population finlandaise [82]. Toutes les mutations identifiées à ce jour entraînent une déplétion de l'ADN mitochondrial dans le cerveau et le foie, mais pas dans les muscles [82;84].

### **Le syndrome de Marinesco-Sjogren**

Le syndrome de Marinesco-Sjogren (MSS; OMIM 248 800) est une maladie multisystémique caractérisée par la présence d'ataxie cérébelleuse, de retard intellectuel, de troubles endocriniens (courte taille, hypogonadisme, hypogonadotrope), d'anomalies squelettiques, de cataractes, avec ou sans myopathie, neuropathie et épilepsie. Anttonen et al. ont identifié des mutations dans le gène *SIL1* pour huit familles atteintes de MSS [85]. La protéine encodée par le gène *SIL1* est une glycoprotéine du réticulum endoplasmique qui interagit avec le domaine ATPase de la protéine BIP. Les mutations dans le gène *SIL1* ont pour effet de modifier la fonction et les interactions de cette protéine avec d'autres, provoquant ainsi un défaut de repliement protéique (protein folding defect) [85;86]. Les données fonctionnelles suggèrent que l'atteinte de la fonction des protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique dans les neurones différenciés provoque l'accumulation de protéines, causant un « stress » au réticulum endoplasmique et par conséquent, une neurodégénération [85]. Plus de 10 mutations dans sept groupes ethniques différents ont été reportées dans la littérature [85-89].

## **L'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay**

L'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay a été brièvement abordée dans la section concernant l'histoire de la recherche sur les ataxies au Québec. Cette forme est très connue au SLSJ et a été décrite par des groupes de recherche québécois [8;90-92].

L'ARSACS est une forme d'ataxie transmise de façon autosomique récessive. Les symptômes chez les individus atteints de cette maladie se présentent typiquement dans l'enfance, c'est-à-dire entre l'âge de un et cinq ans. À noter que les cas répertoriés à l'extérieur du Québec tendent à se présenter de façon plus tardive [93]. Les caractéristiques principales de cette ataxie sont : un syndrome ataxique incluant ataxie à la marche, dysarthrie et nystagmus, des signes du motoneurone supérieur tel que spasticité des membres et signes de Babinski et, ce qui aide souvent le clinicien à différencier cette forme des autres formes d'ataxie, la présence de fibres hypermyélinisées à l'examen du fond d'œil et d'une polyneuropathie sensitivo-motrice entraînant une amyotrophie [8;90].

La maladie est causée par des mutations du gène SACS situé sur le chromosome 13 et encodant pour la protéine saccine, une protéine appartenant au groupe de protéines chaperonnes [91]. Il est intéressant de noter que depuis la découverte des deux premières mutations responsables de cette ataxie (ARSACS; OMIM 270 550), plus d'une soixantaine de mutations ont été identifiées, touchant plus d'une dizaine de groupes ethniques [26;40;91;94-109]. La définition du gène a beaucoup changé au cours des quatre dernières années, passant de un à dix exons. La séquence génomique s'étant sur plus de 130Mb et son ARN messager de plus de 15 000 pb code pour l'une des plus grandes protéines humaines, ayant une taille de 4579 acides aminés. L'hétérogénéité du phénotype et des mutations a été démontré dans diverses populations, par exemple, plus de 19 mutations ont été décrites dans la population dite fondatrice des Pays-Bas [109]. Cette réalité est tout aussi vraie au Québec; nous avons identifié plus de dix nouvelles mutations dans des cas d'ARSACS typiques et atypiques (article

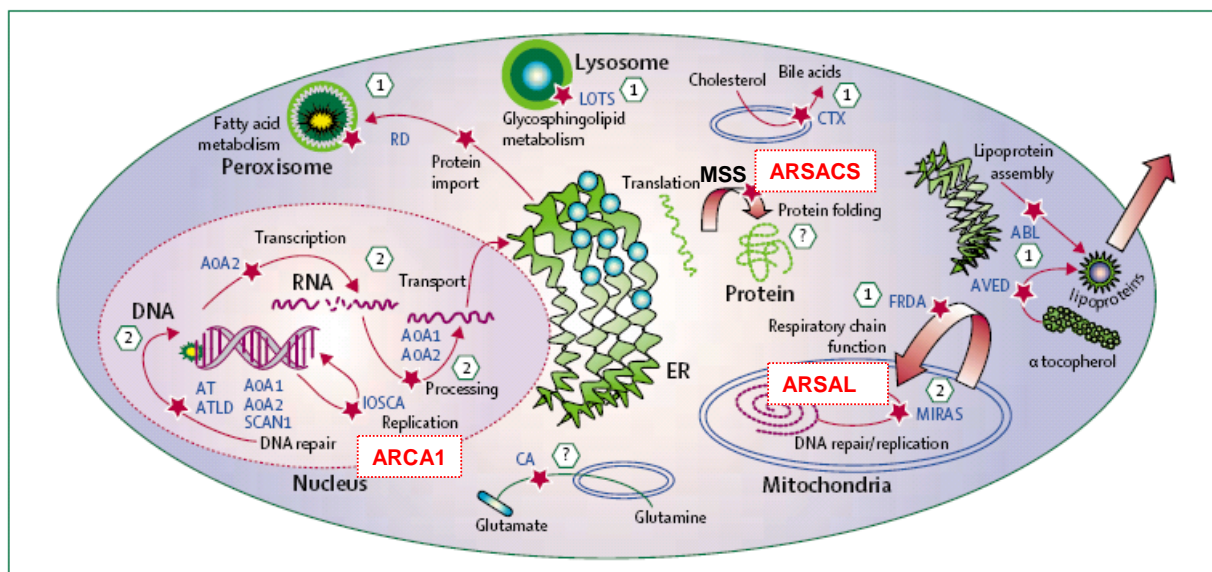
en préparation). Ceci permet d'insister sur le fait que même si une mutation semble plus fréquente à l'échelle régionale ou québécoise, il existe toujours d'autres mutations dans la population québécoise et dans d'autres pays qui vont observer une forme similaire ou légèrement différente de la même maladie.

### **L'ataxie cérébelleuse pure ou Ataxie récessive de la Beauce**

Plus récemment, Gros-Louis et al. ont identifié un groupe de 26 familles canadiennes-françaises incluant plus de 53 individus atteints dont la majorité a un lien généalogique avec la région de Beauce ou du Bas-St-Laurent [12]. Tous les patients avaient un phénotype similaire : ataxie cérébelleuse tardive avec progression lente et dysarthrie [12]. Cette forme d'ataxie a été appelée ataxie cérébelleuse pure de Beauce (ARCA1; OMIM 610 743). La prévalence de la maladie est estimée à un sur 1 000 000 dans la population québécoise [110]. Le gène muté couvre plus de 0.5Mb de séquence génomique et est constitué de 147 exons (*SYNE1*; 6q25, OMIM 608 441). Donnant plusieurs transcrits alternatifs, l'ARN messager code pour une gigantesque protéine de 8749 acides aminés, contenant des répétitions de type spectrine. Son expression est ubiquitaire et sa localisation est essentiellement au niveau des membranes nucléaires synaptiques. À ce jour, plus de sept mutations ont été décrites dans la population québécoise, la plupart étant des « nonsense », et toutes causant une forme adulte d'ataxie [12]. La grandeur du gène et la complexité de ses transcrits alternatifs constituent des défis de taille pour les laboratoires de diagnostic moléculaire. De plus, depuis sa découverte, trois substitutions ont été rapportées dans la littérature; R257H, V572L et E646K. Ces variantes ont été identifiées chez deux patients atteints de dystrophie musculaire de type Emery-Dreifuss avec ou sans cardiomyopathie [111].



Les ataxies autosomiques récessives représentent un groupe hétérogène de syndromes neurologiques dont la pathophysiologie n'est pas généralement bien comprise. Certaines maladies restent à décrire. La différenciation clinique est souvent difficile et nécessite une série d'examens et d'évaluations tels que suggéré dans la Figure 1. Pour une forme d'ataxie donnée, l'hétérogénéité des mutations requiert souvent le séquençage complet des gènes et de plus en plus l'utilisation de techniques alternatives de pointe afin de couvrir l'ensemble des mutations plus complexes, tels que les grandes délétions, duplications et réarrangements génomiques. La recherche sur la compréhension moléculaire et cellulaire de la pathogenèse de ces maladies est nécessaire afin d'offrir plus que des tests génétiques et de conseils génétiques prénataux aux familles à risque. Les traitements sont efficaces dans peu de formes, qui sont des formes dites « métaboliques » et qui répondent à une thérapie de remplacement ou à une diète (vitamine E et diète restrictive pour contrer l'abêtalipoprotéïnémie et l'AVED). Ces formes sont très rares, mais puisqu'elles sont traitables, il est primordial qu'elles soient diagnostiquées et traitées le plus précocement possible. Dans les autres formes pour lesquelles la physiopathologie n'est pas bien comprise, l'identification de la diversité des gènes causals permet de cibler quelques voies ou mécanismes potentiels pouvant être responsables de la neurodégénération. La figure 3 résume le modèle de pathogenèse moléculaire tel que défini par les connaissances actuelles sur les gènes ou protéines impliqués.



**Figure 3: Pathogénèse moléculaire des ataxies autosomiques récessives.**

Graphique d'une cellule humaine comprenant les différentes organelles. Les voies ou sites affectés par les différents gènes ou protéines mutés qui ont été identifiés comme causes du développement d'ataxies récessives. Le mécanisme responsable demeure inconnu. Toutefois, il est intéressant de souligner l'importance du stress oxydatif, des anomalies métaboliques, des voies d'apoptose et de l'instabilité génétique. Telles qu'indiquées en rouge, les trois formes d'ataxies « québécoises » ont leurs gènes identifiés dans trois composantes cellulaires différentes; fonction prédite de chaperonne dans le cytosol (ARSACS), fonction de synthèse des protéines mitochondriales (ARSAL) et localisation dans la membrane nucléaire (ARCA1). Tout comme la protéine SACS causant l'ARSACS, SYNE1 est une protéine gigantesque dont la fonction primaire demeure inconnue. Sa localisation semble toutefois indiquer une importance au niveau de la jonction synaptique.

Figure modifiée de Fogel BL, Perlman S. *Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias*. Lancet Neurol. 2007 Mar; 6(3):245-57. Review.

## **Caractérisation clinique et génétique de l'ataxie autosomique récessive avec leucodystrophie (ARSAL; 2004-2009)**

La période de recrutement et de caractérisation clinique de l'ARSAL a débuté en 2003 par l'identification de trois familles atteintes d'une forme spastique inconnue d'ataxie récessive. Dans notre cohorte de plus de 500 cas ataxiques, nous avons caractérisé deux groupes distincts; l'ataxie spastique avec présence fréquente de leucoencéphalopathie (ARSAL; SPAX3, OMIM 611390) qui est associée à la région de Portneuf ainsi que d'une forme tardive d'ataxie récessive avec progression de type atrophie multisystémique (LOCA-MSA). L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse de Ph.D. porteront sur la première forme, ARSAL, sa caractérisation clinique, génétique ainsi que la compréhension des processus de neurodégénération.

### **Buts et objectifs**

Cette thèse rapporte le succès du clonage positionnel et de l'identification du gène muté dans l'ARSAL. L'approche permettant d'identifier le gène causal se divise en deux approches distinctes : le clonage fonctionnel et le clonage positionnel. Le clonage fonctionnel repose sur la pathophysiologie de la maladie afin d'identifier par les connaissances cliniques les gènes susceptibles d'être impliqués dans la pathologie (en anglais, candidate gene approach). Quant au clonage positionnel, il consiste à cloner une région génétique située entre deux marqueurs polymorphiques dont les études de liaison ont permis de lier le phénotype à un locus chromosomique précis. Le succès de cette approche repose sur la qualité des échantillons obtenu par le recrutement de plusieurs familles contenant plusieurs cas présentant le même phénotype. Bien que plus de 50 familles constituent notre cohorte, notre stratégie de criblage entier du génome et d'analyse de liaison a reposé sur les trois familles initiales. Les données génotypiques et haplotypiques de l'ensemble de la cohorte ont permis la cartographie fine du locus et l'identification du gène muté.

## Hypothèse

La grande famille recrutée originaire du comté de Portneuf (famille B) contient quatre cas atteints d'ARSAL présentant un phénotype identique nous indiquant la présence d'une maladie héréditaire. Puisqu'aucun parent n'est atteint et que certains des cas sont de sexe féminin, cela signifie que la maladie se transmet selon un mode de transmission récessif. L'homogénéité présente dans la population provenant de Portneuf résultant en partie de l'endogamie a provoqué un changement du profil des fréquences alléliques. Ce changement a fait resurgir certains allèles rares et avec ceux-ci certaines maladies rares telles que le Tay-Sachs et la  $\beta$ -thalassémie [59;60]. Ces indices nous ont poussés à émettre l'hypothèse que l'ARSAL représente une maladie à effet fondateur régional pour le comté de Portneuf.

## Objectifs:

1. Caractérisation clinique de la cohorte canadienne-française (Chapitre 2) ;
2. exclusion des loci connus d'ARCA (Chapitre 2) et identification du locus génétique du gène responsable d'ARSAL ;
3. criblage fin du génome, analyse de ségrégation, haplotype et réduction du locus ARSAL (Chapitre 2 et 3) ;
4. séquençage des gènes candidats du locus ARSAL (Chapitre 2 et 3) ;
5. identification du gène muté et caractérisation des mutations ARSAL (Chapitre 4).

### Reference List

- [1] B.L.Fogel, S.Perlman. Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias, *Lancet Neurol.* 6 (2007) 245-257.
- [2] A.Barbeau, S.M.Le, G.Breton, R.Coallier, J.P.Bouchard. Friedreich's ataxia: preliminary results of some genealogical research, *Can J Neurol Sci.* 3 (1976) 303-306.
- [3] A.Barbeau. Friedreich's Ataxia 1978--an overview, *Can J Neurol Sci.* 5 (1978) 161-165.
- [4] A.Barbeau. Friedreich's ataxia 1980. An overview of the physiopathology, *Can J Neurol Sci.* 7 (1980) 455-468.
- [5] S.B.Melancon, R.Cloutier, M.Potier, L.Dallaire, M.Vanasse, G.Geoffroy, A.Barbeau. Friedreich's ataxia: malic enzyme activity in cellular fractions of cultured skin fibroblasts, *Can J Neurol Sci.* 11 (1984) 637-642.
- [6] J.P.Bouchard, A.Barbeau, R.Bouchard, M.Paquet, R.W.Bouchard. A cluster of Friedreich's ataxia in Rimouski, Quebec, *Can J Neurol Sci.* 6 (1979) 205-208.
- [7] J.P.Bouchard, A.Barbeau, R.Bouchard, R.W.Bouchard. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay, *Can J Neurol Sci.* 5 (1978) 61-69.
- [8] J.P.Bouchard, A.Barbeau, R.Bouchard, R.W.Bouchard. Electromyography and nerve conduction studies in Friedreich's ataxia and autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS), *Can J Neurol Sci.* 6 (1979) 185-189.
- [9] A.Barbeau. The Quebec Cooperative Study of Friedreich's Ataxia: 1974-1984--10 years of research, *Can J Neurol Sci.* 11 (1984) 646-660.

- [10] A.Barbeau, M.Roy, M.Sadibelouiz, M.A.Wilensky. Recessive ataxia in Acadians and "Cajuns", *Can J Neurol Sci.* 11 (1984) 526-533.
- [11] A.Duquette, K.Roddier, J.Nabb-Baltar, I.Gosselin, A.St-Denis, M.J.Dicaire, L.Loisel, D.Labuda, L.Marchand, J.Mathieu, J.P.Bouchard, B.Brais. Mutations in senataxin responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy, *Ann Neurol.* 57 (2005) 408-414.
- [12] F.Gros-Louis, N.Dupre, P.Dion, M.A.Fox, S.Laurent, S.Verreault, J.R.Sanes, J.P.Bouchard, G.A.Rouleau. Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia, *Nat Genet.* 39 (2007) 80-85.
- [13] P.N.Valdmanis, D.Brunet, J.St-Onge, L.Weston, G.A.Rouleau, N.Dupre. A founder haplotype for autosomal dominant sensory ataxia in Eastern Canada, *Neurology.* 67 (2006) 2239-2242.
- [14] I.A.Meijer, C.K.Hand, K.K.Grewal, M.G.Stefanelli, E.J.Ives, G.A.Rouleau. A locus for autosomal dominant hereditary spastic ataxia, SAX1, maps to chromosome 12p13, *Am J Hum Genet.* 70 (2002) 763-769.
- [15] I.Thiffault, M.F.Rioux, M.Tetreault, J.Jarry, L.Loiselle, J.Poirier, F.Gros-Louis, J.Mathieu, M.Vanasse, G.A.Rouleau, J.P.Bouchard, J.Lesage, B.Brais. A new autosomal recessive spastic ataxia associated with frequent white matter changes maps to 2q33-34, *Brain.* 129 (2006) 2332-2340.
- [16] N.Dupre, J.P.Bouchard, B.Brais, G.A.Rouleau. Hereditary ataxia, spastic paraparesis and neuropathy in the French-Canadian population, *Can J Neurol Sci.* 33 (2006) 149-157.
- [17] T.Klockgether, R.Ludtke, B.Kramer, M.Abele, K.Burk, L.Schols, O.Riess, F.Laccone, S.Boesch, I.Lopes-Cendes, A.Brice, R.Inzelberg, N.Zilber, J.Dichgans. The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients, *Brain.* 121 ( Pt 4) (1998) 589-600.

- [18] T.Klockgether. [Ataxias. Diagnostic procedure and treatment],  
Nervenarzt. 76 (2005) 1275-1283.
- [19] T.Klockgether. Parkinsonism & related disorders. Ataxias, Parkinsonism  
Relat Disord. 13 Suppl 3 (2007) S391-S394.
- [20] I.Silveira, I.Lopes-Cendes, S.Kish, P.Maciél, C.Gaspar, P.Coutinho,  
M.I.Botez, H.Teive, W.Arruda, C.E.Steiner, W.Pinto-Junior, J.A.Maciél,  
S.Jerin, G.Sack, E.Andermann, L.Sudarsky, R.Rosenberg, P.MacLeod,  
D.Chitayat, R.Babul, J.Sequeiros, G.A.Rouleau. Frequency of  
spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy, and  
Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar  
ataxia patients, Neurology. 46 (1996) 214-218.
- [21] I.Silveira, P.Coutinho, P.Maciél, C.Gaspar, S.Hayes, A.Dias, J.Guimaraes,  
L.Loureiro, J.Sequeiros, G.A.Rouleau. Analysis of SCA1, DRPLA, MJD,  
SCA2, and SCA6 CAG repeats in 48 Portuguese ataxia families, Am J  
Med Genet. 81 (1998) 134-138.
- [22] I.Lopes-Cendes, E.Andermann, G.A.Rouleau. Evidence for the existence  
of a fourth dominantly inherited spinocerebellar ataxia locus,  
Genomics. 21 (1994) 270-274.
- [23] I.Lopes-Cendes, E.Andermann, E.Attig, F.Cendes, S.Bosch, M.Wagner,  
F.Gerstenbrand, F.Andermann, G.A.Rouleau. Confirmation of the  
SCA-2 locus as an alternative locus for dominantly inherited  
spinocerebellar ataxias and refinement of the candidate region, Am J  
Hum Genet. 54 (1994) 774-781.
- [24] I.Lopes-Cendes, H.G.Teive, M.E.Calcagnotto, J.C.Da Costa, F.Cardoso,  
E.Viana, J.A.Maciél, J.Radvány, W.O.Arruda, P.C.Trevisol-Bittencourt,  
N.P.Rosa, I.Silveira, C.E.Steiner, J.W.Pinto, A.S.Santos, N.Y.Correa,  
L.C.Werneck, A.Q.Araujo, G.Carakushansky, L.R.Mello, L.B.Jardim,  
G.A.Rouleau. Frequency of the different mutations causing  
spinocerebellar ataxia (SCA1, SCA2, MJD/SCA3 and DRPLA) in a large  
group of Brazilian patients, Arq Neuropsiquiatr. 55 (1997) 519-529.

- [25] L.Montermini, A.Richter, K.Morgan, C.M.Justice, D.Julien, B.Castellotti, J.Mercier, J.Poirier, F.Capozzoli, J.P.Bouchard, B.Lemieux, J.Mathieu, M.Vanasse, M.H.Seni, G.Graham, F.Andermann, E.Andermann, S.B.Melancon, B.J.Keats, D.S.Di, M.Pandolfo. Phenotypic variability in Friedreich ataxia: role of the associated GAA triplet repeat expansion, *Ann Neurol.* 41 (1997) 675-682.
- [26] M.Anheim, M.Fleury, B.Monga, V.Laugel, D.Chaigne, G.Rodier, E.Ginglinger, C.Boulay, S.Courtois, N.Drouot, M.Fritsch, J.P.Delaunoy, D.Stoppa-Lyonnet, C.Tranchant, M.Koenig. Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management, *Neurogenetics.* (2009).
- [27] F.Duclos, U.Boschert, G.Sirugo, J.L.Mandel, R.Hen, M.Koenig. Gene in the region of the Friedreich ataxia locus encodes a putative transmembrane protein expressed in the nervous system, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90 (1993) 109-113.
- [28] V.Campuzano, L.Montermini, M.D.Molto, L.Pianese, M.Cossee, F.Cavalcanti, E.Monros, F.Rodius, F.Duclos, A.Monticelli, F.Zara, J.Canizares, H.Koutnikova, S.I.Bidichandani, C.Gellera, A.Brice, P.Trouillas, M.G.De, A.Filla, F.R.De, F.Palau, P.I.Patel, D.S.Di, J.L.Mandel, S.Cocozza, M.Koenig, M.Pandolfo. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion, *Science.* 271 (1996) 1423-1427.
- [29] M.B.Delatycki, M.Knight, M.Koenig, M.Cossee, R.Williamson, S.M.Forrest. G130V, a common FRDA point mutation, appears to have arisen from a common founder, *Hum Genet.* 105 (1999) 343-346.
- [30] M.Pandolfo, A.Pastore. The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin, *J Neurol.* 256 Suppl 1 (2009) 9-17.



- [31] R.Lodi, P.E.Hart, B.Rajagopalan, D.J.Taylor, J.G.Crilley, J.L.Bradley, A.M.Blamire, D.Manners, P.Styles, A.H.Schapira, J.M.Cooper. Antioxidant treatment improves in vivo cardiac and skeletal muscle bioenergetics in patients with Friedreich's ataxia, *Ann Neurol.* 49 (2001) 590-596.
- [32] A.Richter, J.Poirier, J.Mercier, D.Julien, K.Morgan, M.Roy, F.Gosselin, J.P.Bouchard, S.B.Melancon. Friedreich ataxia in Acadian families from eastern Canada: clinical diversity with conserved haplotypes, *Am J Med Genet.* 64 (1996) 594-601.
- [33] A.Barbeau, S.M.Le, G.Breton, R.Coallier, J.P.Bouchard. Friedreich's ataxia: preliminary results of some genealogical research, *Can J Neurol Sci.* 3 (1976) 303-306.
- [34] G.A.Jansen, R.Ofman, S.Ferdinandusse, L.Ijlst, A.O.Muijsers, O.H.Skjeldal, O.Stokke, C.Jakobs, G.T.Besley, J.E.Wraith, R.J.Wanders. Refsum disease is caused by mutations in the phytanoyl-CoA hydroxylase gene, *Nat Genet.* 17 (1997) 190-193.
- [35] G.A.Jansen, S.Ferdinandusse, E.M.Hogenhout, N.M.Verhoeven, C.Jakobs, R.J.Wanders. Phytanoyl-CoA hydroxylase deficiency. Enzymological and molecular basis of classical Refsum disease, *Adv Exp Med Biol.* 466 (1999) 371-376.
- [36] G.A.Jansen, H.R.Waterham, R.J.Wanders. Molecular basis of Refsum disease: sequence variations in phytanoyl-CoA hydroxylase (PHYH) and the PTS2 receptor (PEX7), *Hum Mutat.* 23 (2004) 209-218.
- [37] R.Thumler, W.Atzpodien, G.J.Kremer, G.Haferkamp. [Refsum's syndrome (author's transl)], *Dtsch Med Wochenschr.* 102 (1977) 1454-1457.
- [38] D.S.Di, C.Gellera, C.Mariotti. The complex clinical and genetic classification of inherited ataxias. II. Autosomal recessive ataxias, *Neurol Sci.* 22 (2001) 219-228.

- [39] J.Wang, R.A.Hegele. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene mutations in Canadian subjects with abetalipoproteinemia, *Hum Mutat.* 15 (2000) 294-295.
- [40] Y.Bouhlal, M.Zouari, M.Kefi, H.C.Ben, F.Hentati, R.Amouri. Autosomal recessive ataxia caused by three distinct gene defects in a single consanguineous family, *J Neurogenet.* 22 (2008) 139-148.
- [41] N.Doerflinger, C.Linder, K.Ouahchi, G.Gyapay, J.Weissenbach, P.D.Le, P.Rigault, S.Belal, H.C.Ben, F.Hentati, . Ataxia with vitamin E deficiency: refinement of genetic localization and analysis of linkage disequilibrium by using new markers in 14 families, *Am J Hum Genet.* 56 (1995) 1116-1124.
- [42] C.Mariotti, C.Gellera, M.Rimoldi, R.Mineri, G.Uziel, G.Zorzi, D.Pareyson, G.Piccolo, D.Gambi, S.Piacentini, F.Squitieri, R.Capra, B.Castellotti, D.S.Di. Ataxia with isolated vitamin E deficiency: neurological phenotype, clinical follow-up and novel mutations in TTPA gene in Italian families, *Neurol Sci.* 25 (2004) 130-137.
- [43] N.Marzouki, A.Benomar, M.Yahyaoui, N.Birouk, M.Elouazzani, T.Chkili, M.Benlemlih. Vitamin E deficiency ataxia with (744 del A) mutation on alpha-TTP gene: genetic and clinical peculiarities in Moroccan patients, *Eur J Med Genet.* 48 (2005) 21-28.
- [44] H.Sasaki, I.Yabe, K.Tashiro. The hereditary spinocerebellar ataxias in Japan, *Cytogenet Genome Res.* 100 (2003) 198-205.
- [45] H.C.Ben, N.Doerflinger, S.Belal, C.Linder, L.Reutenauer, C.Dib, G.Gyapay, A.Vignal, P.D.Le, D.Cohen, . Localization of Friedreich ataxia phenotype with selective vitamin E deficiency to chromosome 8q by homozygosity mapping, *Nat Genet.* 5 (1993) 195-200.

- [46] L.Cavalier, K.Ouahchi, H.J.Kayden, D.S.Di, L.Reutenauer, J.L.Mandel, M.Koenig. Ataxia with isolated vitamin E deficiency: heterogeneity of mutations and phenotypic variability in a large number of families, *Am J Hum Genet.* 62 (1998) 301-310.
- [47] S.Morley, C.Panagabko, D.Shineman, B.Mani, A.Stocker, J.Atkinson, D.Manor. Molecular determinants of heritable vitamin E deficiency, *Biochemistry.* 43 (2004) 4143-4149.
- [48] C.Espinos-Armero, P.Gonzalez-Cabo, F.Palau-Martinez. [Autosomal recessive cerebellar ataxias. Their classification, genetic features and pathophysiology.], *Rev Neurol.* 41 (2005) 409-422.
- [49] M.T.Dotti, A.Rufa, A.Federico. Cerebrotendinous xanthomatosis: heterogeneity of clinical phenotype with evidence of previously undescribed ophthalmological findings, *J Inherit Metab Dis.* 24 (2001) 696-706.
- [50] F.Barkhof, A.Verrips, P.Wesseling, M.S.van der Knaap, B.G.Van Engelen, F.J.Gabreels, A.Keyser, R.A.Wevers, J.Valk. Cerebrotendinous xanthomatosis: the spectrum of imaging findings and the correlation with neuropathologic findings, *Radiology.* 217 (2000) 869-876.
- [51] J.J.Cali, C.L.Hsieh, U.Francke, D.W.Russell. Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis, *J Biol Chem.* 266 (1991) 7779-7783.
- [52] V.M.Berginer, D.Abeliovich. Genetics of cerebrotendinous xanthomatosis (CTX): an autosomal recessive trait with high gene frequency in Sephardim of Moroccan origin, *Am J Med Genet.* 10 (1981) 151-157.
- [53] R.Navon. Molecular and clinical heterogeneity of adult GM2 gangliosidosis, *Dev Neurosci.* 13 (1991) 295-298.

- [54] A.Barbeau, L.Plasse, T.Cloutier, S.Paris, M.Roy. Lysosomal enzymes in ataxia: discovery of two new cases of late onset hexosaminidase A and B deficiency (adult Sandhoff disease) in French Canadians, *Can J Neurol Sci.* 11 (1984) 601-606.
- [55] H.Nakai, M.G.Byers, N.J.Nowak, T.B.Shows. Assignment of beta-hexosaminidase A alpha-subunit to human chromosomal region 15q23---q24, *Cytogenet Cell Genet.* 56 (1991) 164.
- [56] O.Neudorfer, G.M.Pastores, B.J.Zeng, J.Gianutsos, C.M.Zaroff, E.H.Kolodny. Late-onset Tay-Sachs disease: phenotypic characterization and genotypic correlations in 21 affected patients, *Genet Med.* 7 (2005) 119-123.
- [57] L.Peleg, M.Karpati, E.Gazit, A.Raas-Rothschild, B.Goldman. Mutations of the hexosaminidase A gene in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews, *Biochem Med Metab Biol.* 52 (1994) 22-26.
- [58] E.M.Prence, C.A.Jerome, B.L.Triggs-Raine, M.R.Natowicz. Heterozygosity for Tay-Sachs and Sandhoff diseases among Massachusetts residents with French Canadian background, *J Med Screen.* 4 (1997) 133-136.
- [59] A.M.Laberge, J.Michaud, A.Richter, E.Lemyre, M.Lambert, B.Brais, G.Mitchell. Population history and its impact on medical genetics in Quebec, *Clin Genet.* 68 (2005) 287-301.
- [60] A.M.Laberge. [Prevalence and distribution of genetic diseases in Quebec: impact of the past on the present], *Med Sci (Paris).* 23 (2007) 997-1001.
- [61] R.K.Naviaux, K.V.Nguyen. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion, *Ann Neurol.* 55 (2004) 706-712.
- [62] K.V.Nguyen, F.S.Sharief, S.S.Chan, W.C.Copeland, R.K.Naviaux. Molecular diagnosis of Alpers syndrome, *J Hepatol.* 45 (2006) 108-116.

- [63] A.H.Hakonen, G.Davidzon, R.Salemi, L.A.Bindoff, G.G.Van, S.Dimauro, D.R.Thorburn, A.Suomalainen. Abundance of the POLG disease mutations in Europe, Australia, New Zealand, and the United States explained by single ancient European founders, *Eur J Hum Genet.* 15 (2007) 779-783.
- [64] M.J.Longley, M.A.Graziewicz, R.J.Bienstock, W.C.Copeland. Consequences of mutations in human DNA polymerase gamma, *Gene.* 354 (2005) 125-131.
- [65] A.H.Hakonen, S.Heiskanen, V.Juvonen, I.Lappalainen, P.T.Luoma, M.Rantamaki, G.V.Goethem, A.Lofgren, P.Hackman, A.Paetau, S.Kaakkola, K.Majamaa, T.Varilo, B.Udd, H.Kaariainen, L.A.Bindoff, A.Suomalainen. Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin, *Am J Hum Genet.* 77 (2005) 430-441.
- [66] H.Takashima, C.F.Boerkoel, J.John, G.M.Saifi, M.A.Salih, D.Armstrong, Y.Mao, F.A.Quiocho, B.B.Roa, M.Nakagawa, D.W.Stockton, J.R.Lupski. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy, *Nat Genet.* 32 (2002) 267-272.
- [67] H.Takashima. [Molecular genetics of inherited neuropathies], *Rinsho Shinkeigaku.* 46 (2006) 760-767.
- [68] J.M.Bomar, P.J.Benke, E.L.Slattey, R.Puttagunta, L.P.Taylor, E.Seong, A.Nystuen, W.Chen, R.L.Albin, P.D.Patel, R.A.Kittles, V.C.Sheffield, M.Burmeister. Mutations in a novel gene encoding a CRAL-TRIO domain cause human Cayman ataxia and ataxia/dystonia in the jittery mouse, *Nat Genet.* 35 (2003) 264-269.
- [69] L.G.Ball, W.Xiao. Molecular basis of ataxia telangiectasia and related diseases, *Acta Pharmacol Sin.* 26 (2005) 897-907.

- [70] O.Sanal, F.Ersoy, L.Yel, I.Tezcan, A.Metin, H.Ozyurek, S.Gariboglu, S.Fikrig, A.I.Berkel, G.T.Rijkers, B.J.Zegers. Impaired IgG antibody production to pneumococcal polysaccharides in patients with ataxia-telangiectasia, *J Clin Immunol.* 19 (1999) 326-334.
- [71] O.Sanal, F.Ozbas-Gerceker, L.Yel, F.Ersoy, I.Tezcan, A.I.Berkel, A.Metin, R.A.Gatti. Defective anti-polysaccharide antibody response in patients with ataxia-telangiectasia, *Turk J Pediatr.* 46 (2004) 208-213.
- [72] H.H.Chun, R.A.Gatti. Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype, *DNA Repair (Amst).* 3 (2004) 1187-1196.
- [73] S.G.Becker-Catania, G.Chen, M.J.Hwang, Z.Wang, X.Sun, O.Sanal, E.Bernatowska-Matuszkiewicz, L.Chessa, E.Y.Lee, R.A.Gatti. Ataxia-telangiectasia: phenotype/genotype studies of ATM protein expression, mutations, and radiosensitivity, *Mol Genet Metab.* 70 (2000) 122-133.
- [74] T.Foroud, S.Weil, Y.Ziv, E.Sobel, E.Lange, A.Chao, T.Goradia, Y.Huo, A.Tolun, L.Chessa, P.Charmley, O.Sanal, N.Salman, C.Julier, P.Concannon, C.McConville, A.M.Taylor, Y.Shiloh, S.K.Lange, R.A.Gatti. Localization of an ataxia-telangiectasia locus to a 3-cM interval on chromosome 11q23: linkage analysis of 111 families by an international consortium, *Am J Hum Genet.* 49 (1991) 1263-1279.
- [75] E.Sobel, E.Lange, N.G.Jaspers, L.Chessa, O.Sanal, Y.Shiloh, A.M.Taylor, C.M.Weemaes, K.Lange, R.A.Gatti. Ataxia-telangiectasia: linkage evidence for genetic heterogeneity, *Am J Hum Genet.* 50 (1992) 1343-1348.
- [76] A.Ito, T.Yamagata, M.Mori, M.Y.Momoi. Early-onset ataxia with oculomotor apraxia with a novel APTX mutation, *Pediatr Neurol.* 33 (2005) 53-56.

- [77] C.Tranchant, M.Fleury, M.C.Moreira, M.Koenig, J.M.Warter. Phenotypic variability of aprataxin gene mutations, *Neurology*. 60 (2003) 868-870.
- [78] M.C.Moreira, S.Klur, M.Watanabe, A.H.Nemeth, B.Le, I, J.C.Moniz, C.Tranchant, P.Aubourg, M.Tazir, L.Schols, M.Pandolfo, J.B.Schulz, J.Pouget, P.Calvas, M.Shizuka-Ikeda, M.Shoji, M.Tanaka, L.Izatt, C.E.Shaw, A.M'Zahem, E.Dunne, P.Bomont, T.Benhassine, N.Bousslam, G.Stevanin, A.Brice, J.Guimaraes, P.Mendonca, C.Barbot, P.Coutinho, J.Sequeiros, A.Durr, J.M.Warter, M.Koenig. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2, *Nat Genet*. 36 (2004) 225-227.
- [79] G.S.Stewart, R.S.Maser, T.Stankovic, D.A.Bressan, M.I.Kaplan, N.G.Jaspers, A.Raams, P.J.Byrd, J.H.Petrini, A.M.Taylor. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder, *Cell*. 99 (1999) 577-587.
- [80] D.Delia, M.Piane, G.Buscemi, C.Savio, S.Palmeri, P.Lulli, L.Carlessi, E.Fontanella, L.Chessa. MRE11 mutations and impaired ATM-dependent responses in an Italian family with ataxia-telangiectasia-like disorder, *Hum Mol Genet*. 13 (2004) 2155-2163.
- [81] M.Fernet, M.Gribaa, M.A.Salih, M.Z.Seidahmed, J.Hall, M.Koenig. Identification and functional consequences of a novel MRE11 mutation affecting 10 Saudi Arabian patients with the ataxia telangiectasia-like disorder, *Hum Mol Genet*. 14 (2005) 307-318.
- [82] A.H.Hakonen, S.Goffart, S.Marjavaara, A.Paetau, H.Cooper, K.Mattila, M.Lampinen, A.Sajantila, T.Lonnqvist, J.N.Spelbrink, A.Suomalainen. Infantile-onset spinocerebellar ataxia and mitochondrial recessive ataxia syndrome are associated with neuronal complex I defect and mtDNA depletion, *Hum Mol Genet*. 17 (2008) 3822-3835.

- [83] K.Nikali, J.Isosomppi, T.Lonnqvist, J.I.Mao, A.Suomalainen, L.Peltonen. Toward cloning of a novel ataxia gene: refined assignment and physical map of the IOSCA locus (SCA8) on 10q24, *Genomics*. 39 (1997) 185-191.
- [84] A.H.Hakonen, P.Isohanni, A.Paetau, R.Herva, A.Suomalainen, T.Lonnqvist. Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion, *Brain*. 130 (2007) 3032-3040.
- [85] A.K.Anttonen, E.Siintola, L.Tranebjaerg, N.K.Iwata, E.K.Bijlsma, H.Meguro, Y.Ichikawa, J.Goto, O.Kopra, A.E.Lehesjoki. Novel SIL1 mutations and exclusion of functional candidate genes in Marinesco-Sjogren syndrome, *Eur J Hum Genet*. 16 (2008) 961-969.
- [86] S.Schulz, S.Vielhaber, P.Muschke, K.Mohnike, R.Gooding, P.Wieacker. Congenital cataract, ataxia, external ophthalmoplegia and dysphagia in two siblings. A Marinesco-Sjogren-like syndrome, *Neuropediatrics*. 38 (2007) 88-90.
- [87] M.Eriguchi, H.Mizuta, K.Kurohara, J.Fujitake, Y.Kuroda. Identification of a new homozygous frameshift insertion mutation in the SIL1 gene in 3 Japanese patients with Marinesco-Sjogren syndrome, *J Neurol Sci*. 270 (2008) 197-200.
- [88] L.Kalaydjieva. Congenital cataracts-facial dysmorphism-neuropathy, *Orphanet J Rare Dis*. 1 (2006) 32.
- [89] L.Merlini, R.Gooding, H.Lochmuller, W.Muller-Felber, M.C.Walter, D.Angelicheva, B.Talim, J.Hallmayer, L.Kalaydjieva. Genetic identity of Marinesco-Sjogren/myoglobinuria and CCFDN syndromes, *Neurology*. 58 (2002) 231-236.
- [90] R.W.Bouchard, J.P.Bouchard, R.Bouchard, A.Barbeau. Electroencephalographic findings in Friedreich's ataxia and autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS), *Can J Neurol Sci*. 6 (1979) 191-194.



- [91] J.C.Engert, P.Berube, J.Mercier, C.Dore, P.Lepage, B.Ge, J.P.Bouchard, J.Mathieu, S.B.Melancon, M.Schalling, E.S.Lander, K.Morgan, T.J.Hudson, A.Richter. ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF, *Nat Genet.* 24 (2000) 120-125.
- [92] A.Richter, J.D.Rioux, J.P.Bouchard, J.Mercier, J.Mathieu, B.Ge, J.Poirier, D.Julien, G.Gyapay, J.Weissenbach, T.J.Hudson, S.B.Melancon, K.Morgan. Location score and haplotype analyses of the locus for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay, in chromosome region 13q11, *Am J Hum Genet.* 64 (1999) 768-775.
- [93] C.M.Gomez. ARSACS goes global, *Neurology.* 62 (2004) 10-11.
- [94] Y.Bouhlal, G.El Euch-Fayeche, F.Hentati, R.Amouri. A Novel SACS Gene Mutation in a Tunisian Family, *J Mol Neurosci.* (2009).
- [95] J.Breckpot, Y.Takiyama, B.Thienpont, V.S.Van, J.R.Vermeesch, E.Ortibus, K.Devriendt. A novel genomic disorder: a deletion of the SACS gene leading to spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay, *Eur J Hum Genet.* 16 (2008) 1050-1054.
- [96] C.Criscuolo, S.Banfi, M.Orio, P.Gasparini, A.Monticelli, V.Scarano, F.M.Santorelli, A.Perretti, L.Santoro, M.G.De, A.Filla. A novel mutation in SACS gene in a family from southern Italy, *Neurology.* 62 (2004) 100-102.
- [97] C.Criscuolo, F.Sacca, M.G.De, P.Mancini, O.Combarros, J.Infante, A.Garcia, S.Banfi, A.Filla, J.Berciano. Novel mutation of SACS gene in a Spanish family with autosomal recessive spastic ataxia, *Mov Disord.* (2005).
- [98] B.M.De, F.Giasson, J.Mathieu, M.Roy, J.P.Bouchard, K.Morgan. Genetic epidemiology of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay in northeastern Quebec, *Genet Epidemiol.* 10 (1993) 17-25.

- [99] G.El Euch-Fayache, I.Lalani, R.Amouri, I.Turki, K.Ouahchi, W.Y.Hung, S.Belal, T.Siddique, F.Hentati. Phenotypic features and genetic findings in sascin-related autosomal recessive ataxia in Tunisia, *Arch Neurol.* 60 (2003) 982-988.
- [100] A.Garcia, C.Crisuolo, M.G.De, J.Berciano. Neurophysiological study in a Spanish family with recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay, *Muscle Nerve.* 37 (2008) 107-110.
- [101] G.S.Grieco, A.Malandrini, G.Comanducci, V.Leuzzi, M.Valoppi, A.Tessa, S.Palmeri, L.Benedetti, A.Pierallini, S.Gambelli, A.Federico, F.Pierelli, E.Bertini, C.Casali, F.M.Santorelli. Novel SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay type, *Neurology.* 62 (2004) 103-106.
- [102] K.Hara, O.Onodera, M.Endo, H.Kondo, H.Shiota, K.Miki, N.Tanimoto, T.Kimura, M.Nishizawa. Sascin-related autosomal recessive ataxia without prominent retinal myelinated fibers in Japan, *Mov Disord.* 20 (2005) 380-382.
- [103] S.Kamada, S.Okawa, T.Imota, M.Sugawara, I.Toyoshima. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS): novel compound heterozygous mutations in the SACS gene, *J Neurol.* 255 (2008) 803-806.
- [104] H.J.McMillan, M.T.Carter, P.J.Jacob, E.E.Laffan, M.D.O'Connor, K.M.Boycott. Homozygous contiguous gene deletion of 13q12 causing LGMD2C and ARSACS in the same patient, *Muscle Nerve.* 39 (2009) 396-399.
- [105] Y.Ouyang, K.Segers, O.Bouquiaux, F.C.Wang, N.Janin, C.Andris, H.Shimazaki, K.Sakoe, I.Nakano, Y.Takiyama. Novel SACS mutation in a Belgian family with sascin-related ataxia, *J Neurol Sci.* 264 (2008) 73-76.

- [106] Y.Ouyang, Y.Takiyama, K.Sakoe, H.Shimazaki, T.Ogawa, S.Nagano, Y.Yamamoto, I.Nakano. Sacsin-related ataxia (ARSACS): expanding the genotype upstream from the gigantic exon, *Neurology*. 66 (2006) 1103-1104.
- [107] A.M.Richter, R.K.Ozgul, V.C.Poisson, H.Topaloglu. Private SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) families from Turkey, *Neurogenetics*. 5 (2004) 165-170.
- [108] Y.Takiyama. Sacsinopathies: sacsin-related ataxia, *Cerebellum*. (2007) 1-7.
- [109] S.Vermeer, R.P.Meijer, B.J.Pijl, J.Timmermans, J.R.Cruysberg, M.M.Bos, H.J.Schelhaas, B.P.Van de Warrenburg, N.V.Knoers, H.Scheffer, B.Kremer. ARSACS in the Dutch population: a frequent cause of early-onset cerebellar ataxia, *Neurogenetics*. 9 (2008) 207-214.
- [110] N.Dupre, F.Gros-Louis, N.Chrestian, S.Verreault, D.Brunet, V.D.de, B.Brais, J.P.Bouchard, G.A.Rouleau. Clinical and genetic study of autosomal recessive cerebellar ataxia type 1, *Ann Neurol*. 62 (2007) 93-98.
- [111] Q.Zhang, C.Bethmann, N.F.Worth, J.D.Davies, C.Wasner, A.Feuer, C.D.Ragnauth, Q.Yi, J.A.Mellad, D.T.Warren, M.A.Wheeler, J.A.Ellis, J.N.Skepper, M.Vorgerd, B.Schlotter-Weigel, P.L.Weissberg, R.G.Roberts, M.Wehnert, C.M.Shanahan. Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity, *Hum Mol Genet*. 16 (2007) 2816-2833.

## **CHAPITRE II:**

**CARACTÉRISATION CLINIQUE ET GÉNÉTIQUE  
D'UNE NOUVELLE FORME D'ATAXIE DANS LA  
POPULATION QUÉBÉCOISE: IDENTIFICATION  
DU LOCUS D'UNE NOUVELLE FORME D'ATAXIE  
SPASTIQUE AVEC LEUCOENCÉPHALOPATHIE  
SUR LE CHROMOSOME 2Q33-34**

## Contribution des co-auteurs

**I. Thiffault** a participé à toutes les étapes du projet; soit le recrutement des patients, l'extraction d'ADN, ARN, culture cellulaire, génotypage de toutes les familles, études de liaison génétique, bioinformatique, séquençage des gènes candidats qui a abouti à l'identification du locus de la maladie. Elle a produit majoritairement les figures, tables et l'écriture de l'article.

**M.F. Rioux** a participé au recrutement des patients et à la caractérisation clinique des cas.

**M. Tétreault** a participé au génotypage, à l'étude de liaison génétique et à la révision du manuscrit.

**J. Jarry** a participé au génotypage, à l'étude de liaison génétique et à la révision du manuscrit.

**L. Loisel** a participé au recrutement des patients et à la collecte des informations généalogiques.

**J. Poirier** a participé au génotypage des familles lors de l'exclusion des formes connues d'ataxies.

**F. Gros-Louis** a participé à l'exclusion du gène ALS2 et de l'ataxie de Beauce (ARCA1).

**J. Mathieu** a participé au recrutement des patients et à la caractérisation clinique des cas.

**M. Vanasse** a participé au recrutement des patients et la caractérisation clinique des cas.

**GA. Rouleau** a participé au recrutement des patients.

**JP. Bouchard** a participé au recrutement des patients et la caractérisation clinique des cas.

**J. Lesage** a participé à la caractérisation radiologique des cas (révision des IRM).

**B. Brais** a supervisé toutes les étapes du projet, le recrutement de la cohorte, la caractérisation des patients et l'élaboration du manuscrit.

## **A new locus for autosomal recessive spastic ataxia associated with frequent white matter changes maps to 2q33-34**

I. Thiffault<sup>1</sup>, M.F. Rioux<sup>1 2</sup>, M. Tetreault<sup>1</sup>, J. Jarry<sup>1</sup> L. Loiselle<sup>1</sup>, J. Poirier<sup>1</sup>, F. Gros-Louis<sup>1</sup>, J. Mathieu<sup>3</sup>, M. Vanasse<sup>4</sup>, GA. Rouleau<sup>1</sup>, JP. Bouchard<sup>5</sup>, J. Lesage<sup>6</sup>, and B. Brais<sup>1 3 4</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de neurogénétique Center for the study of brain diseases  
Centre de recherche du CHUM Montreal QC Canada

<sup>2</sup> Service de neurologie Centre hospitalier de l'Université de Sherbrooke  
Sherbrooke QC Canada

<sup>3</sup> Clinique des maladies neuromusculaires Carrefour de la Santé de  
Jonquière Saguenay QC Canada

<sup>4</sup> Clinique des maladies neuromusculaires Centre de réadaptation Marie  
Enfant CHU Mère Enfant Sainte-Justine Montreal QC Canada

<sup>5</sup> Service de neurologie Hôpital de l'Enfant-Jesus Université Laval  
Quebec Qc Canada

<sup>6</sup> Radiology Department Centre hospitalier de l'Université de Montréal  
Montreal QC Canada

---

Publication: A new autosomal recessive spastic ataxia associated with frequent white matter changes maps to 2q33-34. Thiffault I, Rioux MF, Tetreault M, Jarry J, Loiselle L, Poirier J, Gros-Louis F, Mathieu J, Vanasse M, Rouleau GA, Bouchard JP, Lesage J, Brais B. Brain. 2006 Sep; 129(Pt 9):2332-40.

## SUMMARY

Recessive ataxias are a heterogeneous group of diseases. We identified a group of 23 French–Canadian cases belonging to 17 families affected by an autosomal recessive spastic ataxia associated with frequent white matter changes. The fact that 59% of these families have a genealogical relationship to the Portneuf County of Quebec suggests that this is a new form of ataxia with a regional founder effect. All cases present with cerebellar ataxia and spasticity. There is great intrafamilial and interfamilial variability, as illustrated by the spectrum of age of diagnosis (range: 2–59 years, mean: 15.0) and the presence of white matter changes on MRI in 52.4% of cases. The more severe cases have spasticity from birth, scoliosis, dystonia and cognitive impairment and were considered cases of cerebral palsy. Brain MRI constantly shows cerebellar atrophy, which in some cases may be associated with cortical atrophy, leucoencephalopathy and corpus callosum thinning. A genome wide scan uncovered linkage of three families to marker D2S2321 localized on chromosome 2q33–34. Linkage analysis confirmed that all families are linked to the same region [multipoint log of the odds (LOD) score of 5.95]. Haplotype analysis and allele sharing suggest that one common mutation may account for 97% of carrier chromosomes in Quebec. The uncovering of the mutated gene may point to a common pathway for pyramidal and cerebellar degeneration as both are often observed in recessive ataxias and complicated paraplegias.

Key Words: spastic ataxia; paraplegia; founder effect; linkage; genome-wide-scan

## INTRODUCTION

Recessive ataxias are a heterogeneous group of neurodegenerative diseases. To date, the mutated genes for 10 recessive ataxias have been uncovered and two others have been mapped [1]. The combination of pyramidal and cerebellar signs has been observed in a few recessive ataxias, complicated paraplegias, leucodystrophies and cerebral palsy [2-4]. Spasticity has been observed in particular in the following well-characterized recessive ataxias: Friedreich ataxia (*FRDA*), spastic ataxia of Charlevoix–Saguenay (ARSACS) [5] and to a lesser extent in ataxia with vitamin E deficiency (AVED) [2]. In the French–Canadian population, *FRDA* and ARSACS are the most common forms of spastic ataxias. *FRDA* in French–Canadians has been associated with a regional cluster in the Rimouski area [6], though *FRDA* cases are found in all regions of Quebec and in the Acadian populations of New Brunswick and Nova Scotia [7;8]. On the other hand, cases of ARSACS, as its name implies, originate most often from the Charlevoix and Saguenay regions. This being said, both conditions are present in several other populations [9-13]. In our study of recessive ataxias in Quebec we initially focused on cases of spastic ataxia with a distinct phenotype from *FRDA* and ARSACS that frequently have a genealogical relationship with the Portneuf County of Quebec. The geographical clustering to this small region of Quebec, known for a genetic founder effect for Tay-Sachs [14] raised the possibility that at least one other form of recessive spastic ataxia is prevalent in the French–Canadian population. To test this hypothesis we collected additional families with Portneuf ancestry to gather a more homogeneous group to facilitate linkage analysis. We also recruited other autosomal recessive spastic ataxia families not affected by *FRDA* and ARSACS without a known relationship with Portneuf County. This paper describes the variable clinical features and the identification of a novel locus for an autosomal recessive spastic ataxia frequently associated with leucoencephalopathy (ARSAL) on chromosome 2q33–34.



## **SUBJECTS AND METHODS**

### **Clinical evaluation**

Relying on a network of Ataxia and Neuromuscular clinics that cater to more than 500 ataxic patients we were able to identify 17 different Quebec kindreds (Figure 1) presenting a spastic ataxia. The initial recruitment phase included spastic ataxia families with a genealogical relationship to Portneuf region in the second step we included all patients with spastic ataxia that were shown not to be carrying mutation for *FRDA* and *ARSACS*. Mutation analysis was performed if they were not previously tested. All probands and family members underwent a detailed neurological examination by experienced neurologists. In addition to an extensive clinical evaluation most probands underwent the following complementary biochemical screening tests: blood and urine amino acids vitamin B and E levels serum lactate-pyruvate ratio long-chain fatty acids and electromyographic (EMG) studies. All medical records and imaging were reviewed. A total of 21 of the 23 affected individuals underwent cranial MRI using standard methods in different radiology departments. All MRI were reviewed by a senior neuroradiologist (JL). This project was approved by institutional Ethics Committee of the Centre de recherche du CHUM. Informed consent was obtained from all patients and all participant living family members.

### **Exclusion of known disease loci overlapping with ARSAL phenotype by mutation and linkage analysis**

Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using standard methods. Screening for the *FRDA* (GAA) n mutation and the two common mutations of *ARSACS* in Quebec were performed on all cases. Genetic analyses were also performed in the majority of *ARSAL* patients for dominant CAG expansions in *SCA1* *SCA3* *SCA6* *SCA7* *SCA8* *SCA12* *SCA17* and *DRPL*. Candidate gene genotyping and linkage was performed using selected polymorphic STR markers surrounding 7 loci or genes for recessive spastic

ataxia or other disorders which phenotype overlap with ARSAL: *FRDA* locus (9q13.3 9p23); Spastic paraplegia 5B (8p12); ARSACS locus(13q12); Spastic paraplegia 11 (15q13); Huntington disease-like 3 (*HDL3*) (4p15.3); Sodium channel modifier (*SCNM1*) gene (1q21); Spinocerebellar ataxia with blindness/deafness (*SCABD*) locus (6p23); and EIF2B5 gene (3q27). Markers were selected using the UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu> May 2004 assembly).

### **Genome-wide scan and linkage analyses**

A genome wide scan of 500 markers from the deCODE Linkage Mapping Set was conducted at deCODE Genetics (Reykjavik Iceland) on fourteen samples from families B, C and E. Fine mapping was performed using primer sequences of polymorphic markers obtained from deCODE and Marshfield genetic maps. PCR reactions were performed using 20 ng genomic DNA in 8 µl PCR reactions containing 1XPCR reaction buffer 3 nM MgCl<sub>2</sub> 10 µM primer mix and 0.4 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, ON., Canada). Amplification conditions were obtained from the Genome database ([www.gdb.org](http://www.gdb.org)). PCR products were amplified for allele-size analysis by adding 4 µl of STOP loading buffer to each sample followed by a denaturing step of 5 min at 95°C and final loading of 2 µl onto a 64-lane 6% acrylamide gel containing 6M urea. Data acquisition and analyses was performed using a Li-Cor 4100 automated DNA sequencer using BaseImagIR v.4.0 software (Li-Cor ON Canada).

Two-point and multipoint linkage analyses were performed using FASTLINK v.2.0 and GENEHUNTER v.2.1. Markers order and genetics distances were based on the deCODE genetic map and UCSC (<http://genome.ucsc.edu> May 2004 assembly) physical map. The haplotypes were reconstructed in a single section using the MAXPROB method of Genehunter v.2.1. The resulting haplotypes were imported into Cyrillic v.2.0. For the candidate regions and the fine mapping analyses all markers were analyzed assuming equal allele frequencies. The ARSAL phenotype was analyzed as an autosomal recessive trait with complete penetrance of 100% based on the observed pattern of

affected individuals within the cohort and with an estimate disease gene frequency of 0.001. No phenocopies were incorporated into the analysis.

### **Exclusion of candidate genes and analysis of putative triplet expansions**

We selected seven candidate genes *HSP60 HSP10 ALSIN EEF1B2 NRP2 NDUFS1* (entire coding and a minimum of 30 bp of intronic flanking sequences) and *GAD1* (exons 1 2 4 and 6) for mutation analysis. Primers used to amplify exonic and flanking sequences were designed using ExonPrimer tool from UCSC website (<http://ihg.gsf.de>). *HSP60 HSP10 ALSIN EEF1B2 NRP2* and *NDUFS1* genes were also investigated for mutations in alternative exons promoter 3' and 5' UTR using Primer3 to design oligonucleotides (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>). All designed primer sequences and PCR conditions were provided by the UCSC genome browser or general primer3 conditions set up. Large exons were divided into overlapping fragments. Oligonucleotide primers were synthesized by Invitrogen (Burlington ON Canada). The PCR products and primer pairs were sent to the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre for forward and reverse sequencing. Sequences were aligned using SeqMan 4.03 (DNASStar Wisconsin USA) and analyzed using Chromas 1.62 (Technelysium Pty Ltd Australia). We also investigate six trinucleotide-repeat regions for putative expansions using oligonucleotide pairs designed using Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>). Oligonucleotide primers were synthesized by Invitrogen (Burlington ON Canada) and amplification/visualization were performed as described in the previous section. The repeated sequences screened for expansions and their chromosomal localization were identified using UCSC RepeatMasker (<http://genome.ucsc.edu>) and are available in supplementary Table 1. Western blot analysis was done using protein extracted from lymphoblastoid cell lines generated from affected patients. Each blot was probed with polyclonal antibodies specific for ALSIN protein (provided by G.A. Rouleau's lab).

## RESULTS

### Clinical features of the French-Canadian ARSAL cohort

A total of 23 patients belonging to 17 families with spastic ataxia were recruited. Phenotype segregation in pedigrees strongly suggests an autosomal recessive mode of inheritance (Figure 1). None of the parents were known to be related or share family names. However ten of the seventeen families (59%) have a known genealogical relationship with the Portneuf County (a 4 098 km<sup>2</sup> region south of Quebec City). As shown on table 1 all cases demonstrated ataxic gait spasticity and hyperreflexia. The age of diagnosis is extremely variable (mean 15.0 years range 2-59 years). The milder cases report that they were always less coordinated than their classmates and had leg stiffness in their youth. The majority of cases (57%) have urinary urgency. These symptoms respond well in all cases treated to anticholinergic medications. Other clinical features include: ataxic and spastic dysarthria (74%) dystonic positioning (57% including hemidystonia in one of the more severe cases) mild horizontal nystagmus (44%) scoliosis (35%) and optic atrophy with cataract in two older patients (8.7% cases 3 and 4) and mild hearing impairment (13% cases 1 14 and 20). Though formal neuropsychological evaluations were not performed ten cases seem to have mild cognitive impairment (44%).

One of the most remarkable features of ARSAL is the extreme variability in the severity of the phenotype between siblings and cases from different families (Table 1). For instance case 4 from family B has been wheelchair bound since the age of 19 while his 3-years younger brother 3 has been using a wheelchair only since the age of 51. Their sister 5 which has an intermediate presentation compare to her brothers has been using a wheelchair since the age of 45. Therefore not only the age of diagnosis is variable but the impact on walking is different with 35% of participant not needing technical aid to walk. In the more severe cases scoliosis (35%) dystonia (52%) and mild cognitive impairment (44%) are also present to a

variable degree. The severity of involvement may correlate with the extended of white matter changes observed on MRI.

Brain MRI of 21 participants was reviewed by an experienced neuroradiologist (JL). One participant died before getting an MRI while it was not requested for case 11 because of her young age. Imaging demonstrated cerebellar atrophy in all patients (100%) (Table 2). The cerebellar atrophy involves proportionally the vermis and the cerebellar hemispheres and is moderate to severe. Nine patients (42.9%) also show mild to moderate cerebral atrophy in four patients the atrophy is more fronto-parietal and in four patients the atrophy is more parieto-occipital. Corpus callosum atrophy was only observed in Family B (Figure 2 A and C). Eleven patients (52.4%) show white matter changes on T2-weighted and FLAIR sequences on brain MRI (Figure 2). These changes range from diffuse periventricular T2-hyperintensities to mild punctiform T2-hyperintensities localized in periventricular deep white matter or juxtacortical white matter (Figure 2 B and D). Only two patients had white matter changes in the cerebellum and brainstem and one patient had white matter changes in the corpus callosum (Figure 2 B). Abnormal hyperintense signals of the white matter on T2 were observed only in some of the oldest patients with a mean age of 46.2 years (ranging from 13 to 59 years). No correlation between the presence of white matter changes and the age of onset was noted. The mean age of onset of patients with leukoencephalopathy is 15.8 years old. However cognitive disabilities seem to be more frequently observed with white matter changes: six patients with cognitive disabilities (54.6%) showed small to diffuse hyperintense signals of the white matter.

### **Exclusion of known loci and Genome-wide scan analysis to uncover the genetic locus of ARSAL**

Exclusion of mutations in FRDA and ARSACS and linkage to disease loci with phenotype overlapping with ARSAL was undertaken using DNA extracted from peripheral blood lymphocytes. GAA triplet expansion causing FRDA and the two most common ARSACS mutations in French-Canadians was excluded in our cohort. Genetic analyses were also performed in the majority of the patients for dominant CAG expansions in SCA1 SCA3 SCA6 SCA7 SCA8 SCA12 SCA17 and DRPL. None of the candidate gene/disease loci (*FRDA*; Spastic paraplegia 5B; ARSACS; Spastic paraplegia 11; Huntington disease-like 3; *SCNM1*; *SCABD*; and *EIF2B5*) showed positive linkage in ARSAL pedigrees (data not shown).

Fourteen DNA samples from affected and unaffected patients belonging to three unrelated ARSAL families (Families B C and E) two with both parents originating from Portneuf county (families B and E) and the grand mother in family C were sent to deCODE genetics (Reykjavik Iceland) for a Genome-Wide Screen (GWS). Multipoint LOD scores greater than 1 were obtained for 3 loci centered on markers D2S2321 D14S1043 and D17S1832 (data not shown). The highest LOD score value of 2.08 was observed for D2S2321. Genotyping of our full set of 17 families with 23 additional polymorphic markers spanning 49-cM (supplementary table 1) confirmed linkage to a 11-cM region on chromosome 2q33-34. Maximum multipoint LOD score value of 5.75 (Figure 3) was obtained for eight markers (D2S318 D2S273 GATA149B10 D2S1384 D2S1782 D2S2178 D2S1369 and D2S1385). As shown on Table 2 allele and haplotype sharing between families suggest that few ARSAL chromosomes carrying mutations are present in our cohort. The different shared haplotypes among the two carrier chromosomes in families E H and I favors the existence of at least two predominant mutations in our cohort (Table 3). Haplotype analysis suggests that the absence of allele 3 of marker D2S1384 in family A could be due to a historical recombination thus defining marker D2S1384 as the centromeric marker. On the telomeric side the

absence of allele 1 of marker D2S2274 in family C could be due to a historical recombination thus establishing D2S2274 as the other flanking marker. This defines a 3.33cM (3.23Mb) candidate interval based on the deCODE map (Table 2).

### **Genomic analysis of the candidate interval and sequencing of candidate genes**

Considering that ARSAL demonstrates intrafamilial and interfamilial variability this raises the possibility that the causal mutations might be due to a triplet repeat expansions. Therefore prior to sequencing candidate genes we identified all such repeat sequences in the candidate region and screened six for expansions in our families. No size difference was observed for the six different repeat sequences investigated including a GAA repeat (supplementary table).

Mutation analysis has been performed in parallel with the fine mapping analysis. The prior candidate interval of 11-cM contains numerous known neurological disease loci (Table 3) some of which have phenotype overlap with ARSAL. The *ALSIN* *HSP60* *HSP10* *EEF1B2* *GAD1* *NRP2* and *NDUFS1* genes are among the best candidates based on their biological functions and expression patterns. Furthermore some of them have been associated with neurodegenerative disorders with some clinical similarities with ARSAL. The clinical overlap between infantile ascending hereditary spastic paralysis (IAHSP) and to a lesser extent ALS2 encouraged us to complete an extensive analysis of the *ALSIN* gene and protein. The *HSP60* gene mutated in dominant uncomplicated form of spastic paraplegia type 13 (SPG13) also lies in the region [Fontaine et al. 2000]. The eukaryotic translation elongation factor 1 (*EEF1B2*) gene was a promising candidate because mutations in the five subunits of eukaryotic translation elongation factor 2 (*EIF2B*) have been found to cause recessive leukodystrophies accompanied by spasticity [15;16]. Also of particular interest the glutamate decarboxylase 1 (*GAD1*) gene has been found to be mutated in an autosomal recessive symmetrical spastic cerebral palsy [17] We sequenced the entire coding and flanking intronic sequences of

*ALSIN HSP60 HSP10 EEF1B2 NRP2* and *NDUFS1* using reverse and forward primers. We also sequenced the 5' UTR 3'UTR and alternative exons (UCSC Exoniphy) of *ALSIN EEF1B2 NRP2* and *NDUFS1*. Western blot analysis using N-term and C-term antibodies for ALSIN protein from lymphoblast shown the presence of the proteins of normal size in four participants tested (data not shown). We only sequenced the exonic regions (1 2 4 and 6) of *GAD1* containing reported mutations or variants. Mutation analysis revealed no mutation in six ARSAL cases carrying four different haplotypes. In addition the later candidate interval of 3.33-cM support the sequencing result suggesting that ARSAL pathogenesis is unlikely due to mutation(s) in one of those candidate genes.



## CONCLUSION

ARSAL is a complex form of autosomal recessive spastic ataxia with clinical and radiological overlap with other neurological disorders. We chose to refer this new disease entity as a spastic ataxia rather than a complicated spastic paraplegia because ataxic features and cerebellar atrophy are constant features in all patients. ARSAL can be distinguished clinically from FRDA by the increased deep tendon reflexes the absence of a peripheral neuropathy the absence of a cardiomyopathy the frequent presence of white matter changes on MRI and the usually less severe phenotype. The absence of a polyneuropathy and the limited ocular movement abnormalities also help to distinguish ARSAL from ARSACS and SCAN1 [2]. The absence of hypermyelinated retinal nerve fibers and the frequent white matter changes observed on MRI help distinguish it from ARSACS. The most helpful ancillary test in suspected cases of ARSAL is the MRI in particular T2-weighted and FLAIR sequences which when they demonstrate white matter changes favour the diagnosis of ARSAL. Observed white matter changes are not typical of multiple sclerosis (MS) they not being ovoid periventricular lesions oriented perpendicularly to the long axis of the brain and lateral ventricles (Dawson's fingers) as observed in more than 85% of MS patients. Only patient 4 has T2-hyperintensities in the corpus callosum which is frequently found in 50-90% of patients with clinically definite MS [18]. The two patients belonging to Family B which have diffuse periventricular white matter T2-hyperintensities with a posterior distribution evoke changes that can be observed in some childhood leukodystrophies. Both siblings were tested negative for very-long-chain fatty acids. As we will discuss below it is possible that some of the cases described in the literature of complicated spastic paraplegias accompanied by cerebellar atrophy and white matter changes and not found to be caused by *ALSIN* mutations could be cases of ARSAL [19-22]. The variable severity in the ARSAL phenotype and possible lower prevalence in other populations may have hampered its earlier definite description. The observed initial regional clustering of ARSAL cases in the county of Portneuf and the early observation of significant intrafamilial variability allowed us to group cases with such

different degree of involvement. Together these two observations led to the recruitment of sufficient large cohort to map the ARSAL locus to chromosome 2q33-34.

The mapping of the French-Canadian ARSAL families in the region of the ALS2 locus raised the possibility that mutation in the *ALS1N* gene could also be responsible for this new ataxia with upper motor neuron (UMN) involvement. Clinically ARSAL cases are quite different from ALS2/primary lateral sclerosis cases by the absence of lower motor neuron (LMN) signs and the presence of cerebellar signs and atrophy on MRI. No ALS proven cases of ALS2 were reported to have cerebellar atrophy or white matter changes on MRI [23-25]. Only one *ALS1N* mutation proven case with infantile ascending hereditary spastic paralysis (IAHSP) was found to have mild vermian atrophy on MRI [26]. However in this latter study as in ARSAL the four families with *ALS1N* mutations were described as having mild periventricular white matter change on T2-weighted sequences in the parieto-occipital regions while two out of four also had similar lesions in their internal capsules. Interestingly cases with similar IAHSP phenotype from six different families that are likely to be link to the same region were not found to harbour *ALS1N* mutations. This suggests that either mutations in the non-coding sequence of *ALS1N* still need to be uncovered or another gene in the region may also be responsible for an IAHSP phenotype. Other cases IAHSP with clear ataxia cerebellar atrophy and T2-weighted white matter changes have also been described but *ALS1N* mutation have not been looked for in these cases [22]. Our report demonstrates by the extensive sequencing and western blot analysis that *ALS1N* gene is unlikely the mutated gene causing ARSAL phenotype.

The complicated nature of the ARSAL phenotype can be appraised by the various diagnoses given to cases over the years such as cerebral palsy complicated spastic paraplegia and even multiple sclerosis in some of the older cases. It is important to stress that though spasticity is present in all cases; ataxic finding and cerebral atrophy are always concurrently observed. ARSAL clearly has common features with certain well characterized leukodystrophies and complicated paraplegias. Of all the leukodystrophies ARSAL has most

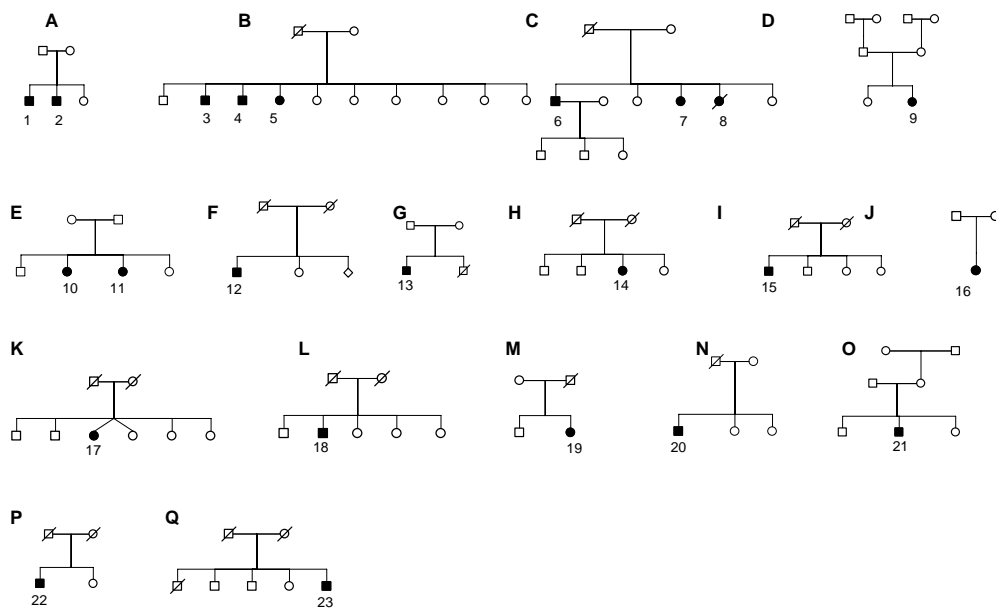
overlap with leukodystrophy with vanishing white matter (VWM) caused by mutations in one of the 5 subunits *EIF2B* genes on chromosome 1p34 2p23 3q27 12q24 14q24 [27]. VWM is a progressive leukodystrophy that causes mild motor delay followed by chronic progressive and episodic neurological deterioration [28-30]. VWM presents mainly with cerebellar ataxia spasticity progressive optic atrophy and epilepsy in some cases. Interestingly the *EEF1B2* gene coding for *EF1*-beta a gene with a high homology with the *EIF2* genes associated with VWM maps to the ARSAL region. However no mutations in the *EEF1B2* were detected. Of the complicated HSP only a few forms present with cerebellar ataxia [31]. Spastic paraplegia type 2 (SPG2) shares the most features with ARSAL but it maps to chromosome Xq28 [32]. Cases of SPG11 the most common recessive HSP may have some cerebellar atrophy but it is usually not associated with ataxia. In SPG11 some cases have thinning of the corpus callosum as was observed in two of the most affected ARSAL cases from our largest family (B3 and B4) [33-35]. Corpus callosum thinning progressive spastic ataxia and white matter changes have also been well documented in Mast syndrome (SPG21) [36]. A mutation in the maspardin gene on chromosome 15q22.31 is shared by all cases of this rare syndrome described to date only in Old Order Amish cases. None of the gene in the ARSAL candidate interval is homologous with maspardin or do they have hydrolase domains. The *HSP60* gene mutated in dominant form of SPG13 maps to a region 4cM centromeric to the ARSAL region [37]. We screened this *HSP60* gene early in our study and did not find any mutations. A group of Pakistani families with a recessive cerebral palsy were mapped to the same general region of chromosome 2q [38]. As previously mentioned the more affected juvenile cases of ARSAL were initially considered affected by cerebral palsy (CP). Ataxia has been described to be associated with CP cases [39]. It was proposed that the Pakistani recessive cerebral palsy were caused by a mutation in the *GAD1* gene [17;39]. Though outside of the ARSAL candidate region four exons with proposed *GAD1* variants were sequenced and no mutation was uncovered. Lastly though the interfamilial and intrafamilial clinical variability raised the possibility that ARSAL may be due to a triplet repeat expansions but none were found for six such sequences in the region.

The complexity of the ARSAL phenotype lies not only in its clinical spectrum but also in its involvement of various components of the central nervous system: cerebellum pyramidal system sub-cortical white matter brain stem and corpus callosum. One of the challenges of contemporary neurogenetics is to uncover the genetic bases of diseases with variable phenotypes. The identification of genes underlying such conditions is facilitated by the identification of cohorts originating from populations with well established founder effect [14] It is clear that other non-French-Canadian families with overlapping complicated phenotypes map to this region [21;26] However no mutations in the *ALSIN* gene have been found in these patients thus suggesting that another gene in the region may underlie these disorders. In this report we describe the clinical features and successful linkage of a large French-Canadian cohort affected by a novel autosomal recessive spastic ataxia associated with leukoencephalopathy (ARSAL). To identify the ARSAL mutated gene further genomic analyses will be required. Collecting additional families from Quebec and other countries with the same phenotype will also help to reduce our candidate region. The identification of the ARSAL gene will help understanding the mechanisms leading to variable and complicated neurological disorders.

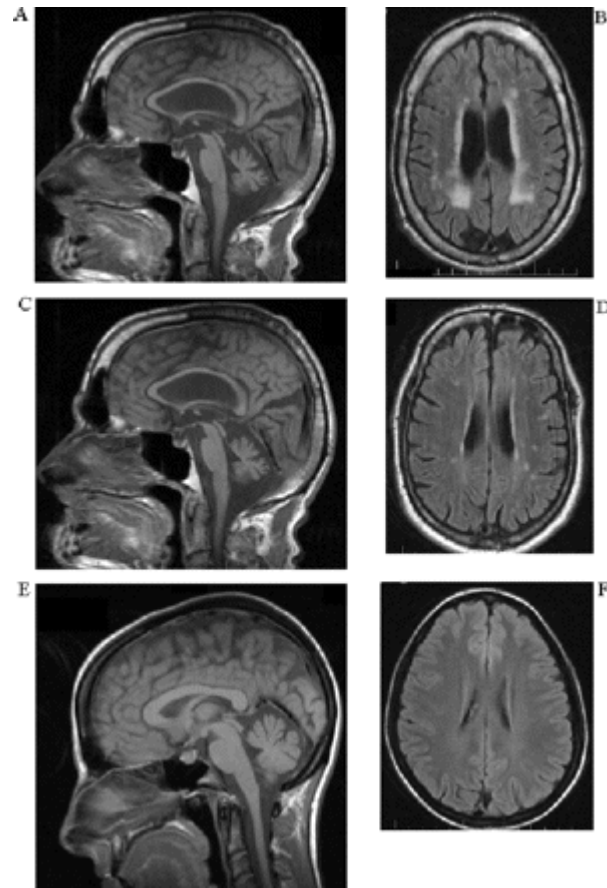
## **ACKNOWLEDGEMENTS**

---

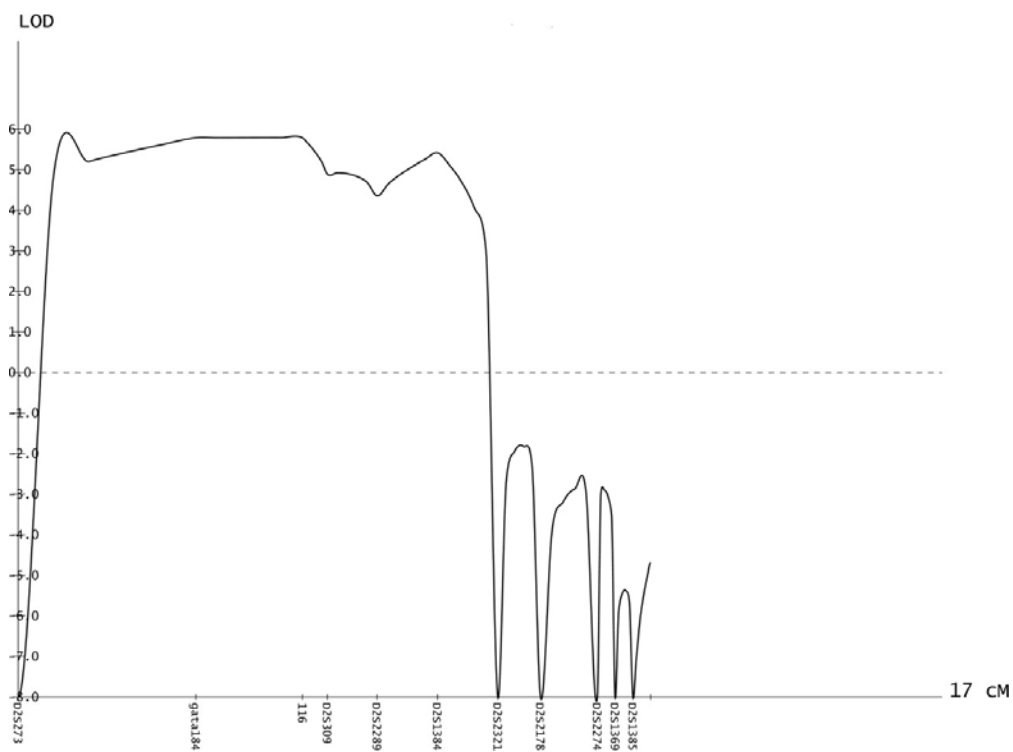
We wish to thank all family members for their participation. We would also like thanks for their collaboration: M.-P. Dubé M. Neveu Sylvie D'Arcy Johanne Bégin Nadine Leclerc Charlotte Côté Francine Lachance and Carmen Tremblay. This work was supported by grants to BB from the Association canadienne des ataxies familiales and the Neuromuscular Partnership of the Muscular Dystrophy Canada ALS Society of Canada and the Canadian Institutes of Health Research (#144202). IT and BB are scholars of the Fonds de la Recherche en Santé du Quebec (FRSQ).



**Fig. 1** Pedigrees of 17 French-Canadian ARSAL families. No consanguineous marriages have been reported. The symbols of family members affected by ARSAL are shaded black.



**Fig. 2** Sagittal and coronal T<sub>2</sub>-weighted MRI sequences demonstrating the variable cerebellar atrophy and white matter changes in three ARSAL cases. (A and B) Case 4 is the 52-year-old brother of Case 5 who has a more severe form of ARSAL. (C and D) Case 5 is the 46-year-old younger brother of Case 4 who has a less severe form of ARSAL. The degree of cortical and cerebellar atrophy and of white matter changes seem to correlate in this family (B) with the severity of the disease. (E and F) 30-year-old case with a mild-to-moderate ARSAL phenotype that is clearly less severe than that of Cases 4 and 5 (A, B, C and D). At age 30 she only has cerebellar atrophy and no white matter changes (Family E, Case 10).



**Fig. 3** Multipoint LOD scores generated by the analysis of 14 ARSAL families for chromosome 2q33–34 markers.



Table 1 Clinical Findings and Age of Onset in French-Canadian Cases of ARSAL

Patient no.	FAMILY	Age of Onset		Spasticity and										Wheel-chair		Cognitive functions
		onset, y	at	hyperreflexia	hoffman	babinski	romberg	dysarthria	dystonia	scoliosis	nystagmus	vessie	onset, y	learning disabilities		
10	E	15	yes	yes	no	yes	no	yes	yes	no	yes	yes	yes	no	no	normal
11	E	3	yes	yes	no	no	no	yes	yes	no	yes	yes	yes	no	no	normal
3	B	3	yes	yes	yes	yes	no	no	no	yes	yes	yes	yes	yes	51	slowness of thought
4	B	6	yes	yes	no	no	no	no	no	yes	yes	yes	yes	yes	19	slowness of thought
5	B	3	yes	yes	no	yes	no	no	no	yes	yes	yes	yes	yes	45	slowness of thought
6	C	20	yes	yes	yes	no	no	yes	yes	no	yes	yes	yes	no	59	normal
8	C	17	yes	yes	yes	no	no	yes	no	no	yes	no	yes	no	no	normal
1	C	47	yes	yes	yes	no	no	yes	yes	no	yes	no	yes	no	no	depression/anxiety
2	C	50	yes	yes	no	yes	yes	yes	yes	nn	no	no	yes	no	no	normal
9	D	13	yes	yes	yes	yes	no	yes	yes	no	yes	yes	yes	yes	30	normal
12	A	3	yes	yes	no	no	no	yes	yes	yes	yes	no	yes	yes	10	normal
13	A	3	yes	yes	no	yes	no	no	yes	no	no	no	yes	yes	no	normal
14	F	5	yes	yes	no	no	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	slowless
15	G	3	yes	yes	no	no	no	yes	no	yes	yes	yes	yes	yes	45	normal
7	H	19	yes	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	yes	yes	no	normal
17	I	23	yes	yes	no	no	no	no	yes	no	no	no	no	yes	no	normal
16	J	2	yes	yes	no	yes	no	no	no	yes	yes	no	no	yes	36	slowness
21	K	59	yes	yes	nd	no	no	no	no	yes	yes	no	no	yes	72	slowness of thought
18	L	43	yes	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	normal
19	M	26	yes	yes	no	no	no	no	yes	no	no	no	no	no	38	slowless
20	N	4	yes	yes	nd	nd	no	yes	no	no	no	no	no	yes	normal	
24	P	9	yes	yes	yes	yes	no	no	no	no	yes	yes	yes	yes	16	normal
26	R	2	yes	yes	no	no	no	yes	no	yes	no	no	no	no	no	slowness
28	T	32	yes	yes	no	no	no	yes	no	no	no	no	no	yes	no	normal

Table 2 MRI Findings and Age of Onset in French-Canadian Cases of ARSAL

patient no.	family	Age, y	Cerebellar atrophy		Cerebral atrophy		White matter changes			corpus callosum atrophy			
			localization vermis	hemisphere	anterior	posterior	localization	PV	DWM		JC	PF	
1	A	23	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	none
2	A	19	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	none
3	B	55	+	+	++	+	-	-	+	-	-	-	mild
4	B	52	+++	+++	-	+++	++	-	+	+	-	-	severe
5	B	48	++	+	-	++	+	-	+	++	-	-	moderate
6	C	67	++	++	-	+	-	-	++	+	-	-	none
7	C	59	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	none
9	D	30	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	none
10	E	13	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	none
12	F	59	+	-	++	+	-	-	-	+	-	-	none
13	G	28	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	none
14	H	51	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	none
16	J	73	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	none
17	K	51	++	++	-	-	-	-	+	++	-	-	none
18	L	58	++	++	-	-	-	-	+	++	-	-	none
19	M	40	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	none
20	N	52	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	none
21	O	16	+	-	-	-	-	-	++	+	+	+++ (CB)	none
22	P	38	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	none
23	Q	51	++	++	-	-	+++ (pons)	-	-	-	-	++ (CP)	none

PF= posterior fossa, PV= periventricular, DWM= deep white matter, JC= juxtacortical CB= cerebellar, CP= cerebellar peduncles  
mild = +, moderate= ++, severe= +++, none= -

**Table 3** Haplotype results of ARSAL carrier chromosomes in 17 families for 2q33-34 markers

Family	Marker DeCODE UCSC (Mbp)	D2S318 193.26 192.4	D2S273 193.26 193.4	GATA149 199.5	D2S116 198.66 201.5	D2S309 198.66 201.79	D2S2289 200.48 203.39	D2S1384 201.34 205.05	D2S1782 203.99 206.84	D2S232 204.88 208.09	D2S2178 206.3 209.6	D2S2274 206.3 210.3	D2S1369 206.51 210.27	D2S1385 206.74 212.13	D2S371 207.58 213.17
A	1	4	3	2	3	5	3	3	4	4	4	1	5	3	5
A	1	5	3	4	3	4	2	5	3*	4	4	1	2	2	4
B	3	4	1	4	6	4	7	3	4	4	4	1	4	3	4
B	3	3	1	4	6	1	7	3	4	2m	4	1	5	3	5
C	6	0	5	2	6	6	2	3	4	4	4	1	5	3	5
C	6	0	5	3	3	3	2	3	4	2m	4	4*	4	2	3
D	9	4	4	4	3	5	4	5	6*	4	4	1	1	1	3
D	9	1	5	4	3	4	6	4	6	4	4	4	4	3	5
E	11	3	3	4	2	5	2	4	6*	4	4	1	5	3	5
E	11	3	3	3	4	5	3	4	4	4	4	1	5	3	5
F	12	1	5	2	0	5	2	4	6*	4	4	1	5	3	5
F	12	1	6	3	0	7	4	2	4	3	1	1	0	2	3
I	15	0	5	2	1	0	2	4	3*	4	4	1	5	3	5
I	15	0	3	2	3	0	2	3	4	4	4	1	4m	3	5
H	14	2	4	2	3	6	3	1	4	4	4	2*	4	3	5
H	14	3	4	2	2	5	7	3	4	4	4	1	4m	3	5
K	17	0	0	4	3	0	4	3	4	4	4	1	5	3	5
K	17	0	0	4	2	0	2	3	4	4	4	1	5	3	5
L	18	2	7	4	3	5	7	7	6	6	4	4	1	3	5
L	18	1	5	2	3	3	7	3	4	4	4	4*	1	1	5
N	20	1	5	3	3	0	7	3	4	3m	4	1	5	5	5
N	20	1	5	2	6	0	2	4	6*	4	4	2m	5	3	5
O	21	3	5	3	4	0	4	3	1	2	2	2	2	3	5
O	21	1	5	4	4	0	2	1	4	4	4	2m	5	3	4
P	22	1	4	4	3	2	3	3	6	4	4	0	4	3	3
P	22	1	5	4	3	2	7	3	4	2**	5	0	5	3	5
Q	23	3	5	4	0	0	2	3	4	4	4	3*	4	2	5
Q	23	1	5	2	0	0	3	4	5*	4	4	1	4	3	5
Unphased															
G	13	2	3	0	1	1	1	3	4	4	4	2	0	3	0
G	13	6	6	0	3	1	6	2	4	2	2	2	0	3	0
J	16	5	5	2	3	4	0	3	4	4	2	2	5	3	3
J	16	6	6	3	6	5	0	3	4	4	4	1	5	3	5
M	19	0	2	2	3	4	3	3	4	4	4	2	5	1	5
M	19	0	6	2	6	4	6	4	6	4	4	4	5	3	4

■: Shared founder alleles or haplotype; □: shared presumed three-marker historical recombinant haplotype; \*: presumed historical recombination; \*\*: presumed historical recombination in family with limited allele sharing; m: presumed allele mutation; o: genotype unavailable.

**Supplementary Table:** Position of markers, repeats and genes tested in the candidate interval 2q33-34

Gene/Markers	Orientation	Size	DeCode	Start(bp)*	End(bp)*
D2S1353		(TAA)16	167.91	159384438	159384589
<b>GAD1</b>	↓		<b>none</b>	<b>171498706</b>	<b>171543164</b>
D2S325		(CA)21	177.98	172392003	172392224
D2S1391		(TATC)15	189.15	184817936	184818263
D2S2262		(CA)16	190.8	191108015	191108332
D2S389		(CA)15	none	191470146	191470469
D2S318		(CA)17	192.78	192401269	192401675
D2S273		(TATC)15	none	193401781	193402365
<b>HSP60 (HSPD1)</b>	↑		<b>none</b>	<b>198177071</b>	<b>198190056</b>
<b>HSP10 (HSPE1)</b>	↓		<b>none</b>	<b>198190626</b>	<b>198193677</b>
GATA149B10		(TATC)18	197.57	199529467	199529747
D2S116		(CA)16	198.66	201493801	201493982
<b>ALSIN</b>	↑		<b>none</b>	<b>202390384</b>	<b>202471244</b>
D2S1384		(TATC)12	201.34	205052569	205052832
D2S2237		(CA)15	202.01	205454696	205455030
<b>1**</b>		<b>(GA)28</b>	<b>none</b>	<b>206009952</b>	<b>206011206</b>
<b>2**</b>		<b>(GAA)108</b>	<b>none</b>	<b>206449654</b>	<b>206951670</b>
<b>3**</b>		<b>(GGA)12</b>	<b>none</b>	<b>206514694</b>	<b>206517228</b>
<b>4**</b>		<b>(GGA)60</b>	<b>none</b>	<b>206533667</b>	<b>206534739</b>
D2S1782		(TATC)16	203.99	206840196	206840509
<b>EEF1B2</b>	↓		<b>none</b>	<b>206851637</b>	<b>206851637</b>
D2S2321		(CA)20	204.88	208099325	208099714
D2S2178		(CA)14	206.51	209679356	209679607
D2S1385		(TATC)13	none	210272759	210272780
<b>5**</b>		<b>(AGG)18</b>	<b>none</b>	<b>210258809</b>	<b>210258889</b>
<b>6**</b>		<b>(CAG)7</b>	<b>none</b>	<b>210270934</b>	<b>210270955</b>
D2S1369		(TATC)18	206.52	210369471	210369779
<b>7**</b>		<b>(AGG)27</b>	<b>none</b>	<b>210461158</b>	<b>210461239</b>
D2S371		(CA)12	209.16	212138564	212138900
D2S2322		(CA)44	209.16	213574120	213574455
D2S317		(CA)7	209.33	213327061	213327371
D2S2944		(CA)19	209.16	213574120	213574455
D2S2382		(TAGA)9	210.46	214405293	214405601
D2S164		(CA)19	215.5	217785356	217785698
D2S434		(CA)14	216	218401980	218402315

\*\*GC-rich repeats tested

Candidate genes

Based on UCSC (May 2004 freeze)

### Reference List

- [1] B.P.Van de Warrenburg, R.J.Sinke, B.Kremer. Recent advances in hereditary spinocerebellar ataxias, *J Neuropathol Exp Neurol.* 64 (2005) 171-180.
- [2] M.Koenig. Rare forms of autosomal recessive neurodegenerative ataxia, *Semin Pediatr Neurol.* 10 (2003) 183-192.
- [3] P.A.Leegwater, G.Vermeulen, A.A.Konst, S.Naidu, J.Mulders, A.Visser, P.Kersbergen, D.Mobach, D.Fonds, C.G.van Berkel, R.J.Lemmers, R.R.Frants, C.B.Oudejans, R.B.Schutgens, J.C.Pronk, M.S.van der Knaap. Subunits of the translation initiation factor eIF2B are mutant in leukoencephalopathy with vanishing white matter, *Nat Genet.* 29 (2001) 383-388.
- [4] Y.Zhao, E.K.Tan, H.Y.Law, C.S.Yoon, M.C.Wong, I.Ng. Prevalence and ethnic differences of autosomal-dominant cerebellar ataxia in Singapore, *Clin Genet.* 62 (2002) 478-481.
- [5] J.P.Bouchard, A.Barbeau, R.Bouchard, R.W.Bouchard. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay, *Can J Neurol Sci.* 5 (1978) 61-69.
- [6] R.W.Bouchard, J.P.Bouchard, R.Bouchard, A.Barbeau. Electroencephalographic findings in Friedreich's ataxia and autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS), *Can J Neurol Sci.* 6 (1979) 191-194.
- [7] B.J.Keats, L.J.Ward, J.Shaw, A.Wickremasinghe, S.Chamberlain. "Acadian" and "classical" forms of Friedreich ataxia are most probably caused by mutations at the same locus, *Am J Med Genet.* 33 (1989) 266-268.
- [8] A.Richter, J.Poirier, J.Mercier, D.Julien, K.Morgan, M.Roy, F.Gosselin, J.P.Bouchard, S.B.Melancon. Friedreich ataxia in Acadian families from eastern Canada: clinical diversity with conserved haplotypes, *Am J Med Genet.* 64 (1996) 594-601.
- [9] N.Mrissa, S.Belal, C.B.Hamida, R.Amouri, I.Turki, R.Mrissa, M.B.Hamida, F.Hentati. Linkage to chromosome 13q11-12 of an autosomal recessive cerebellar ataxia in a Tunisian family, *Neurology.* 54 (2000) 1408-1414.
- [10] K.Hara, O.Onodera, M.Endo, H.Kondo, H.Shiota, K.Miki, N.Tanimoto, T.Kimura, M.Nishizawa. Sacsin-related autosomal recessive ataxia without prominent retinal myelinated fibers in Japan, *Mov Disord.* 20 (2005) 380-382.

- [11] K.Gucuyener, K.Ozgul, C.Paternotte, H.Erdem, J.F.Prud'homme, M.Ozguc, H.Topaloglu. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay in two unrelated Turkish families, *Neuropediatrics*. 32 (2001) 142-146.
- [12] G.El Euch-Fayache, I.Lalani, R.Amouri, I.Turki, K.Ouahchi, W.Y.Hung, S.Belal, T.Siddique, F.Hentati. Phenotypic features and genetic findings in sascin-related autosomal recessive ataxia in Tunisia, *Arch Neurol*. 60 (2003) 982-988.
- [13] C.Criscuolo, S.Banfi, M.Orio. A novel mutation in SACS gene in a family from southern Italy., *Neurology*. 62 (2004) 100-102.
- [14] A.M.Laberge, J.Michaud, A.Richter, E.Lemyre, M.Lambert, B.Brais, G.Mitchell. Population history and its impact on medical genetics in Quebec, *Clin Genet*. 68 (2005) 287-301.
- [15] d.van, V, W.Kamphorst, M.S.van der Knaap, J.M.Powers. The leukoencephalopathy of infantile GM1 gangliosidosis: oligodendrocytic loss and axonal dysfunction, *Acta Neuropathol (Berl)*. 107 (2004) 539-545.
- [16] d.van, V, K.B.van, G.Bertrand, H.K.Van, G.C.Scheper, J.M.Powers, M.S.van der Knaap. The unfolded protein response in vanishing white matter disease, *J Neuropathol Exp Neurol*. 64 (2005) 770-775.
- [17] C.N.Lynex, I.M.Carr, J.P.Leek, R.Achuthan, S.Mitchell, E.R.Maher, C.G.Woods, D.T.Bonthon, A.F.Markham. Homozygosity for a missense mutation in the 67 kDa isoform of glutamate decarboxylase in a family with autosomal recessive spastic cerebral palsy: parallels with Stiff-Person Syndrome and other movement disorders, *BMC Neurol*. 4 (2004) 20.
- [18] C.S.Lu, H.M.Liu. Magnetic resonance imaging in a multiple sclerosis patient with progressive ataxia, *J Formos Med Assoc*. 93 (1994) 879-881.
- [19] P.A.Leegwater, J.C.Pronk, M.S.van der Knaap. Leukoencephalopathy with vanishing white matter: from magnetic resonance imaging pattern to five genes, *J Child Neurol*. 18 (2003) 639-645.
- [20] D.H.Gutmann, K.H.Fischbeck, J.Kamholz. Complicated hereditary spastic paraparesis with cerebral white matter lesions, *Am J Med Genet*. 36 (1990) 251-257.
- [21] E.Eymard-Pierre, G.Lesca, S.Dollet, F.M.Santorelli, C.M.Di, E.Bertini, O.Boespflug-Tanguy. Infantile-onset ascending hereditary spastic paralysis is associated with mutations in the alsin gene, *Am J Hum Genet*. 71 (2002) 518-527.

- [22] K.Brockmann, M.A.Simpson, A.Faber, C.Bonnemann, A.H.Crosby, J.Gartner. Complicated hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum (HSP-TCC) and childhood onset, *Neuropediatrics*. 36 (2005) 274-278.
- [23] Y.Yang, A.Hentati, H.X.Deng, O.Dabbagh, T.Sasaki, M.Hirano, W.Y.Hung, K.Ouahchi, J.Yan, A.C.Azim, N.Cole, G.Gascon, A.Yagmour, M.Ben-Hamida, M.Pericak-Vance, F.Hentati, T.Siddique. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis, *Nat Genet*. 29 (2001) 160-165.
- [24] S.Hadano, C.K.Hand, H.Osuga, Y.Yanagisawa, A.Otomo, R.S.Devon, N.Miyamoto, J.Showguchi-Miyata, Y.Okada, R.Singaraja, D.A.Figlewicz, T.Kwiatkowski, B.A.Hosler, T.Sagie, J.Skaug, J.Nasir, R.H.Brown, Jr., S.W.Scherer, G.A.Rouleau, M.R.Hayden, J.E.Ikeda. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2, *Nat Genet*. 29 (2001) 166-173.
- [25] F.Gros-Louis, I.A.Meijer, C.K.Hand, M.P.Dube, D.L.MacGregor, M.H.Seni, R.S.Devon, M.R.Hayden, F.Andermann, E.Andermann, G.A.Rouleau. An ALS2 gene mutation causes hereditary spastic paraplegia in a Pakistani kindred, *Ann Neurol*. 53 (2003) 144-145.
- [26] G.Lesca, E.Eymard-Pierre, F.M.Santorelli, R.Cusmai, C.M.Di, E.M.Valente, J.ttia-Sobol, H.Plauchu, V.Leuzzi, A.Ponzone, O.Boespflug-Tanguy, E.Bertini. Infantile ascending hereditary spastic paralysis (IAHSP): clinical features in 11 families, *Neurology*. 60 (2003) 674-682.
- [27] R.Schiffmann, M.S.van der Knaap. The latest on leukodystrophies, *Curr Opin Neurol*. 17 (2004) 187-192.
- [28] P.A.Leegwater, A.A.Konst, B.Kuyt, L.A.Sandkuijl, S.Naidu, C.B.Oudejans, R.B.Schutgens, J.C.Pronk, M.S.van der Knaap. The gene for leukoencephalopathy with vanishing white matter is located on chromosome 3q27, *Am J Hum Genet*. 65 (1999) 728-734.
- [29] P.A.Leegwater, J.C.Pronk, M.S.van der Knaap. Leukoencephalopathy with vanishing white matter: from magnetic resonance imaging pattern to five genes, *J Child Neurol*. 18 (2003) 639-645.
- [30] J.C.Pronk, P.A.Leegwater, M.S.van der Knaap. [From gene to disease; a defect in the regulation of protein production leading to vanishing white matter], *Ned Tijdschr Geneesk*. 146 (2002) 1933-1936.
- [31] P.Hedera, S.Rainier, X.P.Zhao, M.Schalling, K.Lindblad, Q.P.Yuan, T.Ikeuchi, J.Trobe, J.J.Wald, O.P.Eldevik, K.Kluin, J.K.Fink. Spastic paraplegia, ataxia, mental retardation (SPAR): a novel genetic disorder, *Neurology*. 58 (2002) 411-416.

- [32] P.Saugier-veber, A.Munnich, D.Bonneau, J.M.Rozet, M.M.Le, R.Gil, O.Boespflug-Tanguy. X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus, *Nat Genet.* 6 (1994) 257-262.
- [33] K.Brockmann, M.A.Simpson, A.Faber, C.Bonnemann, A.H.Crosby, J.Gartner. Complicated hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum (HSP-TCC) and childhood onset, *Neuropediatrics.* 36 (2005) 274-278.
- [34] C.Casali, E.M.Valente, E.Bertini, G.Montagna, C.Criscuolo, M.G.De, M.Villanova, M.Damiano, A.Pierallini, F.Brancati, V.Scarano, A.Tessa, F.Cricchi, G.S.Grieco, M.Muglia, M.Carella, B.Martini, A.Rossi, G.A.Amabile, G.Nappi, A.Filla, B.Dallapiccola, F.M.Santorelli. Clinical and genetic studies in hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum, *Neurology.* 62 (2004) 262-268.
- [35] B.Winner, C.Gross, G.Uyanik, W.Schulte-Mattler, R.Lurding, J.Marienhagen, U.Bogdahn, C.Windpassinger, U.Hehr, J.Winkler. Thin corpus callosum and amyotrophy in spastic paraplegia-Case report and review of literature, *Clin Neurol Neurosurg.* (2005).
- [36] M.A.Simpson, H.Cross, C.Proukakis, A.Pryde, R.Hershberger, A.Chattonnet, M.A.Patton, A.H.Crosby. Maspardin is mutated in mast syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia, *Am J Hum Genet.* 73 (2003) 1147-1156.
- [37] J.J.Hansen, A.Durr, I.Cournu-Rebeix, C.Georgopoulos, D.Ang, M.N.Nielsen, C.S.Davoine, A.Brice, B.Fontaine, N.Gregersen, P.Bross. Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60, *Am J Hum Genet.* 70 (2002) 1328-1332.
- [38] D.P.McHale, A.P.Jackson, Campbell, M.I.Levine, P.Corry, C.G.Woods, N.J.Lench, R.F.Mueller, A.F.Markham. A gene for ataxic cerebral palsy maps to chromosome 9p12-q12, *Eur J Hum Genet.* 8 (2000) 267-272.
- [39] D.P.McHale, S.Mitchell, S.Bundey, L.Moynihan, D.A.Campbell, C.G.Woods, N.J.Lench, R.F.Mueller, A.F.Markham. A gene for autosomal recessive symmetrical spastic cerebral palsy maps to chromosome 2q24-25, *Am J Hum Genet.* 64 (1999) 526-532.



**CHAPITRE III:**

**ANALYSES MUTATIONNELLES  
DES GÈNES CANDIDATS SE TROUVANT  
AU LOCUS 2Q33-34**

## INTRODUCTION

### Gènes candidats et analyse de variation dans le nombre de copie (CNV)

Afin de trouver le gène muté responsable d'ARSAL, nous avons procédé par une approche de gènes candidats dans l'intervalle défini au locus 2q33-34. Tel que décrit dans le premier article, nous avons exclu sept gènes candidats : *HSP60*, *HSP10*, *ALSIN*, *EEF1B2*, *NRP2*, *NDUFS1* et *GAD1*. Nous avons identifié des variants dans plusieurs gènes, mais ces variants avaient déjà été caractérisés dans les bases de données de polymorphismes (dbSNP), observés dans plusieurs ADN contrôles, et donc ne seraient pas responsables du développement d'ARSAL. Cette section présente les gènes candidats choisis pour le séquençage qui n'ont pas été traités dans le chapitre 2.

Afin de compléter les analyses mutationnelles, nous avons aussi exploré l'utilisation de techniques alternatives de pointe afin de mieux confirmer l'intervalle candidat, finaliser le criblage fin pour réduire l'intervalle et exclure la possibilité de grands réarrangements (délétion, insertion et réarrangements complexes).

## MÉTHODES

### Sélection des gènes candidats avec SUSPECTS et PROSPECTR

Le but de SUSPECTS est d'automatiser efficacement les étapes de sélection de l'approche par gènes candidats. La méthode d'analyse de cet outil bioinformatique se base sur l'utilisation de l'ensemble des données répertoriées de chacun des gènes d'un intervalle donné telles que : la séquence codante, l'ontologie de gène (GO), la définition des domaines protéiques Interpro ainsi que les données d'expression du gène. L'analyse des informations du locus peut aussi être liée à un phénotype précis (ex. ataxie), ainsi, la liste de priorisation est construite via PROSPECTR, le système de priorisation. PROSPECTR utilise davantage les caractéristiques de fonction et d'expression afin de classer les gènes selon l'ordre de leur probabilité à causer

le phénotype. Les options de SUSPECTS permettent aussi de mettre des paramètres plus précis, tels que la sélection par expression, l'ajout de gènes impliqués dans des traits complexes spécifiques et des syndromes [1].

### **Séquençage des gènes candidats se trouvant au locus 2q33-34**

Les amorces d'amplification des gènes candidats sont efficacement sélectionnées avec les paramètres de base du logiciel ExonPrimer du navigateur UCSC (paramètres élémentaires Primer3). Nous avons défini une taille maximale de 1000 pb. Les exons ou fragments plus grands que cette taille étaient divisés en plusieurs parties, alors que les exons plus petits ont été combinés. Toutes les positions SNP de la séquence d'intérêt ont été masquées avec des « N » pour éviter qu'une amorce soit placée à travers ces sites polymorphiques. Tous les exons et au moins 50 pb de séquences introniques adjacentes ont été amplifiés par PCR selon la méthode décrite dans l'article du chapitre 2. Le séquençage a été exécuté utilisant le BigDye Terminator v3.0 le Kit de séquençage (ABI) sur un séquenceur automatisé (ABI 3730). Les données ont été analysées en utilisant le logiciel Mutation Surveyor® la version 1.45 et DNASTAR version 2.0.

### **Criblage du génome entier avec micro-puce ADN**

Des micropuces de génotypage à haute densité ont été utilisées afin de confirmer et réduire l'intervalle candidat. Cette technologie permet le génotypage de plus de 300 000 SNP (Illumina HAP300). La réaction consiste en une étape d'amplification de génome entier suivi par une fragmentation. Les produits sont alors hybridés à une plaque de billes où chaque bille est couverte d'amorces spécifiques. Les données furent obtenues à partir de dix cas provenant de six familles ARSAL. Le logiciel d'analyse est BEADSTUDIO module de génotypage v.3.3.7 (Illumina). Ce dernier permet de cibler les régions d'homozygotie et de perte d'hétérozygotie (LOH). Les haplotypes ont été phasés par le logiciel PHASE (<http://www.stat.washington.edu/stephens/phase.html>) alors que les analyses de comparaison d'haplotypes interfamiliaux ont été effectuées manuellement dans Excel (Microsoft Office 2007).

### **Exclusion de la possibilité de grands réarrangements via l'étude de variation du nombre de copie (CNV)**

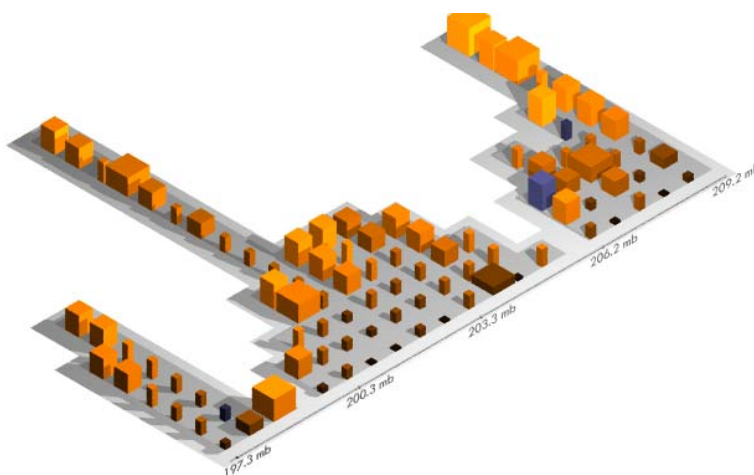
Une première analyse du nombre de copie a été exécutée en utilisant le programme PENNCNV sur les données extraites de la micropuce SNP HAP300. La résolution de détection des CNV pour la micropuce d'ADN de type HAP300 est limitée aux dizaines ou centaines de kilobases. L'algorithme incorpore les sources multiples d'information, y compris l'intensité du signal total, la proportion d'intensité allélique à chaque marqueur SNP, la distance entre SNP voisin, la fréquence allélique des SNP et les informations de pedigree [2]. Nous avons appliqué PENNCNV aux données de génotypage produites pour dix individus de la cohorte ARSAL.

Une analyse complémentaire a été effectuée avec la technologie d'Hybridation Génomique Comparative (CGH). La puce CGH permet de mesurer les différences de nombre de copie d'ADN entre un génome de référence (pool de huit ADN caucasiens) et un test (patient). À la différence de la micropuce SNP d'Illumina, il n'y a pas d'étape d'amplification lors du CGH. L'ADN de référence et l'ADN test sont marqués avec un fluorophore différent (ex. Cy3 et Cy5) et hybridés à plusieurs milliers de sondes. Les sondes d'investigation sont tirées de la séquence connue de la plupart des gènes annotés et des régions non-codantes du génome, et fixées sur une plaque de verre. La proportion de l'intensité de fluorescence du test (ex. Cy3) est comparée à celui de l'ADN de référence (ex. Cy5). Ceci permet de mesurer les changements de nombre de copie pour un emplacement particulier dans le génome. La compagnie NimbleGen (Roche) offre une puce spécifique au chromosome 2 (HG18 CHR2 FT), les sondes ont une taille entre 50-75mer et un espacement moyen de 575 pb. Nous avons sélectionné quatre individus de trois familles (A12, B5, C6 et D9) pour cette expérience. Utilisant cette méthode, les changements de nombre de copie couvrant des régions de 5-10 kilobases peuvent être détectés. Les analyses de bases sont émises par la compagnie Nimblegen sous forme de tables, résumant ainsi les CNV répertoriés dans chacun des échantillons. Par ailleurs, une analyse plus fine des données peut être effectuée avec les logiciels NimbleScan v.2.5, Signalmap et Nexus-CGH.

## RÉSULTATS

### Sélection des gènes candidats avec SUSPECTS et PROSPECTR

Afin de trouver le gène muté responsable d'ARSAL, nous avons effectué une analyse afin de sélectionner les gènes candidats de l'intervalle défini au locus 2q33-34. Cette première analyse, associée aux données de génotypage, a permis de centraliser les analyses de recherche de mutations dans la région télomérique de notre intervalle de 10cM (Figure 1). Les gènes de cet intervalle sont énumérés en Table 1.



**Figure 1 :**

La vue d'ensemble graphique des résultats de SUSPECT. Chaque gène est représenté graphiquement par une boîte 3D. Plus haut, des boîtes plus brillantes représentent les meilleurs candidats. La largeur d'une boîte correspond aux nombres d'information de l'annotation qui contribuent à son score. Les boîtes bleues sont associées à une maladie selon OMIM. Tel que représenté, la région télomérique de 2q33-34 constitue la région la plus intéressante du point de vue des gènes candidats.

Table 1 Gènes de l'intervalle ARSAL ; 206-209cM

Genes On Sequence  
Genes in Region: 135

start	stop	Symbol	O Links	E	Cyto	Description
206255469	206371102	<u>NRP2</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33.3	<b>neuropilin 2</b>
206566690	206659151	<u>FLJ20309</u>	-	best RefSeq	2q33.3	hypothetical protein FLJ20309
206613401	206613814	<u>LOC729332</u>	-	protein	2q33.3	similar to ribosomal protein L27
206656536	206659461	<u>LOC729570</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	mRNA	2q33.3	hypothetical protein LOC729570
206696048	206732432	<u>NDUFS1</u>	- <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33-q34	<b>NADH dehydrogenase (ubiquinone)</b>
206732563	206735898	<u>EEF1B2</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33-q34	<b>eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2</b>
206734850	206734919	<u>SNORD51</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33	small nucleolar RNA, C/D box 51
206735197	206735328	<u>SNORA41</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33	small nucleolar RNA, H/ACA box 41
206748285	206791016	<u>GPR1</u>	- <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33.3	<b>G protein-coupled receptor 1</b>
206809205	206835136	<u>LOC100132849</u>	-	protein	2q33.3	hypothetical LOC100132849
206847768	206887393	<u>ZDBF2</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33.3	<b>zinc finger, DBF-type containing 2</b>
206981207	206984036	<u>LOC645978</u>	-	mRNA	2q33.3	similar to N-acylsphingosine amidohydrolase 3-like
206992034	206993252	<u>LOC729366</u>	-	mRNA	2q33.3	similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
207016613	207190930	<u>ADAM23</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	mRNA	2q33	<b>ADAM metallopeptidase domain 23</b>
207215387	207222418	<u>LOC200726</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33.3	hCG1657980
207224590	207291365	<u>DYTN</u>	-	best RefSeq	2q33.3	dystrotelin
207310732	207338295	<u>MDH1B</u>	-	best RefSeq	2q33.3	<b>malate dehydrogenase 1B, NAD (soluble)</b>
207338617	207365475	<u>FASTKD2</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33.3	FAST kinase domains 2
207512569	207542405	<u>CPO</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33.3	<b>carboxypeptidase O</b>
207653774	207738859	<u>KLF7</u>	- <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q32	<b>Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)</b>
207812833	207884544	<u>LOC729607</u>	-	mRNA	2q33.3	<b>hypothetical protein LOC729607</b>
208102931	208171818	<u>CREB1</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	mRNA	2q34	<b>cAMP responsive element binding protein 1</b>
208185071	208197953	<u>FAM119A</u>	-	mRNA	2q33.3	family with sequence similarity 119, member A
208227750	208227920	<u>LOC648343</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	protein	2q33.3	similar to protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B
208233854	208255207	<u>LOC729406</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	mRNA	2q33.3	similar to protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14B
208284509	208327434	<u>CCNYL1</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33.3	cyclin Y-like 1
208335555	208342388	<u>FZD5</u>	- <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33-q34	<b>frizzled homolog 5 (Drosophila)</b>
208393863	208395522	<u>LOC100131989</u>	-	mRNA	2q33.3	<b>hypothetical protein LOC100131989</b>
208401288	208574637	<u>LOC389072</u>	-	best RefSeq	2q33.3	<b>hypothetical protein LOC389072</b>
208604286	208604922	<u>LOC100132061</u>	-	protein	2q33.3	<b>hypothetical LOC100132061</b>
208630217	208632835	<u>LOC344471</u>	-	protein	2q33.3	<b>similar to 60S ribosomal protein L12</b>
208680975	208685911	<u>CRYGEP1</u>	-	best RefSeq	2q33.3	<b>crystallin, gamma E pseudogene 1</b>
208694577	208697458	<u>CRYGD</u>	- <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33-q35	<b>crystallin, gamma D</b>
208701108	208702872	<u>CRYGC</u>	- <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33-q35	<b>crystallin, gamma C</b>
208708342	208710666	<u>LOC646091</u>	-	protein	2q33.3	<b>similar to Replication factor C subunit 2</b>
208715542	208719122	<u>CRYGB</u>	- <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33-q35	<b>crystallin, gamma B</b>
208733709	208736542	<u>CRYGA</u>	- <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33-q35	<b>crystallin, gamma A</b>
208738316	208763018	<u>LOC389073</u>	-	best RefSeq	2q33.3	<b>similar to RIKEN cDNA D630023F18</b>
208781104	208781947	<u>LOC130429</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	protein	2q33.3	<b>similar to laminin receptor 1 (ribosomal protein SA)</b>
208787693	208795594	<u>LOC100128483</u>	-	protein	2q33.3	<b>hypothetical LOC100128483</b>
208809198	208828051	<u>IDH1</u>	- <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33.3	<b>isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble</b>
208839236	208931720	<u>PIP5K3</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33.3	<b>phosphatidylinositol-3-phosphate</b>
208842291	208843663	<u>LOC646118</u>	-	protein	2q33.3	<b>hypothetical LOC646118</b>
208979801	209067476	<u>PTH2R</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33	<b>parathyroid hormone 2 receptor</b>
209645566	209648524	<u>LOC130195</u>	-	protein	2q34	<b>hypothetical LOC130195</b>
209717996	209720874	<u>CRYGFP</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q33-q35	<b>crystallin, gamma F pseudogene</b>
209751737	209753983	<u>LOC402116</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	mRNA	2q34	<b>similar to plakophilin 4 isoform a</b>
209997016	210307079	<u>MAP2</u>	+ <a href="#">OMIM</a>	best RefSeq	2q34-q35	<b>microtubule-associated protein 2</b>

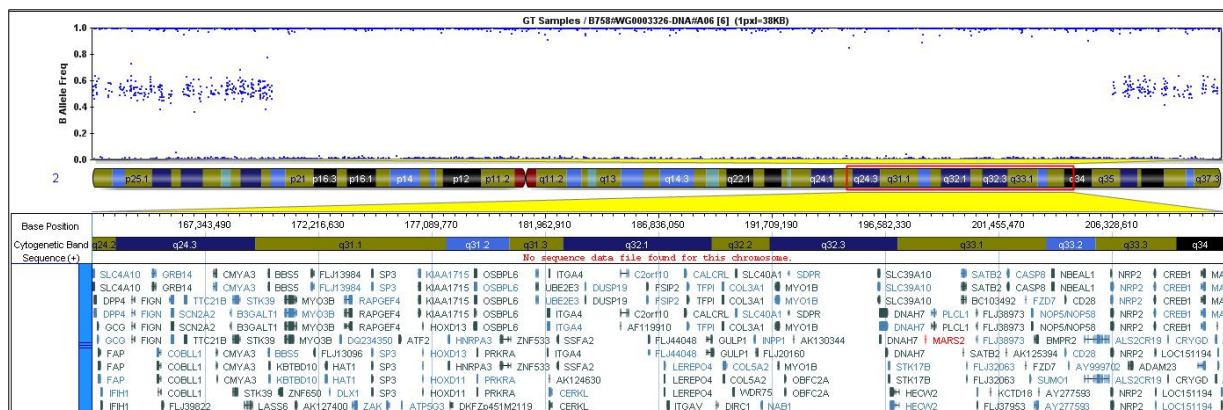
**Légende :** Les gènes soulignés en rouge ont été séquencés par ADN génomique tel que décrit dans la section méthode. La liste de gènes a été extraite et modifiée du portail MapView de NCBI.

## Exclusion de 33 gènes de l'intervalle 2q33-34

Tous les gènes soulignés en rouge dans la Table 1 ont été séquencés, mais aucune mutation n'a été trouvée. Les exons alternatifs et variants d'épissage spécifiques à certains tissus n'ont toutefois pas été investigués.

## Criblage du génome entier avec micro-puce d'ADN : Analyses de génotypage et d'haplotypes

L'analyse des résultats des 300 000 SNP (Illumina Hap300) des dix cas provenant de six familles a permis de confirmer le locus 2q33-34. En effet, la famille B, partage une région d'homozygotie de plus de 50Mb (Figure 2). Les haplotypes phasés ainsi que les analyses de comparaison d'haplotypes interfamiliaux ont permis d'identifier un intervalle réduit à 0.658 Mb sur le chromosome 2q33-34 (Figure 3). Dans cet intervalle, seulement neuf gènes sont localisés. De ces neuf gènes, trois avaient été séquencés précédemment (*HSPD1*, *HSPE1* et *COQ10B*).



**Figure 2 :** Visualisation graphique de l'analyse du logiciel BEADSTUDIO de la région 2q33-34 pour le patient B4. Localisation des marqueurs SNP et gènes dans la région d'homozygotie détectée par la micropuce SNP HAP300 qui couvre plus de 50 Mb dans la Famille B.

dbSNP ID	Chr	FAMILY ID	PATIENTS ID		FAMILY A		FAMILY B		FAMILY C		FAMILY D		FAMILY E		ANCESTRAL HAPLOTYPE
			2	1	1	4	4	5	5	3	3	6	6	9	
			AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT
rs2697303	2	197794909	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs9283513	2	197786195	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs2697300	2	197788625	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
<b>rs1881401</b>	<b>2</b>	<b>197796152</b>	<b>A*</b>	<b>A*</b>	<b>G*</b>	<b>A*</b>	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs2049680	2	197800111	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs7559692	2	197805197	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs11902332	2	197806003	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<b>rs2712885</b>	<b>2</b>	<b>197817222</b>	<b>A*</b>	<b>A*</b>	<b>G*</b>	<b>A*</b>	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs2697290	2	197821402	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<b>rs6434921</b>	<b>2</b>	<b>197828442</b>	<b>G*</b>	<b>G*</b>	<b>A*</b>	<b>G*</b>	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs2697276	2	197838599	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs2712867	2	197843657	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs6727480	2	197852116	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs1429411	2	197852247	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs12619296	2	197857012	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs13033821	2	197881781	C	A	C	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C
rs1429412	2	197899139	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs12472355	2	197914085	A	C	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs787987	2	197924516	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs787994	2	197931366	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs788008	2	197940884	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
<b>rs16865262</b>	<b>2</b>	<b>197971391</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
rs788018	2	197973771	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs3754822	2	198035559	G	G	-	-	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs788016	2	198060538	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
<b>rs7590697</b>	<b>2</b>	<b>198086791</b>	<b>A*</b>	<b>A*</b>	<b>A*</b>	<b>G*</b>	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs11455653	2	198196565	G	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs70852	2	198205757	A	C	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs2045244	2	198214711	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs1902249	2	198229601	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs2341510	2	198266924	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
<b>MARS2</b>	<b>2</b>	<b>198278146-198281426</b>													
rs4850808	2	198284387	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs700642	2	198308975	A	C	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs700645	2	198313759	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs700646	2	198316756	-	-	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs1065953	2	198322857	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs2293255	2	198329751	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs13425988	2	198330623	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs700650	2	198332530	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
<b>rs700651</b>	<b>2</b>	<b>198339959</b>	<b>G*</b>	<b>A*</b>	<b>A*</b>	<b>G*</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
rs700653	2	198345678	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs700654	2	198351666	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
<b>rs1851779</b>	<b>2</b>	<b>198353353</b>	<b>G*</b>	<b>G*</b>	<b>A*</b>	<b>G*</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
rs770657	2	198382429	C	A	A	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C
rs700667	2	198385753	A	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs16824376	2	198392587	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs996427	2	198393854	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs700670	2	198395529	A	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs700671	2	198398246	A	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs4550664	2	198399650	G	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs700675	2	198408461	G	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs700677	2	198410669	C	A	C	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C
rs700679	2	198415161	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs6707521	2	198421476	C	G	A	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G
rs1435568	2	198471124	A	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs938929	2	198489105	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs11692344	2	198504108	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs1518364	2	198518220	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs7581202	2	198545022	A	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs1016883	2	198589913	A	G	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs2196176	2	198613159	A	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs7572733	2	198638051	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs6434955	2	198654796	G	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs1064213	2	198658485	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs7595412	2	198670488	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs3771362	2	198671076	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs3732321	2	198674502	G	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs892515	2	198686066	A	G	G	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G
rs11681576	2	198686232	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

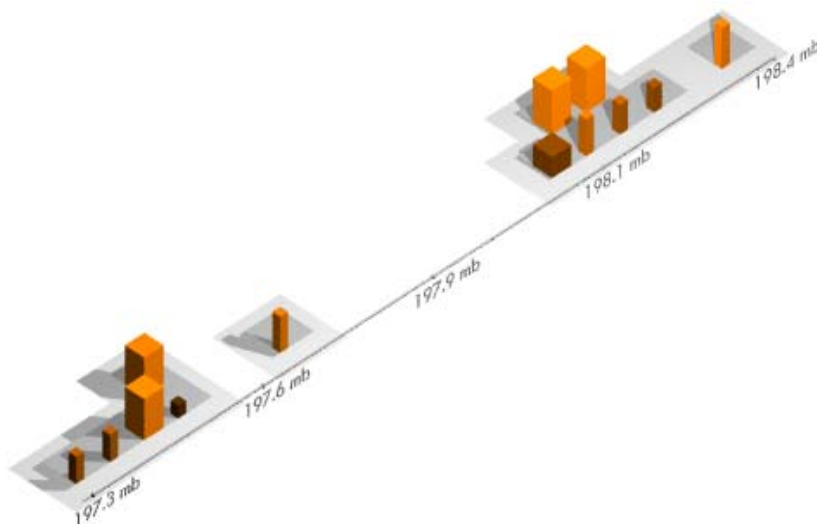
Figure 3 :

Haplotypes SNP de neuf patients atteints d'ARSAL provenant de cinq familles. Cette analyse confirme le locus du chromosome 2 et définit un intervalle réduit de 0.658 Mb selon la map de UCSC.



## Sélection des gènes candidats avec SUSPECTS et PROSPECTR dans le petit intervalle

Afin de trouver le gène muté responsable d'ARSAL, nous avons effectué une seconde analyse afin de sélectionner les gènes candidats selon l'intervalle défini par le criblage SNP (0.658Mb). Les résultats compilés des deux analyses effectuées indiquent que le gène *MARS2* figure en premier rang des gènes d'intérêt selon PROSPECTR.



ATAXIA PHENOTYPE							
Gene_stable_id	Symbol	GO_matches	Prospectr_score	Prospectr_rank	GO_rank	Domain_rankpression_rar	Total_rank
ENSG00000115896	PLCL1	phosphoric hydrolase activity (TDP1) carboxylic hydrolase(PAFAH1B3) phosphoric hydrolas (PPP2R2B)	44.4233	6	1	1	1
ENSG00000144381	HSPD1	protein folding (SACS)	65.4075	2	2		2
ENSG00000115541	HSPD1	protein folding (SACS)	65.4075	3	3		3
ENSG00000152428	MARS2		65.8361	1			4
ENSG00000115520	NP_079423		58.5162	4			5
ENSG00000115540	PREI3		47.6268	5			6
ENSG00000162944	C2orf11		39.7714	7			7
ENSG00000152430	BOLL		38.841	8			8
ENSG00000115524	SF3B1		28.864	9		1	9
WHITE MATTER PHENOTYPE							
Gene_stable_id	Symbol	GO_matches	Prospectr_score	Prospectr_rank	GO_rank	Domain_rankpression_rar	Total_rank
ENSG00000152428	MARS2	translation (EIF2B1, EIF2B5, EIF2B3, EIF2B2, EIF2B4)	65.8361	1	2		1
ENSG00000152430	BOLL	translation (EIF2B1, EIF2B3, EIF2B2, EIF2B4) regulation of translation (EIF2B5)	38.841	8	1		2
ENSG00000144381	HSPD1		65.4075	2			3
ENSG00000115541	HSPD1		65.4075	3			4
ENSG00000115520	NP_079423		58.5162	4			5
ENSG00000115540	PREI3		47.6268	5			6
ENSG00000115896	PLCL1		44.4233	6			7
ENSG00000162944	C2orf11		39.7714	7			8
ENSG00000115524	SF3B1		28.864	9			9

**Figures 4 : A)** La vue d'ensemble graphique des résultats de SUSPECTS. Les gènes représentés par une boîte 3D brillantes sont les meilleurs candidats de la petite région candidate de 2q33.

**B)** Résultats de l'analyse bioinformatique SUSPECTS et PROSPECTR pour la région de 0.658Mb. Selon les analyses, *MARS2* se classe au premier rang pour le phénotype ataxie et la leucodystrophie.

## **Description et exclusion des gènes localisés dans la région de 0.658Mb du chromosome 2q33-34.**

### **Gène *SF3B1***

Le gène *SF3B1* (NM\_001005526) compte cinq exons codant pour la sous-unité 1 du facteur d'épissage 3b. *SF3B1* forme un complexe avec le facteur d'épissage 3a [3]. Le complexe de facteur d'épissage 3b/3a lie RNA pré-messager en amont du site d'épissage de l'intron. Le deux-tiers carboxy-terminal de la sous-unité 1 est composée de 12 répétitions HEAT non-identiques qui forment des structures hélicoïdales [4]. Ce gène a plus de dix variantes d'épissage et est exprimé de façon ubiquitaire. Ce gène se classe au dernier rang des candidats selon PROSPECTR et n'a pas été séquencé.

### **Gène *COQ10B***

Le gène coenzyme Q10 homolog B (*COQ10B*) est constitué de cinq exons qui codent pour le précurseur mitochondrial *COQ10B*, une protéine de 238 acides aminés. La Coenzyme Q10 (*CoQ10* ou ubiquinone) est un composant lipide de plusieurs membranes cellulaires et a des fonctions métaboliques multiples dans la mitochondrie, dont le transport des électrons des complexes I et II au complexe III de la chaîne respiratoire. Les déficits de *CoQ10* (OMIM 607 426) ont été associés à quatre phénotypes cliniques majeurs : encéphalomyopathie, maladie multisystémique infantile typique avec néphropathie et encéphalopathie, myopathie pure et ataxie cérébelleuse [5;6]. Ce gène se classe au quatrième rang des candidats selon PROSPECTR et il a été séquencé. Aucun variant pathogénique n'a été identifié.

### **Gènes *HSPE1* et *HSPD1***

Le gène *HSPE1* (*HSP60*) est formé de quatre exons qui codent une protéine Heat Shock. La protéine *HSPE1* a une fonction de chaperonne. Sa structure forme un anneau heptaédrique qui se lie à une autre protéine Heat Shock pour former un hétérodimer symétrique qui fonctionne de façon ATP-dépendant. Ce gène et sa co-chaperonne, *HSPD1*(*HSP10*), sont tête à tête sur le chromosome 2 et partagent le même promoteur. Leur localisation est dans la matrice mitochondriale. Le premier exon de *HSPD1* est non-codant et le

premier exon *HSPE1* se termine par un codon d'initiation [7]. Il existe plusieurs copies du gène *HSPD1* dans le génome humain. Tous sauf un sont des pseudogènes non fonctionnels contenant de nombreuses mutations de type substitutions, insertions et délétions [8;9]. Des mutations dans le gène *HSPD1* ont été rapportés pour cause de la paraplégie spastique autosomique dominante 13 (SPG13 ; OMIM 605 280) [7] et dans une famille israélienne atteinte d'une forme récessive de leucoencéphalopathie (HLD4; OMIM 612 233) [10]. La similitude de ces deux syndromes neurodégénératifs avec ARSAL a suscité notre l'intérêt pour ceux-ci dès l'identification du locus de la maladie en 2006. Ces deux gènes se classent au deuxième et troisième rang selon PROSPECTR. Leurs séquences codantes ainsi que leur promoteur ont été séquencés et aucun variant pathogénique n'a été identifié. Bien qu'ils aient fait partie du premier article, nous avons effectué une seconde analyse des séquences en 2008 afin d'assurer leur exclusion.

### **Gène *MOBKL3***

Le gène *MOBKL3* (Mps One Binder kinase activator-like 3 isoform ; NM\_199482) est constitué de huit exons dont sept codant pour une protéine de 199 acides aminés. Les études effectuées sur son homologue souris suggèrent que l'expression de ce gène est régulée pendant la maturation des oocytes et la préimplantation suivant l'activation de gène zygotique [11]. *MOBKL3* est fortement exprimé dans le cerveau. Ce gène se classe au cinquième rang des candidats selon PROSPECTR. Ce gène n'a pas été séquencé.

### **Gène *RFTN2***

Le gène *RFTN2* ou raftlin family member 2 (chromosome 2 open reading frame 11) contient 9 exons codant pour une protéine de 501 acides aminés dont la localisation est à la membrane cellulaire. Ce gène est peu exprimé et sa fonction n'est pas connue. Il se classe au septième rang selon PROSPECTR et n'a pas été séquencé.

### **Gène *MARS2***

Le gène *MARS2* a un seul exon dont la portion codante fait plus de 1800 pb (précurseur mitochondrial Methionyl-tRNA synthétase ; OMIM 609 728). Le gène code une protéine de 593 acides aminés et comprend une séquence de 18 acides aminés servant de signal d'importation mitochondrial. La protéine agit comme monomère et partage un haut degré d'homologie avec les met-tRNA synthétases des autres mammifères [12]. Son expression est ubiquitaire. *MARS2* n'est pas associé à un phénotype, toutefois plusieurs aminoacetyl-tRNA synthétases ont été liées à des maladies neurodégénératives [13-16]. Ce gène se classe au premier rang des candidats selon PROSPECTR. L'analyse de ce gène sera traitée dans le prochain chapitre.

### **Gène *BOLL***

Le gène code pour l'isoforme 2 de boule (NM\_033030). Ce gène de 11 exons appartient à la famille de gènes DAZ impliqués dans le développement des cellules germinales. La protéine *BOLL* a une taille de 283 acides aminés, elle est semblable à son homologue Drosophile Boule. La perte de cette fonction de ce gène cause l'absence de spermatozoïdes dans le sperme (azoospermie) [17]. Son expression est spécifique au testis. Ce gène se classe au huitième rang des candidats selon PROSPECTR et n'a pas été séquencé.

### **Gène *PLCL1***

Le gène *PLCL1* est constitué de six exons couvrant un total de 343 588 pb. Son ARN messager code pour l'isoforme A de la phospholipase C-like. La protéine est impliquée dans une cascade de signalisation intracellulaire et dans le processus d'endocytose phospho-dépendant des récepteurs GABA. Son expression anormale (basse) pourrait contribuer à la genèse et à la progression des carcinomes du poumon. L'isoforme 1 est exprimé de façon préférentielle dans le cerveau. Ce gène se classe au sixième rang des candidats selon PROSPECTR. Aucun variant pathogénique n'a été identifié.

### **Exclusion de la possibilité de grands réarrangements via l'étude de variation du nombre de copie (CNV)**

L'analyse des données de la puce SNP Illumina avec le programme PENNCNV nous a permis d'identifier en moyenne 86 CNVs pour chaque individu avec une taille médiane de 141Mb (Table CNV PENNCNV, ANNEXE 1). Nos résultats manifestent la présence de CNVs connus et répertoriés dans la base de données DGV (<http://projects.tcag.ca/variation/>). Seulement deux individus sur neuf présentaient un CNV dans la région du petit intervalle du chromosome 2q33-34 (Table 2 individu B3 et D9) rejetant ainsi l'hypothèse qu'un grand réarrangement pouvait être la cause du développement de l'ARSAL.

L'analyse complémentaire effectuée avec la technologie d'Hybridation Génomique Comparative (CGH) a permis d'identifier plusieurs CNVs sur le chromosome 2 (Table 3). Nous avons utilisé les normes de ratio pour les analyses selon les recommandations du manufacturier (Nimblegen) ; duplication [0.2, 0.5], triplication [0.6, 1.5], délétion hétérozygote [-0.5, -0.7], délétion homozygote [-1.0, >]. Aucun CNV était partagé entre les différents individus atteints de l'ARSAL. La majorité des CNVs identifiés par les analyses de NimbleScan étaient rapportés dans la base de données DGV, donc il était improbable que ces derniers soient responsables du développement de l'ARSAL.

**Table 2 : Résultats d'analyse PENNCNV du chromosome 2 pour quatre familles ARSAL**

Family	Individual	Chr	Start	End	NbSNP	Intensity	Type(copy)	size	overlap	GqCnv	PennCnv
A	Father	2	145723325	145732417	4		0 DEL	9093			(145723325-145732417)
A	Father	2	212873082	212898738	6	-0.486707089	DEL	25657		(212873082-212898738)	
A	13	2	13933985	14175819	25		0 DEL	241835			(13933985-14175819)
A	13	2	34918750	34957893	5	-0.78335773	DEL	39144		(34918750-34957893)	
A	13	2	40662553	40918328	21		0 DEL	255776			(40662553-40918328)
A	13	2	49440827	50394244	138		0 DEL	953418			(49440827-50394244)
A	13	2	50977187	51051888	14		0 DEL	74702			(50977187-51051888)
A	13	2	55274329	55444265	18		0 DEL	169937			(55274329-55444265)
A	13	2	55534000	55695144	20		0 DEL	161145			(55534000-55695144)
A	13	2	57367904	57689073	43		0 DEL	321170			(57367904-57689073)
A	13	2	57759199	58284672	48		0 DEL	525474			(57759199-58284672)
A	13	2	60972975	61415162	50		0 DEL	442188			(60972975-61415162)
A	13	2	76794557	77180340	54		0 DEL	385784			(76794557-77180340)
A	13	2	140340463	140495158	25		0 DEL	154696			(140340463-140495158)
A	13	2	141593671	141842203	34		0 DEL	248533			(141593671-141842203)
A	13	2	155311726	155345484	11		0 DEL	33759			(155311726-155345484)
A	13	2	182126538	182201296	15		0 DEL	74759			(182126538-182201296)
A	13	2	185476099	185778285	28		0 DEL	302187			(185476099-185778285)
A	13	2	186590394	188026432	91		0 DEL	1436039			(186590394-188026432)
A	13	2	194953354	195374603	31		0 DEL	421250			(194953354-195374603)
A	13	2	202291687	202373472	18		0 DEL	81786			(202291687-202373472)
A	13	2	203314999	203754771	26		0 DEL	439773			(203314999-203754771)
A	13	2	211603512	211934422	47		0 DEL	330911			(211603512-211934422)
A	13	2	212142282	212288142	24		0 DEL	145861			(212142282-212288142)
A	13	2	214605630	214785625	39		0 DEL	179996			(214605630-214785625)
A	12	2	57367904	57597823	23		0 DEL	228920			(57367904-57597823)
A	12	2	155311726	155345484	11		0 DEL	33759			(155311726-155345484)
A	12	2	194999918	195338218	25		0 DEL	338301			(194999918-195338218)
B	4	2	10252284	10326337	18		0 DEL	74054			(10252284-10326337)
B	4	2	11704690	11816382	23		0 DEL	111693	0.325418782	(11704690-11741036)	(11704690-11816382)
B	4	2	28402854	28431358	5	-1.797183791	DEL	28505		(28402854-28431358)	
B	4	2	42831736	43004544	41		0 DEL	172800	0.177484969	(42833573-42864243)	(42831736-43004544)
B	4	2	73183380	73354961	16		0 DEL	171582			(73183380-73354961)
B	4	2	119652272	119728641	13		0 DEL	76370			(119652272-119728641)
B	4	2	120942028	121048661	26		0 DEL	106634	0.248091603	(120980941-121007395)	(120942028-121048661)
B	4	2	126703341	127095467	36		0 DEL	392127			(126703341-127095467)
B	4	2	127512490	127575911	17		0 DEL	63422	0.660590962	(127534016-127575911)	(127512490-127575911)
B	4	2	128002783	128122391	24		0 DEL	119609	0.087150632	(128111968-128122391)	(128002783-128122391)
B	4	2	128834685	129004143	26		0 DEL	169459			(128834685-129004143)
B	4	2	134935075	134955767	5	-0.882922465	DEL	20693		(134935075-134955767)	
B	4	2	176643771	176750879	16		0 DEL	107109			(176643771-176750879)
B	4	2	218000897	220214766	232		0 DEL	2213870	0.092100711	(218383444-218412483)(219993553-220092370)	(218000897-220214766)
B	4	2	231444854	231542083	21		0 DEL	97230			(231444854-231542083)
B	4	2	232913134	233095879	26		0 DEL	182746			(232913134-233095879)
B	4	2	233678133	233695966	5	-0.973369471	DEL	17834		(233678133-233695966)	
B	4	2	238078077	238235770	46		0 DEL	157694	0.210020673	(238127464-238160582)	(238078077-238235770)
B	4	2	240801098	240825091	5	-2.264635771	DEL	23994		(240801098-240825091)	
B	4	2	240984046	241070653	18		0 DEL	86608	0.095556992	(241051687-241070653)	(240984046-241059962)
B	4	2	241327201	241364978	5	-1.024534111	DEL	37778		(241327201-241364978)	
B	4	2	241470380	241549379	20		0 DEL	79000	0.610050633	(241494813-241549379)	(241470380-241543006)
B	4	2	241792414	241822589	6	-1.108301531	DEL	30176		(241792414-241822589)	
B	4	2	110243431	110292012	12		0 AMP	48582	0.436025689	(110243431-110264613)	(110243431-110292012)
B	Mother	2	10223192	10244107	5	-0.333024083	DEL	20916		(10223192-10244107)	
B	Mother	2	110243431	110292012	14		0 AMP	48582	1	(110243431-110292012)	(110243431-110292012)
B	3	2	110243431	110292012	14		0 AMP	48582	1	(110243431-110292012)	(110243431-110292012)
B	3	2	198266924	198421476	24		0 DEL	154553			(198266924-198421476)
D	9	2	103565457	103668922	6		0 DEL	103466			(103565457-103668922)
D	9	2	198266924	198421476	24		0 DEL	154553			(198266924-198421476)
C	6	2	98219605	98267182	6	-0.384253721	DEL	47578		(98219605-98267182)	
C	8	2	9699457	10545311	157		0 AMP	845855			(9699457-10545311)
C	8	2	26995019	27602128	41		0 AMP	607110			(26995019-27602128)
C	8	2	28369775	31350488	436		0 AMP	2980714			(28369775-31350488)
C	8	2	42864243	43367540	88		0 AMP	503298			(42864243-43367540)
C	8	2	46893495	47367515	87		0 AMP	474021			(46893495-47367515)
C	8	2	70691698	72111366	211		0 AMP	1419669			(70691698-72111366)
C	8	2	119087666	121387139	250		0 AMP	2299474			(119087666-121387139)
C	8	2	220019283	220677083	92		0 AMP	657801			(220019283-220677083)
C	8	2	239497749	242170078	402		0 AMP	2672330			(239497749-242170078)

**Table 3 : Valeurs des ratios CNV identifiés par NimbleScan extraits du petit intervalle locus du Chromosome 2**

PROBE_ID	POSITION	GC	A12	D9	C6	B5	
			RATIO	RATIO	RATIO	RATIO	
CHR02FS198023069	198023069	0.43	0.155	-0.343	-0.064	-0.309	
CHR02FS198024574	198024574	0.38	0.209	-0.017	0.155	-0.309	
CHR02FS198024599	198024599	0.43	-0.071	0.534	0.123	-0.309	1,638 bp. <b>COQ10</b>
CHR02FS198025471	198025471	0.42	0.192	0.931	-0.242	-0.184	intron <b>chr2:198,026,476-198,048,096</b>
CHR02FS198026236	198026236	0.54	-0.135	-0.069	-0.105	-0.221	<b>COQ10</b>
CHR02FS198026521	198026521	0.54	0.170	0.206	0.581	0.666	coding
CHR02FS198027246	198027246	0.46	0.229	0.289	0.003	0.318	intron
CHR02FS198027745	198027745	0.42	-0.025	0.219	-0.304	0.055	
CHR02FS198028100	198028100	0.46	-0.260	1.628	0.193	0.860	intron
CHR02FS198029865	198029865	0.42	0.251	-0.112	0.039	-0.068	
CHR02FS198030355	198030355	0.33	0.221	-0.346	0.338	-0.133	
CHR02FS198031310	198031310	0.4	0.266	0.094	0.330	0.112	
CHR02FS198031355	198031355	0.43	-0.024	0.852	-0.102	-0.004	intron
CHR02FS198032425	198032425	0.5	0.086	0.099	-0.031	0.215	
CHR02FS198032530	198032530	0.44	0.257	0.318	-0.023	-0.032	
CHR02FS198033124	198033124	0.39	0.169	-0.641	-0.078	-0.108	
CHR02FS198033907	198033907	0.44	0.180	0.305	-0.057	-0.164	
CHR02FS198034182	198034182	0.46	-0.063	0.209	0.277	0.126	
CHR02FS198035255	198035255	0.38	0.132	0.027	0.232	-0.462	
CHR02FS198035927	198035927	0.52	0.148	-0.164	-0.023	-0.381	
CHR02FS198036463	198036463	0.43	0.026	0.272	0.014	-0.078	
CHR02FS198037326	198037326	0.44	0.242	0.028	-0.373	0.040	
CHR02FS198037501	198037501	0.38	0.432	-0.440	-0.061	-0.550	
CHR02FS198038137	198038137	0.36	0.138	0.538	0.139	0.072	intron
CHR02FS198039149	198039149	0.39	0.423	-0.283	-0.179	-0.389	
CHR02FS198039194	198039194	0.44	0.319	-0.103	0.138	-0.195	
CHR02FS198039862	198039862	0.36	0.075	-0.161	0.078	0.119	
CHR02FS198040780	198040780	0.39	0.148	0.126	-0.010	-0.255	
CHR02FS198040925	198040925	0.38	0.009	-0.174	0.229	0.021	
CHR02FS198041878	198041878	0.38	0.071	-0.174	-0.321	-0.060	
CHR02FS198042362	198042362	0.39	0.143	-0.181	0.059	-0.048	
CHR02FS198043097	198043097	0.44	0.102	0.346	-0.167	-0.362	
CHR02FS198043107	198043107	0.41	0.275	0.022	-0.145	-0.082	
CHR02FS198044478	198044478	0.4	0.059	-0.483	0.215	0.088	
CHR02FS198045218	198045218	0.38	0.288	-0.133	-0.005	0.191	
CHR02FS198045443	198045443	0.44	-0.078	-0.039	-0.097	0.245	
CHR02FS198046155	198046155	0.43	-0.147	0.064	-0.042	0.080	
CHR02FS198046816	198046816	0.4	0.296	-0.135	0.031	-0.022	
CHR02FS198047106	198047106	0.38	-0.020	-0.597	-0.097	-0.209	
CHR02FS198047843	198047843	0.43	0.221	-0.252	-0.062	-0.404	
CHR02FS198048473	198048473	0.44	0.088	0.426	-0.355	-0.007	
CHR02FS198049806	198049806	0.4	0.033	0.646	-0.023	0.079	
CHR02FS198050372	198050372	0.4	-0.041	-0.122	0.138	-0.017	
CHR02FS198050427	198050427	0.42	0.218	-0.300	-0.384	-0.344	
CHR02FS198051442	198051442	0.42	0.157	-0.592	-0.335	-0.086	
CHR02FS198051522	198051522	0.41	0.444	0.052	0.109	0.089	
CHR02FS198052548	198052548	0.36	0.004	-0.326	-0.026	-0.224	
CHR02FS198053048	198053048	0.43	-0.020	0.367	-0.170	-0.091	
CHR02FS198053755	198053755	0.5	-0.134	1.324	0.288	0.801	
CHR02FS198054025	198054025	0.48	0.260	0.635	0.265	0.311	666 bp intronic between coq10 & HSP60
CHR02FS198054420	198054420	0.43	0.028	0.038	-0.206	0.398	
CHR02FS198055063	198055063	0.4	-0.125	-0.207	0.241	-0.077	
CHR02FS198055593	198055593	0.35	-0.183	-0.281	0.332	-0.095	
CHR02FS198056231	198056231	0.4	0.190	0.147	-0.313	0.266	
CHR02FS198057322	198057322	0.4	0.209	0.303	0.222	0.031	intron <b>HSP60</b>
CHR02FS198058177	198058177	0.43	0.073	-0.158	0.041	-0.001	
CHR02FS198058647	198058647	0.42	0.173	0.094	-0.176	-0.241	
CHR02FS198059156	198059156	0.39	0.215	-0.459	-0.039	0.219	
CHR02FS198059451	198059451	0.39	-0.209	-0.177	-0.060	0.045	
CHR02FS198060191	198060191	0.36	0.148	-0.589	0.218	0.036	
CHR02FS198060511	198060511	0.44	0.054	-0.095	-0.166	-0.477	
CHR02FS198061447	198061447	0.43	0.178	-0.631	-0.009	-0.175	
CHR02FS198061972	198061972	0.42	0.314	0.186	-0.152	-0.388	
CHR02FS198062483	198062483	0.46	0.034	0.404	-0.136	0.504	
CHR02FS198062990	198062990	0.43	0.121	-0.339	-0.056	-0.213	
CHR02FS198063474	198063474	0.44	-0.018	-0.136	-0.131	-0.242	
CHR02FS198063959	198063959	0.38	0.206	-0.927	-0.124	-0.110	
CHR02FS198064501	198064501	0.4	0.238	-0.832	0.149	0.004	
CHR02FS198065451	198065451	0.39	-0.048	-0.349	-0.098	-0.244	
CHR02FS198066038	198066038	0.33	0.129	0.550	-0.001	-0.021	
CHR02FS198066173	198066173	0.4	0.198	-0.411	-0.367	-0.397	
CHR02FS198067731	198067731	0.42	-0.221	-0.338	0.092	0.089	
CHR02FS198067961	198067961	0.35	0.419	-0.651	-0.073	-0.200	
CHR02FS198068757	198068757	0.4	0.072	0.053	-0.184	-0.327	
CHR02FS198068947	198068947	0.46	0.164	0.146	-0.276	-0.572	
CHR02FS198069532	198069532	0.41	0.041	0.211	-0.095	-0.067	
CHR02FS198070483	198070483	0.42	0.144	0.039	0.170	-0.181	
CHR02FS198070781	198070781	0.4	0.435	0.058	-0.342	0.688	intron
CHR02FS198071351	198071351	0.42	0.456	-0.370	0.195	-0.218	intron <b>HSP60</b>
CHR02FS198072076	198072076	0.5	0.207	0.457	0.162	-0.108	intron <b>2,271 bp</b>
CHR02FS198072551	198072551	0.68	0.042	-0.522	0.366	-0.050	intron
CHR02FS198073051	198073051	0.56	0.007	-0.447	0.237	0.100	intron

			A12	D9	C6	B5	
PROBE_ID	POSITION	GC	RATIO	RATIO	RATIO	RATIO	
CHR02FS198073946	198073946	0.46	-0.058	-0.420	-0.174	-0.169	
CHR02FS198073956	198073956	0.46	0.115	-0.186	-0.180	-0.179	
CHR02FS198075068	198075068	0.43	0.388	-0.119	0.152	-0.108	
CHR02FS198075078	198075078	0.46	0.517	-0.473	-0.122	-0.196	
CHR02FS198075826	198075826	0.37	0.043	-0.116	-0.237	-0.094	
CHR02FS198076488	198076488	0.39	0.004	-0.391	0.259	-0.259	
CHR02FS198076883	198076883	0.4	0.231	-0.328	0.086	-0.019	
CHR02FS198077525	198077525	0.46	0.090	0.426	0.194	0.368	
CHR02FS198077930	198077930	0.46	-0.242	0.406	0.117	-0.091	
CHR02FS198078698	198078698	0.44	0.011	-0.069	-0.104	-0.175	
CHR02FS198079418	198079418	0.41	0.023	-0.392	-0.058	0.299	
CHR02FS198079776	198079776	0.38	-0.214	0.358	-0.085	-0.057	
CHR02FS198081642	198081642	0.44	0.125	-0.176	-0.186	-0.086	
CHR02FS198082117	198082117	0.48	-0.145	0.358	0.157	-0.076	
CHR02FS198082849	198082849	0.41	-0.077	-0.146	0.095	-0.212	
CHR02FS198083644	198083644	0.4	-0.124	1.016	0.069	0.535	intron
CHR02FS198084086	198084086	0.4	-0.041	-0.724	-0.098	0.009	
CHR02FS198085046	198085046	0.42	0.181	-0.508	-0.095	-0.121	
CHR02FS198085656	198085656	0.42	0.139	0.510	0.322	0.342	106 bp
CHR02FS198085761	198085761	0.39	0.271	-0.325	0.523	0.362	intron
CHR02FS198086786	198086786	0.44	-0.053	-0.249	0.170	0.315	
CHR02FS198087131	198087131	0.46	-0.030	0.269	-0.155	-0.180	
CHR02FS198087951	198087951	0.44	0.409	-0.181	-0.005	-0.191	
CHR02FS198088521	198088521	0.44	-0.283	0.302	-0.034	-0.131	
CHR02FS198088661	198088661	0.46	0.203	0.627	-0.055	-0.220	
CHR02FS198089126	198089126	0.6	-0.272	-0.418	-0.239	-0.062	
CHR02FS198089912	198089912	0.4	0.306	0.177	0.245	-0.093	
CHR02FS198090682	198090682	0.38	-0.221	-0.278	-0.021	0.078	
CHR02FS198092231	198092231	0.37	0.200	-0.243	0.176	-0.040	
CHR02FS198092546	198092546	0.39	0.097	-0.433	-0.044	-0.293	
CHR02FS198093028	198093028	0.39	0.045	0.166	-0.134	-0.040	
CHR02FS198093668	198093668	0.39	0.214	0.466	-0.095	0.305	
CHR02FS198096275	198096275	0.5	-0.015	0.979	0.091	0.026	intron PREI3
CHR02FS198096800	198096800	0.33	0.003	-0.317	0.217	0.002	
CHR02FS198097990	198097990	0.42	0.190	0.177	-0.018	-0.195	
CHR02FS198098721	198098721	0.38	0.136	-0.051	-0.252	-0.115	
CHR02FS198099750	198099750	0.44	0.050	-0.317	-0.259	-0.487	
CHR02FS198100193	198100193	0.38	0.099	-0.466	-0.227	-0.259	
CHR02FS198100707	198100707	0.44	0.116	-0.564	0.011	-0.125	
CHR02FS198101292	198101292	0.37	0.077	-0.200	-0.222	-0.205	
CHR02FS198101487	198101487	0.38	0.184	-0.219	-0.225	-0.154	
CHR02FS198103325	198103325	0.42	-0.213	-0.144	0.059	-0.202	
CHR02FS198103850	198103850	0.38	0.179	-0.281	-0.093	0.005	
CHR02FS198104462	198104462	0.34	0.073	-0.675	0.194	-0.110	
CHR02FS198105233	198105233	0.33	-0.146	-0.376	0.053	-0.096	
CHR02FS198105458	198105458	0.43	-0.185	0.410	-0.021	-0.102	
CHR02FS198106173	198106173	0.44	0.170	-0.696	-0.066	-0.425	
CHR02FS198106949	198106949	0.37	0.279	-0.716	-0.126	0.010	
CHR02FS198107069	198107069	0.4	0.185	-0.834	-0.130	-0.439	
CHR02FS198107824	198107824	0.44	-0.032	0.522	-0.253	0.201	
CHR02FS198108539	198108539	0.4	0.123	-0.199	0.056	0.040	
CHR02FS198108754	198108754	0.4	0.132	-0.226	0.015	-0.113	
CHR02FS198109480	198109480	0.33	0.029	-0.783	-0.133	-0.298	
CHR02FS198110021	198110021	0.4	0.013	-0.174	0.260	-0.143	1,706 bp PREI3
CHR02FS198110496	198110496	0.38	0.024	-0.721	0.172	-0.222	
CHR02FS198111513	198111513	0.44	0.094	-0.641	2.294	0.066	
CHR02FS198111720	198111720	0.43	-0.251	0.046	0.288	0.491	
CHR02FS198112157	198112157	0.41	-0.045	-0.049	-0.344	-0.073	
CHR02FS198113068	198113068	0.42	0.152	-0.636	-0.300	0.060	
CHR02FS198113603	198113603	0.4	0.054	-0.182	-0.280	-0.334	
CHR02FS198114208	198114208	0.38	0.090	-0.524	0.017	-0.066	
CHR02FS198114353	198114353	0.38	-0.057	0.360	0.143	-0.288	
CHR02FS198115284	198115284	0.39	0.361	-0.582	0.226	-0.095	
CHR02FS198115569	198115569	0.4	0.423	-0.457	-0.216	0.023	
CHR02FS198116334	198116334	0.43	0.094	0.014	-0.001	-0.130	
CHR02FS198116654	198116654	0.5	0.092	0.057	-0.129	-0.096	
CHR02FS198117333	198117333	0.41	-0.129	-0.103	-0.083	-0.015	
CHR02FS198117954	198117954	0.41	0.153	-0.189	-0.158	0.082	
CHR02FS198118690	198118690	0.43	0.238	-0.583	-0.160	0.026	
CHR02FS198119730	198119730	0.43	-0.060	0.113	0.146	0.115	
CHR02FS198120185	198120185	0.44	0.098	-0.219	0.131	-0.234	
CHR02FS198120590	198120590	0.4	1.194	-0.289	-0.148	-0.108	711 bp PREI3
CHR02FS198121300	198121300	0.43	0.186	0.684	-0.113	-0.439	
CHR02FS198121849	198121849	0.39	0.097	-0.592	0.397	0.111	
CHR02FS198122254	198122254	0.34	0.113	-0.639	0.001	-0.338	
CHR02FS198123244	198123244	0.4	0.288	-0.579	0.216	-0.434	
CHR02FS198123329	198123329	0.31	0.189	-0.701	0.355	0.111	
CHR02FS198124224	198124224	0.44	0.020	-0.634	-0.257	0.189	
CHR02FS198124834	198124834	0.4	0.058	-0.362	-0.058	-0.036	
CHR02FS198125124	198125124	0.46	0.043	-0.319	0.073	-0.124	
CHR02FS198125634	198125634	0.36	0.053	-0.439	0.357	-0.078	
CHR02FS198126580	198126580	0.38	0.070	-0.788	-0.078	-0.007	
CHR02FS198127085	198127085	0.41	-0.026	-0.087	-0.277	0.056	
CHR02FS198127510	198127510	0.32	-0.036	0.099	0.138	0.265	



PROBE_ID	POSITION	GC	A12	D9	C6	B5	
			RATIO	RATIO	RATIO	RATIO	
CHR02FS198127924	198127924	0.33	-0.203	-0.010	0.071	0.014	
CHR02FS198129198	198129198	0.43	-0.186	-0.142	-0.535	0.055	
CHR02FS198129608	198129608	0.46	0.063	0.034	-0.140	0.135	
CHR02FS198130540	198130540	0.41	0.048	0.314	0.154	0.055	
CHR02FS198130615	198130615	0.35	0.197	-0.943	0.086	-0.520	
CHR02FS198131736	198131736	0.33	0.104	-0.034	-0.044	-0.149	
CHR02FS198131926	198131926	0.4	0.198	0.233	0.153	0.325	
CHR02FS198132793	198132793	0.44	0.266	0.049	-0.151	0.095	
CHR02FS198133218	198133218	0.38	0.331	0.554	0.173	0.039	
CHR02FS198133468	198133468	0.44	0.019	-0.366	0.040	-0.239	
CHR02FS198134166	198134166	0.38	-0.051	-0.348	0.242	0.214	
CHR02FS198134766	198134766	0.4	0.304	-0.513	-0.031	-0.173	
CHR02FS198135263	198135263	0.39	-0.283	-0.280	-0.256	-0.502	
CHR02FS198140393	198140393	0.44	0.022	0.309	0.024	0.067	
CHR02FS198140798	198140798	0.39	-0.060	-0.665	0.364	0.149	
CHR02FS198141288	198141288	0.4	0.128	-0.158	-0.137	0.037	
CHR02FS198142158	198142158	0.39	0.173	0.438	-0.109	0.023	
CHR02FS198142418	198142418	0.33	0.066	-0.512	0.284	-0.034	
CHR02FS198143085	198143085	0.38	0.259	-0.932	-0.048	-0.089	
CHR02FS198144030	198144030	0.4	-0.019	-0.190	0.016	-0.557	
CHR02FS198144322	198144322	0.4	0.203	-0.327	-0.053	0.036	
CHR02FS198145163	198145163	0.43	0.056	0.157	-0.002	-0.061	
CHR02FS198145483	198145483	0.44	0.111	0.068	-0.233	-0.147	
CHR02FS198148336	198148336	0.42	0.114	-0.080	0.062	-0.150	
CHR02FS198148906	198148906	0.41	0.138	0.436	0.089	0.106	
CHR02FS198149266	198149266	0.44	-0.275	0.825	-0.110	0.049	
CHR02FS198149771	198149771	0.44	0.041	-0.127	-0.041	0.165	
CHR02FS198150328	198150328	0.46	0.043	-0.164	-0.032	-0.056	
CHR02FS198151078	198151078	0.44	-0.087	0.058	-0.380	-0.333	
CHR02FS198151988	198151988	0.46	-0.348	0.665	0.030	0.058	7,040 bp intron RFTN2
CHR02FS198153279	198153279	0.46	-0.074	-0.137	0.082	-0.059	
CHR02FS198153904	198153904	0.54	0.283	0.615	-0.156	0.255	
CHR02FS198155077	198155077	0.46	-0.124	0.015	-0.092	-0.408	
CHR02FS198155782	198155782	0.48	-0.024	0.714	-0.130	-0.046	
CHR02FS198156392	198156392	0.43	-0.229	0.341	-0.055	0.150	
CHR02FS198157677	198157677	0.46	-0.140	0.312	-0.372	0.227	
CHR02FS198158192	198158192	0.43	0.147	0.797	-0.105	-0.005	
CHR02FS198159027	198159027	0.46	0.088	0.325	-0.258	0.094	
CHR02FS198159597	198159597	0.42	0.187	-0.131	-0.300	-0.110	
CHR02FS198160815	198160815	0.44	0.133	0.512	0.326	0.211	
CHR02FS198160920	198160920	0.46	-0.063	-0.351	0.083	-0.164	
CHR02FS198161565	198161565	0.41	0.085	-0.014	-0.021	0.030	
CHR02FS198162598	198162598	0.32	0.064	-0.221	0.111	-0.309	
CHR02FS198163534	198163534	0.52	0.039	0.100	0.093	-0.052	
CHR02FS198164827	198164827	0.6	-0.117	-0.221	0.236	0.125	
CHR02FS198165082	198165082	0.4	-0.151	-0.272	-0.235	-0.141	
CHR02FS198165912	198165912	0.41	0.020	-0.076	0.061	-0.013	
CHR02FS198166447	198166447	0.42	-0.020	-0.045	0.188	0.198	
CHR02FS198166912	198166912	0.41	-0.098	0.061	0.043	0.075	
CHR02FS198167616	198167616	0.41	-0.039	0.372	-0.004	0.277	
CHR02FS198168176	198168176	0.43	-0.292	-0.126	-0.078	-0.003	
CHR02FS198168431	198168431	0.42	0.302	-0.006	-0.122	-0.113	
CHR02FS198168986	198168986	0.43	0.152	-0.462	-0.013	-0.078	
CHR02FS198169682	198169682	0.38	0.126	-0.230	0.050	-0.186	
CHR02FS198170287	198170287	0.46	0.116	-0.056	0.219	-0.396	
CHR02FS198170824	198170824	0.44	0.180	-0.526	0.023	-0.033	
CHR02FS198171566	198171566	0.42	0.135	0.833	0.122	0.599	1,886 bp. intron RFTN2
CHR02FS198171571	198171571	0.43	0.063	0.390	0.053	0.344	
CHR02FS198172351	198172351	0.44	-0.050	0.292	0.140	0.045	
CHR02FS198173126	198173126	0.43	0.155	-0.196	0.145	0.231	
CHR02FS198173451	198173451	0.46	0.205	0.301	0.156	-0.139	
CHR02FS198174086	198174086	0.43	0.137	0.006	-0.114	0.244	
CHR02FS198174776	198174776	0.44	0.204	-0.385	-0.038	-0.177	
CHR02FS198175411	198175411	0.38	-0.167	-0.326	0.193	0.000	
CHR02FS198176349	198176349	0.35	0.205	-0.889	-0.379	-0.071	
CHR02FS198177108	198177108	0.44	0.379	0.405	-0.233	-0.029	
CHR02FS198177263	198177263	0.42	0.179	-0.325	0.051	-0.038	
CHR02FS198178013	198178013	0.34	0.189	-0.042	0.032	0.036	
CHR02FS198178604	198178604	0.46	0.172	-0.416	-0.065	-0.114	
CHR02FS198179359	198179359	0.4	0.011	-0.315	0.160	-0.122	
CHR02FS198180541	198180541	0.31	0.121	-0.169	0.087	0.108	
CHR02FS198180683	198180683	0.44	0.017	-0.340	0.086	-0.094	
CHR02FS198181223	198181223	0.39	0.011	-0.016	0.373	0.153	
CHR02FS198184816	198184816	0.43	-0.059	-0.340	-0.109	-0.148	
CHR02FS198185451	198185451	0.43	-0.160	-0.661	-0.504	0.157	
CHR02FS198185646	198185646	0.39	0.088	-0.071	0.041	0.421	
CHR02FS198186231	198186231	0.39	-0.134	0.164	0.345	-0.237	
CHR02FS198187116	198187116	0.43	0.150	0.470	-0.041	-0.084	
CHR02FS198187830	198187830	0.38	0.133	-0.327	-0.040	-0.062	
CHR02FS198188051	198188051	0.52	0.142	0.411	-0.044	-0.108	
CHR02FS198188814	198188814	0.4	-0.061	-0.473	-0.304	-0.442	
CHR02FS198189114	198189114	0.42	-0.202	0.137	-0.293	-0.484	
CHR02FS198189561	198189561	0.43	-0.125	0.582	0.189	0.264	

PROBE_ID	POSITION	GC	A12	D9	C6	B5	
			RATIO	RATIO	RATIO	RATIO	
CHR02FS198190166	198190166	0.44	-0.032	-0.289	0.112	-0.193	
CHR02FS198190756	198190756	0.42	0.265	0.213	0.198	-0.264	
CHR02FS198193380	198193380	0.4	0.086	0.383	0.037	-0.047	
CHR02FS198193583	198193583	0.4	-0.020	0.173	0.247	-0.309	
CHR02FS198194289	198194289	0.48	-0.051	-0.236	0.204	-0.116	
CHR02FS198194834	198194834	0.48	-0.089	0.159	-0.008	-0.162	
CHR02FS198195584	198195584	0.43	-0.141	-0.209	0.089	0.047	
CHR02FS198195794	198195794	0.48	0.012	-0.072	0.212	-0.085	
CHR02FS198196344	198196344	0.4	0.025	-0.637	0.065	-0.242	
CHR02FS198197219	198197219	0.35	0.062	-0.730	-0.128	-0.201	
CHR02FS198198210	198198210	0.46	-0.231	0.523	0.128	-0.042	RFTN2 4,020 bp intron
CHR02FS198198585	198198585	0.42	0.405	1.076	-0.008	0.442	
CHR02FS198199113	198199113	0.4	-0.065	0.146	0.337	0.133	
CHR02FS198200138	198200138	0.46	0.313	0.263	-0.168	0.392	
CHR02FS198200268	198200268	0.43	-0.045	0.883	-0.199	0.073	
CHR02FS198201238	198201238	0.44	-0.038	0.229	0.310	0.058	
CHR02FS198201628	198201628	0.37	0.103	-0.855	-0.124	-0.213	
CHR02FS198201918	198201918	0.4	0.087	0.421	0.142	-0.027	
CHR02FS198203069	198203069	0.4	0.071	0.375	0.196	0.101	
CHR02FS198203635	198203635	0.36	-0.068	-0.386	-0.085	-0.188	
CHR02FS198204355	198204355	0.38	0.198	-0.678	0.128	0.080	
CHR02FS198204770	198204770	0.44	0.159	0.168	0.438	0.190	
CHR02FS198205665	198205665	0.46	0.068	0.394	0.007	-0.116	
CHR02FS198205810	198205810	0.38	-0.250	0.165	-0.009	0.137	
CHR02FS198206825	198206825	0.4	-0.078	-0.040	0.001	-0.034	
CHR02FS198207250	198207250	0.39	-0.148	-0.450	0.121	-0.371	
CHR02FS198207476	198207476	0.39	0.074	-0.617	-0.187	-0.309	
CHR02FS198213754	198213754	0.38	-0.053	-0.221	0.108	0.183	
CHR02FS198214424	198214424	0.44	0.213	0.299	0.124	-0.432	
CHR02FS198214886	198214886	0.4	0.322	-0.233	0.205	-0.421	
CHR02FS198215531	198215531	0.33	-0.012	-0.809	0.292	-0.130	
CHR02FS198215986	198215986	0.3	0.153	0.092	-0.045	-0.022	
CHR02FS198216461	198216461	0.34	-0.382	-0.287	0.041	0.145	
CHR02FS198217240	198217240	0.44	-0.044	-0.462	0.132	-0.174	
CHR02FS198217630	198217630	0.4	-0.077	-0.383	-0.062	-0.394	
CHR02FS198218233	198218233	0.44	-0.123	-0.133	-0.003	-0.162	
CHR02FS198219081	198219081	0.46	0.089	-0.141	-0.184	0.004	
CHR02FS198219451	198219451	0.43	-0.183	0.304	0.073	0.182	
CHR02FS198220114	198220114	0.32	-0.098	-0.306	0.060	0.222	
CHR02FS198220774	198220774	0.34	0.063	-0.583	0.022	0.418	
CHR02FS198221014	198221014	0.46	-0.112	0.557	0.095	-0.355	
CHR02FS198221685	198221685	0.46	-0.127	0.043	0.129	-0.215	
CHR02FS198222580	198222580	0.48	0.080	0.423	0.256	0.150	
CHR02FS198222725	198222725	0.44	0.024	0.150	0.073	-0.188	
CHR02FS198223462	198223462	0.43	0.020	-0.224	-0.154	0.146	
CHR02FS198223872	198223872	0.4	0.309	-0.277	0.353	0.055	
CHR02FS198224795	198224795	0.38	0.060	-0.085	-0.089	0.184	
CHR02FS198225335	198225335	0.42	0.214	-0.412	-0.356	-0.564	
CHR02FS198225860	198225860	0.38	0.075	-0.171	0.089	-0.056	
CHR02FS198226120	198226120	0.42	-0.054	0.242	0.027	-0.402	
CHR02FS198227003	198227003	0.39	-0.255	-0.296	0.506	-0.100	
CHR02FS198227563	198227563	0.44	0.140	0.072	-0.032	-0.036	
CHR02FS198228204	198228204	0.44	-0.120	-0.378	-0.201	-0.126	
CHR02FS198228269	198228269	0.37	0.049	-0.512	-0.053	0.232	
CHR02FS198229227	198229227	0.4	0.035	0.156	0.358	-0.048	
CHR02FS198229472	198229472	0.48	0.065	0.552	-0.003	0.181	
CHR02FS198230221	198230221	0.43	-0.084	0.232	0.140	-0.111	
CHR02FS198230646	198230646	0.43	-0.373	0.241	-0.403	-0.071	
CHR02FS198231202	198231202	0.42	0.213	0.319	0.003	-0.210	
CHR02FS198231607	198231607	0.44	-0.211	0.644	-0.231	0.009	
CHR02FS198232890	198232890	0.35	0.049	-0.370	-0.424	-0.408	
CHR02FS198234020	198234020	0.44	0.309	1.246	-0.245	0.145	
CHR02FS198234525	198234525	0.4	0.269	-0.388	-0.088	0.124	
CHR02FS198236376	198236376	0.4	-0.102	-0.842	-0.190	-0.065	
CHR02FS198237879	198237879	0.44	-0.085	-0.914	-0.272	-0.208	
CHR02FS198238510	198238510	0.37	-0.167	-0.536	-0.034	-0.000	
CHR02FS198238980	198238980	0.48	0.242	0.460	0.033	0.033	
CHR02FS198239710	198239710	0.37	0.215	-1.153	-0.156	-0.444	
CHR02FS198240415	198240415	0.42	-0.178	-0.885	-0.338	-0.457	
CHR02FS198240970	198240970	0.46	-0.303	0.023	0.175	0.448	
CHR02FS198241645	198241645	0.46	-0.463	1.173	-0.247	0.281	
CHR02FS198241810	198241810	0.46	-0.455	0.805	-0.091	0.579	
CHR02FS198242290	198242290	0.41	0.349	-0.529	-0.255	-0.182	
CHR02FS198242920	198242920	0.42	0.011	0.833	0.231	0.021	
CHR02FS198243676	198243676	0.41	-0.154	-0.239	-0.076	-0.454	
CHR02FS198244106	198244106	0.43	0.247	-0.266	0.024	0.222	
CHR02FS198244521	198244521	0.44	0.109	-0.812	-0.298	-0.482	
CHR02FS198245236	198245236	0.46	0.355	-0.044	-0.153	-0.155	
CHR02FS198245951	198245951	0.44	-0.036	0.230	-0.033	-0.192	
CHR02FS198246465	198246465	0.46	-0.350	-0.201	0.201	0.055	
CHR02FS198246780	198246780	0.37	0.238	-0.045	0.046	0.246	
CHR02FS198247844	198247844	0.38	0.137	-0.906	-0.036	-0.191	
CHR02FS198248369	198248369	0.43	0.084	-0.096	0.199	-0.005	
CHR02FS198248729	198248729	0.46	0.127	-0.122	0.003	0.319	

PROBE ID	POSITION	GC	A12	D9	C6	B5
			RATIO	RATIO	RATIO	RATIO
CHR02FS198249452	198249452	0.32	0.159	-0.472	0.326	0.333
CHR02FS198250029	198250029	0.46	-0.286	0.350	0.131	-0.081
CHR02FS198250564	198250564	0.48	0.262	0.170	0.195	0.062
CHR02FS198251104	198251104	0.39	0.120	-0.575	0.099	-0.038
CHR02FS198251419	198251419	0.44	-0.190	-0.429	0.060	0.177
CHR02FS198251793	198251793	0.38	-0.005	-0.192	0.161	-0.429
CHR02FS198252857	198252857	0.37	0.104	0.471	0.068	0.014
CHR02FS198253192	198253192	0.44	0.241	-0.067	-0.024	-0.236
CHR02FS198253596	198253596	0.42	-0.031	0.301	-0.320	0.201
CHR02FS198254376	198254376	0.4	-0.278	-0.221	0.148	-0.032
CHR02FS198254656	198254656	0.46	0.109	0.116	-0.224	0.011
CHR02FS198256713	198256713	0.37	-0.063	-0.093	-0.311	-0.158
CHR02FS198257088	198257088	0.38	0.007	-0.012	0.045	0.106
CHR02FS198257563	198257563	0.38	0.310	0.032	0.017	0.050
CHR02FS198258428	198258428	0.46	-0.036	-0.409	0.192	-0.216
CHR02FS198258573	198258573	0.46	0.151	-0.091	0.198	-0.486
CHR02FS198260043	198260043	0.4	-0.023	-0.107	-0.297	0.268
CHR02FS198267707	198267707	0.44	0.028	-0.232	0.141	0.024
CHR02FS198268282	198268282	0.48	0.301	-0.642	-0.127	-0.284
CHR02FS198270595	198270595	0.4	-0.011	-0.497	0.222	-0.068
CHR02FS198271215	198271215	0.4	0.151	-1.009	0.071	-0.136
CHR02FS198271790	198271790	0.4	0.223	-0.880	-0.300	-0.071
CHR02FS198272595	198272595	0.38	0.060	-0.834	-0.041	-0.362
CHR02FS198273232	198273232	0.36	-0.202	-0.561	-0.029	0.068
CHR02FS198274210	198274210	0.43	-0.103	-0.293	0.176	0.067
CHR02FS198274610	198274610	0.42	-0.040	-0.423	-0.201	0.032
CHR02FS198275095	198275095	0.38	0.011	0.187	-0.270	-0.336
CHR02FS198275380	198275380	0.42	-0.072	0.071	-0.278	-0.275
CHR02FS198276820	198276820	0.38	0.228	-0.693	-0.102	-0.205
CHR02FS198277125	198277125	0.44	0.338	-0.271	-0.032	-0.244
CHR02FS198278071	198278071	0.41	0.190	-0.091	-0.037	-0.047
CHR02FS198278486	198278486	0.48	-0.083	-0.010	-0.031	0.122
CHR02FS198278856	198278856	0.54	0.168	0.543	0.521	0.140
CHR02FS198279746	198279746	0.43	-0.211	0.396	0.212	0.028
CHR02FS198280021	198280021	0.44	-0.116	-0.182	0.160	0.158
CHR02FS198280727	198280727	0.44	0.456	-0.179	0.183	0.024
CHR02FS198281518	198281518	0.4	-0.200	0.115	0.340	-0.231
CHR02FS198282083	198282083	0.43	-0.012	0.455	-0.037	0.092
CHR02FS198282108	198282108	0.43	-0.070	0.321	-0.043	0.031
CHR02FS198282727	198282727	0.46	0.065	0.297	-0.127	0.128
CHR02FS198283528	198283528	0.44	-0.280	0.074	-0.017	0.225
CHR02FS198284251	198284251	0.4	0.081	0.105	0.165	0.120
CHR02FS198284501	198284501	0.43	-0.036	1.533	0.351	0.537
CHR02FS198284896	198284896	0.38	0.166	-0.326	0.165	0.178
CHR02FS198285954	198285954	0.44	0.264	-0.675	-0.197	-0.337
CHR02FS198286359	198286359	0.43	0.119	0.033	-0.025	-0.077
CHR02FS198287132	198287132	0.39	0.219	0.088	-0.310	-0.080
CHR02FS198287522	198287522	0.44	0.075	-0.238	-0.250	-0.283
CHR02FS198287987	198287987	0.42	-0.087	-1.246	-0.157	0.245
CHR02FS198288742	198288742	0.42	-0.308	-0.416	-0.453	-0.169
CHR02FS198289032	198289032	0.39	-0.058	0.283	0.116	0.211
CHR02FS198289718	198289718	0.38	0.272	-0.834	0.028	-0.433
CHR02FS198289948	198289948	0.33	-0.193	-0.386	0.081	-0.002
CHR02FS198291009	198291009	0.33	-0.150	-0.952	0.107	-0.114
CHR02FS198291284	198291284	0.38	-0.246	-0.167	0.027	0.049
CHR02FS198291644	198291644	0.4	0.123	-0.346	0.083	0.163
CHR02FS198292741	198292741	0.44	-0.050	-0.738	-0.067	-0.148
CHR02FS198292751	198292751	0.48	-0.022	-0.380	-0.230	-0.448
CHR02FS198293523	198293523	0.44	-0.421	0.271	-0.044	0.191
CHR02FS198294093	198294093	0.43	-0.192	0.367	-0.120	-0.017
CHR02FS198294587	198294587	0.37	0.036	-0.167	-0.207	-0.198
CHR02FS198295362	198295362	0.44	-0.018	0.337	0.124	0.022
CHR02FS198295767	198295767	0.38	-0.279	-0.207	0.011	0.040
CHR02FS198296545	198296545	0.38	-0.058	-0.222	0.064	-0.274
CHR02FS198296760	198296760	0.38	0.199	-0.668	-0.008	-0.217
CHR02FS198297345	198297345	0.48	-0.268	0.224	-0.056	0.232
CHR02FS198298165	198298165	0.43	0.114	-0.807	0.109	-0.216
CHR02FS198298405	198298405	0.4	0.037	-0.487	0.177	0.147
CHR02FS198298935	198298935	0.39	-0.169	-0.514	-0.178	-0.040
CHR02FS198299607	198299607	0.4	0.140	-0.254	0.095	-0.164
CHR02FS198300187	198300187	0.4	-0.071	-0.030	-0.067	0.296
CHR02FS198300663	198300663	0.4	0.055	-0.343	0.320	0.082
CHR02FS198301403	198301403	0.43	-0.093	0.075	-0.095	-0.312
CHR02FS198301723	198301723	0.38	0.241	0.184	0.088	0.208
CHR02FS198308185	198308185	0.4	0.130	-0.622	-0.143	-0.145
CHR02FS198308860	198308860	0.43	-0.230	0.290	0.211	-0.341
CHR02FS198309130	198309130	0.38	0.208	-0.108	0.070	0.208
CHR02FS198309643	198309643	0.38	0.481	-0.153	-0.183	-0.066
CHR02FS198310313	198310313	0.4	-0.104	-0.037	0.221	-0.169
CHR02FS198310758	198310758	0.39	-0.243	-0.019	-0.053	-0.398
CHR02FS198311468	198311468	0.44	-0.254	-0.408	0.138	-0.147
CHR02FS198311978	198311978	0.36	0.080	-0.108	-0.425	-0.213

MARS2

## CONCLUSION

Les études de liaison génétique ont permis de localiser la région chromosomique où se situe le gène muté responsable d'ARSAL. Le succès des études de liaison génétique provient d'une part du nombre de familles étudiées. Un plus grand nombre de familles contenant des cas présentant le même phénotype permet d'obtenir un chevauchement des intervalles candidats propres à chaque famille, dû aux différentes recombinaisons génétiques des différentes familles, et de définir un plus petit intervalle candidat commun à toutes les familles. La qualité des marqueurs microsatellites utilisés pour la cartographie fine de la région contribue aussi à la bonne définition de l'intervalle.

Dans ce projet, la faible densité de marqueurs microsatellites de qualité dans la région a contribué à une mauvaise définition du petit intervalle candidat par l'identification de faux recombinants familiaux. De plus, la forte concentration de gènes dans la région (plus de 135 gènes dans l'intervalle conservateur de 10cM) a suscité un défi de taille pour l'approche gène candidats. Au total, plus de 37 gènes ont été séquencés et analysés pour l'identification de variants. Pour chacun d'eux, six individus atteints d'ARSAL et deux ADN contrôle canadien-français ont été amplifiés. Aucune mutation n'a été trouvée dans les régions codantes 5' et 3'UTR. Les promoteurs, exons alternatifs et variants d'épissage spécifiques à certains tissus n'ont toutefois pas été investigués pour chacun des candidats.

Des méthodes alternatives de détection de mutations à base d'ADN génomiques ont été effectuées par micropuce SNP et puce CGH. De cette façon, les changements dans le nombre de copies ont pu être détectés. Les micropuces de génotypage SNP nous ont permis de confirmer le locus de la maladie, de réduire l'intervalle candidat et d'effectuer les études de variation du nombre de copies. Les limites de l'analyse PENNCNV repose sur la faible densité de la micropuce d'ADN. La HAP300 inclut, en moyenne, un SNP tous les 10 kilobases à travers tout le génome et couvre approximativement 87 % des variations génétiques communes dans la population caucasienne. Ainsi, un minimum de cinq SNP consécutifs, démontrant une variation de

copies, est nécessaire afin de confirmer la présence d'un CNV avec certitude. En comparaison avec les algorithmes de CNV précédemment publiés, la méthode PENNCNV est capable d'identifier les structures génétiques de CNVs avec une taille médiane de 12 Ko, ce qui est beaucoup plus petit que des études expérimentales précédentes où la taille médiane était de 50 Ko [18-20]. Les limites de cette analyse résident aussi au fait que les micropuces Illumina ont été conçues avec les données de déséquilibre de liaison du projet HapMap [21;22], ce qui a pour effet que les SNPs ne sont pas uniformément distribués. Ainsi, les petits CNVs peuvent être complètement manqués s'ils sont localisés entre deux SNPs éloignés [22]. Nous avons identifié en moyenne 86 CNVs pour chaque individu avec une taille médiane de 141 000 pb (Table CNV PENNCNV, ANNEXE 1). Ces valeurs sont de beaucoup supérieures à celles rapportées dans la littérature, soit une moyenne de 27 CNVs par individus ayant une de taille moyenne de 12 kpb [2]. Selon Yang et al, le nombre de CNVs identifiés via les puce Illumina HAP500 varie de quatre à 20 pour chaque individu (moyenne = 8.5; SD = 2.9). La taille de ces CNVs est de 12 447 pb à 885 204 pb (moyenne = 148 135 pb) [23]. Leurs observations suggèrent que le nombre moyen et la taille des CNVs identifiés dans les individus affectés ne sont pas significativement différents de ceux identifiés dans les individus contrôles ( $P = 0.300$ ) [23]. L'utilisation d'informations familiales permet une meilleure caractérisation des CNVs en réduisant le risque de faux-positifs et faux-négatifs, surtout lors de l'utilisation de lignées cellulaires immortalisées par le virus Epstein-Barr. Récemment, les études CNVs sur l'ADN de ligne cellulaire ont révélé des fréquences élevées de réarrangements chromosomiques, et ce dans plusieurs régions d'immunoglobine [24;25]. Étant donné que la grande majorité des CNVs sont hérités des parents, les mesures indirectes de faux-positifs et les mesures de sensibilité de PENNCNV indiquent un taux de faux-positif de 1.0 % et une sensibilité de 82.2 % [2]. Pour notre étude, tous les ADN utilisés étaient extraits de prélèvement sanguin, diminuant ainsi notre taux de faux-positifs à environ 0.2% [2]. Bien que pour seulement deux familles, soit la famille A et B, nous avons un parent et plus d'un atteint, il est remarquable de noter la différence dans le nombre de CNVs détectés, et ce même pour le chromosome 2 uniquement (Table 2). Il est suggéré que les CNVs de novo soient augmentés d'environ 24 % dans la progéniture versus leurs parents [2] et que la plupart des CNVs de novo

originent du chromosome paternel [2]. Les récentes études d'expression des gènes localisés dans les CNVs révèlent un effet substantiel d'au moins 17.7 % sur l'expression génique [26]. Vu le faible nombre d'individus dans notre étude, il est difficile de tirer des conclusions. Toutefois, il est intéressant de noter que le nombre de CNVs semblent corrélés avec la sévérité. La confirmation interfamiliale de CNVs communs, la validation expérimentale et la cartographie précise de leur localisation représentent un aspect important à ne pas négliger lors d'études pathomoléculaires et de afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles des divers réarrangements détectés.

L'utilisation de la puce CGH de Nimblegen, spécifique au chromosome 2, offrait la meilleure densité pour ce type d'analyse en 2007. Bien que sa densité fût beaucoup plus élevée que la puce SNP d'Illumina, nous n'avons pas identifié de CNVs partagés entre les patients ARSAL pour notre intervalle. En effet, la densité du CGH permettait la détection de CNV de 5-10 kilobases. Toutefois, l'analyse des données nous a permis de constater que l'espacement moyen entre les sondes pour l'intervalle de 0.658Mb était de plus de 1000 pb. Cette densité réduite a contribué à une diminution des chances de détection de microdélétion, microinsertion ou réarrangements complexes.

Les maladies génétiques et héréditaires sont causées par une variété de changements ou de type de mutations dans l'ADN. L'avancement des technologies de pointe et leur accessibilité permet d'accélérer le criblage des régions et gènes candidats. Les résultats présentés dans ce chapitre soulignent la nécessité de combiner différentes technologies et d'évaluer leurs limites [27].

Il est important d'investiguer pour les réarrangements puisque de plus en plus de maladies neurologiques, et pas seulement les cancers, sont causées par des mutations telles que des délétions, insertions, duplications, réarrangements complexes pouvant même impliquer plusieurs gènes [28;29]. Avec les résultats obtenus, il est clair que la région d'ARSAL n'est pas causée par un réarrangement englobant plusieurs gènes. Toutefois, il est possible qu'un petit réarrangement de la région n'ait pas été détecté par les deux méthodes utilisées.

### Reference List

- [1] E.A.Adie, R.R.Adams, K.L.Evans, D.J.Porteous, B.S.Pickard. Speeding disease gene discovery by sequence based candidate prioritization, *BMC Bioinformatics*. 6 (2005) 55.
- [2] K.Wang, M.Li, D.Hadley, R.Liu, J.Glessner, S.F.Grant, H.Hakonarson, M.Bucan. PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data, *Genome Res*. 17 (2007) 1665-1674.
- [3] D.Kaida, H.Motoyoshi, E.Tashiro, T.Nojima, M.Hagiwara, K.Ishigami, H.Watanabe, T.Kitahara, T.Yoshida, H.Nakajima, T.Tani, S.Horinouchi, M.Yoshida. Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA, *Nat Chem Biol*. 3 (2007) 576-583.
- [4] C.L.Will, H.Urlaub, T.Achsel, M.Gentzel, M.Wilm, R.Luhrmann. Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein, *EMBO J*. 21 (2002) 4978-4988.
- [5] C.M.Quinzii, A.G.Kattah, A.Naini, H.O.Akman, V.K.Mootha, S.Dimauro, M.Hirano. Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation, *Neurology*. 64 (2005) 539-541.
- [6] C.M.Quinzii, L.C.Lopez, A.Naini, S.Dimauro, M.Hirano. Human CoQ10 deficiencies, *Biofactors*. 32 (2008) 113-118.
- [7] J.J.Hansen, A.Durr, I.Cournu-Rebeix, C.Georgopoulos, D.Ang, M.N.Nielsen, C.S.Davoine, A.Brice, B.Fontaine, N.Gregersen, P.Bross. Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60, *Am J Hum Genet*. 70 (2002) 1328-1332.
- [8] T.J.Venner, R.S.Gupta. Nucleotide sequence of rat hsp60 (chaperonin, GroEL homolog) cDNA, *Nucleic Acids Res*. 18 (1990) 5309.
- [9] T.J.Venner, R.S.Gupta. Nucleotide sequence of mouse HSP60 (chaperonin, GroEL homolog) cDNA, *Biochim Biophys Acta*. 1087 (1990) 336-338.

- [10] D.Magen, C.Georgopoulos, P.Bross, D.Ang, Y.Segev, D.Goldsher, A.Nemirovski, E.Shahar, S.Ravid, A.Luder, B.Heno, R.Gershoni-Baruch, K.Skorecki, H.Mandel. Mitochondrial hsp60 chaperonopathy causes an autosomal-recessive neurodegenerative disorder linked to brain hypomyelination and leukodystrophy, *Am J Hum Genet.* 83 (2008) 30-42.
- [11] G.L.Temeles, P.T.Ram, J.L.Rothstein, R.M.Schultz. Expression patterns of novel genes during mouse preimplantation embryogenesis, *Mol Reprod Dev.* 37 (1994) 121-129.
- [12] A.C.Spencer, A.Heck, N.Takeuchi, K.Watanabe, L.L.Sprengli. Characterization of the human mitochondrial methionyl-tRNA synthetase, *Biochemistry.* 43 (2004) 9743-9754.
- [13] A.Antonellis, S.Q.Lee-Lin, A.Wasterlain, P.Leo, M.Quezado, L.G.Goldfarb, K.Myung, S.Burgess, K.H.Fischbeck, E.D.Green. Functional analyses of glycyl-tRNA synthetase mutations suggest a key role for tRNA-charging enzymes in peripheral axons, *J Neurosci.* 26 (2006) 10397-10406.
- [14] S.Edvardson, A.Shaag, O.Kolesnikova, J.M.Gomori, I.Tarassov, T.Einbinder, A.Saada, O.Elpeleg. Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia, *Am J Hum Genet.* 81 (2007) 857-862.
- [15] P.A.James, M.Z.Cader, F.Muntoni, A.M.Childs, Y.J.Crow, K.Talbot. Severe childhood SMA and axonal CMT due to anticodon binding domain mutations in the GARS gene, *Neurology.* 67 (2006) 1710-1712.
- [16] G.C.Scheper, K.T.van der, R.J.van Andel, C.G.van Berkel, M.Sissler, J.Smet, T.I.Muravina, S.V.Serkov, G.Uziel, M.Bugiani, R.Schiffmann, I.Krageloh-Mann, J.A.Smeitink, C.Florentz, C.R.van, J.C.Pronk, M.S.van der Knaap. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation, *Nat Genet.* 39 (2007) 534-539.
- [17] E.Y.Xu, F.L.Moore, R.A.Pera. A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (2001) 7414-7419.



- [18] D.F.Conrad, M.E.Hurles. The population genetics of structural variation, *Nat Genet.* 39 (2007) S30-S36.
- [19] S.A.McCarroll, D.M.Altshuler. Copy-number variation and association studies of human disease, *Nat Genet.* 39 (2007) S37-S42.
- [20] S.A.McCarroll. Copy-number analysis goes more than skin deep, *Nat Genet.* 40 (2008) 5-6.
- [21] F.J.Steemers, K.L.Gunderson. Illumina, Inc, *Pharmacogenomics.* 6 (2005) 777-782.
- [22] F.J.Steemers, K.L.Gunderson. Whole genome genotyping technologies on the BeadArray platform, *Biotechnol J.* 2 (2007) 41-49.
- [23] S.Yang, K.Wang, B.Gregory, W.Berrettini, L.S.Wang, H.Hakonarson, M.Bucan. Genomic landscape of a three-generation pedigree segregating affective disorder, *PLoS One.* 4 (2009) e4474.
- [24] J.Simon-Sanchez, M.Hanson, A.Singleton, D.Hernandez, A.McInerney, R.Nussbaum, J.Werner, M.Gallardo, R.Weiser, K.Gwinn-Hardy, A.B.Singleton, J.Clarimon. Analysis of SCA-2 and SCA-3 repeats in Parkinsonism: evidence of SCA-2 expansion in a family with autosomal dominant Parkinson's disease, *Neurosci Lett.* 382 (2005) 191-194.
- [25] J.Simon-Sanchez, S.Scholz, H.C.Fung, M.Matarin, D.Hernandez, J.R.Gibbs, A.Britton, F.W.de Vrieze, E.Peckham, K.Gwinn-Hardy, A.Crawley, J.C.Keen, J.Nash, D.Borgaonkar, J.Hardy, A.Singleton. Genome-wide SNP assay reveals structural genomic variation, extended homozygosity and cell-line induced alterations in normal individuals, *Hum Mol Genet.* 16 (2007) 1-14.
- [26] B.E.Stranger, M.S.Forrest, M.Dunning, C.E.Ingle, C.Beazley, N.Thorne, R.Redon, C.P.Bird, G.A.de, C.Lee, C.Tyler-Smith, N.Carter, S.W.Scherer, S.Tavare, P.Deloukas, M.E.Hurles, E.T.Dermitzakis. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes, *Science.* 315 (2007) 848-853.
- [27] M.R.Hegde, E.L.Chin, J.G.Mulle, D.T.Okou, S.T.Warren, M.E.Zwick. Microarray-based mutation detection in the dystrophin gene, *Hum Mutat.* 29 (2008) 1091-1099.

- [28] D.T.Miller, Y.Shen, L.A.Weiss, J.Korn, I.Anselm, C.Bridgemohan, G.F.Cox, H.Dickinson, J.Gentile, D.J.Harris, V.Hegde, R.Hundley, O.Khwaja, S.Kothare, C.Luedke, R.Nasir, A.Poduri, K.Prasad, P.Raffalli, A.Reinhard, S.E.Smith, M.M.Sobeih, J.S.Soul, J.Stoler, M.Takeoka, W.H.Tan, J.Thakuria, R.Wolff, R.Yusupov, J.F.Gusella, M.J.Daly, B.L.Wu. Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders, *J Med Genet.* 46 (2009) 242-248.
- [29] F.Zhang, W.Gu, M.E.Hurles, J.R.Lupski. Copy number variation in human health, disease, and evolution, *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 10 (2009) 451-481.

## **CHAPITRE IV:**

### **IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES MUTATIONS DANS LE GÈNE RESPONSABLE DE L'ARSAL**

### **Contribution des co-auteurs**

**I. Thiffault** a participé à toutes les étapes du projet; soit le recrutement des patients, la sélection des gènes candidats, la bioinformatique, le séquençage et l'analyses des gènes ayant abouti à l'identification du gène de la maladie, la caractérisation des mutations, l'analyses CGH, CNV, Southern Blot, Northern Blot, qPCR et Western blot. Elle a produit majoritairement les figures, tables et l'écriture de l'article.

**M. Tétreault** a participé au séquençage, la planification des expériences, l'étude CGH, qPCR, la caractérisation des mutations et à la révision du manuscrit.

**F. Sasarman** a effectué les expériences et les analyses mitochondriales.

**G. Bernard** a participé recrutement des patients, planification et pratique des biopsies de peau, révision des dossiers des patients, remplir les tables cliniques.

**J. Demers-Lamarche** a participé au séquençage, à l'analyse des séquences et à la caractérisation des mutations.

**L. Loisel** a participé recrutement et à la planification des biopsies de peau.

**MJ. Dicaire** a participé à l'extraction d'ADN, Southern et Northern Blot.

**V. Bayat** a participé à la caractérisation des mutations et aux discussions sur le modèle de pathogenèse de l'ARSAL.

**J. Mathieu** a participé au recrutement et à la caractérisation clinique des cas.

**M. Vanasse** a participé au recrutement et la caractérisation clinique des cas.

**JP. Bouchard** a participé au recrutement et la caractérisation clinique des cas.

**MF. Rioux** a participé au recrutement et la caractérisation clinique des cas.

**J. Lesage** a participé à la caractérisation radiologique des cas (révision des IRM).

**H. Bellen** a participé à la caractérisation et aux discussions sur le modèle de pathogenèse de l'ARSAL.

**E. Shoubridge** a participé à la caractérisation, au développement des expériences et aux analyses des essais mitochondriaux.

**B. Brais** a supervisé toutes les étapes du projet, le recrutement de la cohorte, la caractérisation des patients et l'élaboration du manuscrit.

**Complex rearrangements into the Mitochondrial Methionyl-tRNA Synthetase caused by DNA replication-based mechanism lead to ARSAL syndrome**

Isabelle Thiffault<sup>1</sup>, Martine Tetreault<sup>1</sup>, Florin Sasarman<sup>2</sup>, Genevieve Bernard<sup>1</sup>, Julie Demers-Lamarche<sup>1</sup>, Lina Loisel<sup>1</sup>, Marie-Josée Dicaire<sup>1</sup>, Vafa Bayat<sup>3</sup>, Jean Mathieu<sup>4</sup>, Michel Vanasse<sup>5</sup>, Jean-Pierre Bouchard<sup>6</sup>, Marie-France Rioux<sup>7</sup>, Jean Lesage<sup>8</sup>, Hugo J. Bellen<sup>3</sup>, Eric A. Shoubridge<sup>2</sup> and Bernard Brais<sup>1, 3, 4</sup>

1. Laboratoire de neurogénétique de la motricité, Centre d'excellence en Neuromique de l'Université de Montréal, CRCHUM Centre de recherche du CHUM, Montréal, QC, Canada
2. Departments of Molecular Neurogenetics and Department of Human Genetics, MNI-McGill University, Montreal, QC, Canada
3. Department of Molecular and Human Genetics and Howard Hughes Medical Institute, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, USA
4. Clinique des maladies neuromusculaires, Carrefour de la Santé de Jonquière, Saguenay, QC, Canada
5. Clinique des maladies neuromusculaires, Centre de réadaptation Marie Enfant, CHU Mère Enfant Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada
6. Service de neurologie, Hôpital de l'Enfant-Jésus, Université Laval, Québec, Qc, Canada
7. Service de neurologie, Centre hospitalier de l'Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada
8. Radiology Department, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

---

\*\*Article en préparation pour "Letter" Nature Genetics Journal

**ABSTRACT**

Abnormal mitochondrial protein synthesis appears to be a shared pathogenic mechanism for many ataxias and inherited leukoencephalopathies. We identified mutations of the mitochondrial methionyl-tRNA synthetase (*MARS2*) gene that cause Autosomal Recessive Spastic Ataxia with Leukoencephalopathy (ARSAL, OMIM 611390). ARSAL is the third leukoencephalopathy caused by mutations in a mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetase (AARS) genes. The common ARSAL mutations consist of complex genomic rearrangements modifying the 5' sequence of *MARS2*. The *MARS2* duplications responsible for these mutations appear to have been mediated by repetitive AluSx elements. The instability of the mutated 5' sequences may contribute to the important intra and inter familial clinical variability. Despite the increase in *MARS2* copy number and expression levels in ARSAL cases, a significant decrease in mitochondrial protein synthesis is observed supporting an underlining loss-of-function mechanism. Sequencing of the mutated 5' of *MARS2* supports the hypothesis that Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS) may be responsible for the complex rearrangement associated with the copy number variation (CNV). ARSAL is the first autosomal recessive disorder to be caused by complex CNV associated with gene duplication. The identification of 55 cases and the independent occurrence of at least two complex CNV *MARS2* mutations in the French-Canadian population suggest that it could be a common form of recessive spastic ataxia worldwide..

Key Words: spastic ataxia; paraplegia; complex rearrangements; CNV; FoSTeS

## INTRODUCTION

Recessive ataxias are a heterogeneous group of neurological disorders characterized by coordination difficulty affecting gait often associated with other neurological dysfunctions [1]. The frequent involvement of the pyramidal motor system leads to a spastic ataxia phenotype. We previously described and mapped to chromosome 2q33-34 a large cohort of French-Canadian families segregating a novel autosomal recessive spastic ataxia frequently associated with white matter changes on MRI (leukoencephalopathy) [2]. ARSAL, also referred to as spastic ataxia type 3 (SPAX3, OMIM 611390), demonstrates clear intra and interfamilial variability reminiscent of the one observed in Friedreich Ataxia [3]. Though first described in French-Canadians, likely cases from other countries have been reported [4]. Here, we report a group of 55 French-Canadian cases belong to 38 families in which we uncovered complex mitochondrial Methionyl-tRNA Synthetase (*MARS2*) mutations. ARSAL becomes the third leukoencephalopathy presenting with ataxic features and cerebellar atrophy caused by mutations in a mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetase (AARS) gene, after aspartyl-tRNA synthetase (*DARS2*) and arginyl-tRNA synthetase (*RARS2*) [5, 6].

To further reduce the previously published 3.33Mb candidate interval, we generated SNP carrier haplotypes using the Illumina human HAP300-duo on selected families. This documented the existence of three different disease carrier haplotypes in these families (**Supplementary Fig. 1A online**). Recombinant haplotypes within families established a minimum candidate interval of 579Kb on chromosome 2q33-34 (rs16865262-rs7581202) (**Supplementary Fig. 1B online**). This smaller candidate interval contained the following nine genes: *SF3B1*, *COQ10B*, *HSPD1*, *HSPE1*, *MOBK3*, *RFTN2*, *BCO21693*, *MARS2* and *BOLL*. Three of the nine genes had been screened prior to the second genome-wide scan; *COQ10B*, *HSPD1* and *HSPE1* (unpublished data). We used SUSPECTS software for matching phenotype with Gene Ontology terms, Interpro domains and gene expression data, to efficiently prioritize the candidate gene. *MARS2* had the highest PROSPECTR score at 65.83 (**Supplementary Table 1 online**; see URLs section of Methods). According to Gene Ontology terms, *MARS2* shares translation with genes



involved in white matter diseases (*EIF2B1*, *EIF2B5*, *EIF2B3*, *EIF2B2*, and *EIF2B4*). Further support for *MARS2* as the prime candidate gene came during the screening, when mutation in *DARS2* and *RARS2* were found to cause leucoencephalopathies with spastic and ataxic features [5, 6]. *MARS2* only spans a 3.528 kb of genomic DNA that corresponds to a single exon 3,043bp mRNA that encodes a 593-amino acid protein. The identification of the first mutation was achieved by simple sequencing of the exon and 3'UTR of *MARS2*, while sequencing of the 5' region resisted amplification in most of our cases. The mutation consisted in a 268bp deletion found in 15 ARSAL heterozygote cases (**Table 1**). The deletion causes a frameshift and a premature STOP codon at position 236 (c.681Δ268bpfs236X) which leads to the production of a predicted 23 KDa truncated protein confirmed on Western blot (**Fig. 1A-C**). Further evidence that mutations in *MARS2* caused ARSAL came from the identification of a possible 300bp insert in the 5' sequence that segregated with the second most common haplotype (data not shown). The sequence of the PCR product provided the first evidence that we were dealing with a complex 5' mutation since only short partial sequence of *MARS2* was observed.

Further evidence that mutations in *MARS2* cause ARSAL came from parallel expression analyses prompted by the suspicion that a 5' mutation could influence gene expression, and therefore be responsible for the variable intra-familial phenotype, as is observed with the GAA-repeat mutation in Friedreich ataxia [7]. Northern Blots showed the expected mRNA size in all patients (**Supplementary Fig. 2**) and Western Blot confirmed the presence of the protein at the expected size or predicted 23KDa for the c.681Δ268bpfs236X carriers (**Fig. 1C**). However, both Northern Blots and qPCR were suggestive of elevated mRNA expression in patients without a clear correlation to the predicted mutation based on haplotypes (**Fig. 3A**). These results suggested that a complex 5' rearrangement that could include *MARS2* gene duplication may influence *MARS2* expression. To uncover such local rearrangements had occurred; we performed a series of copy number variation studies. The analysis using the PennCNV program of our Illumina human HAP300-duo dataset was inconclusive considering the low average SNP density of one SNP every ~7.9kb[8]. Further analysis using the Nimblegen pre-designed Chr2 aCGH was also uninformative for the same reason. We had to turn to the

design of a custom 0.845Mb average probe density of 1bp Nimblegen aCGH encompassing *MARS2* to uncover the first solid evidence of local rearrangements. The high resolution aCGH was performed on four ARSAL cases from three families with different predicted mutations. *MARS2* duplications appear to be the common mutation but potential triplications of parts of *MARS2* suggested that more complex rearrangements had occurred (**Fig. 2**). In homozygous patients, most oligonucleotide probes covering the entire coding sequence of *MARS2* have a  $\log_2$  value (Cy5/Cy3) between  $\sim 0.5$ - $1.0$ , whereas heterozygous patients have values between  $\sim 0.2$ - $0.5$  (**Fig. 2A**). To determine whether these complex mutations were segregating in families and carried by other ARSAL cases, we used seven pre-designed ABI®-based Copy Number Assays; four were located in *MARS2* coding region, one in each coding sequence of the surrounding genes (*PLCL1*, *HSPD1* and *COQ10*). These assays allowed us to confirm the presence of *MARS2* CNVs in the majority of our ARSAL cases (**Supplementary Fig. 3 online**). Southern Blot, qPCR on genomic DNA were also performed as a complementary technique to assess the mutation (**Supplementary Fig. 4 online**).

To validate the detected mutations and characterize the breakpoint sequences, PCR was performed by PCR primer walking using various combinations of primers assuming the most likely rearrangements. Our results showed that the first 300bp insertion seen by PCR of the 5' region corresponds to a part of a complex partial duplication of the gene. The high resolution of our custom CGH array ensures that all small CNV events are easily detected and clearly shows the complexity of the ARSAL pathogenic CNVs. The sequence of the abnormal 5' sequences corresponds to properly oriented and inverted partial sequences of *MARS2* separated by an AluSx element. Using a different primer pair, a  $\sim 1120$ bp amplicon was obtained on carriers of the common mutation which showed similar rearrangements. The mutated 5' sequence corresponds to the region separating the two copies of *MARS2* that appear in a head to head arrangement. DNA template switching appears to have occurred at least twice via the homology of partial AluSq and AluSx sequences yielding a complex rearrangement accompanying the *MARS2* duplication (**Fig. 2**). As suggested by Zhang et al., due to the complexity of this CNV event, Alu element homology presumably has facilitated template switching and annealing via Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS)

mechanism but not by simple-Alu-mediated recombination [9]. The breakpoint of the second complex duplication event, the common mutation as referred by haplotyping analysis, was also successfully amplified and sequenced. Using a single forward primer, located in the 5'UTR of the gene, we were able to amplify a ~1200bp insert. Junction sequence included *MARS2* duplicated segment inserted in inverse orientation into the promoter region of *MARS2*. Bioinformatics analysis of the insert revealed the presence of a de novo Alu element created by fusion of partial AluSq, AluSx and sequence of unknown origin. PCR primer walking allowed us to obtain different insert lengths and sequence including small deletions with interspersed repetitive elements (L1-type) suggesting that the duplicated fragment was inserted within an interrupted repeat element or disrupted the sequence organization of a repeat located in the 5' region of *MARS2*. All inserts analyzed showed sequence complexity involving duplicated segments of *MARS2* in inverted and direct orientation potentially driven by either retrotransposition or multiple FoSTeS events. Our data suggest that complex CNVs disrupting the promoter 5'UTR region of *MARS2* are responsible for the majority of ARSAL mutations. We have confirmed by combining the CGH array and insert sequencing that 55 of our predicted ARSAL cases from 38 families carry two *MARS2* mutations. The putative rearrangement junction amplified by using a single forward primer, located in the 5'UTR (primer *MARS2\_cDNA1A*), were found in three French-Canadian controls but not in CEPH samples. Further evidence to the rare occurrence of these mutations is that no CNV events have been cataloged in Database of Genomic Variants or DGV Structural Variations. Different sized amplicons were observed within affected family members, which support the hypothesis that regional genomic instability is aided by the presence of numerous repetitive elements and stem-loop structure in a way that may affect clinical severity [10].

To test whether mutations in *MARS2* affected mitochondrial translation we pulse-labeled the mtDNA-encoded polypeptides in patient and control immortalized lymphoblast lines (**Fig. 3, Supplementary Table 3 online**). Of the six patients tested, three showed a generalized translation deficiency. Three of these patients are homozygous for the common mutation (case B4, B5 and P24), and the other is a compound heterozygote (case E10). The two additional patients with control levels of translation were also compound

heterozygote for the common mutation (DD38, AA35). Comparing clinical variables between cases suggest a correlation between the severity of the clinical phenotype and the extent of the translation defect in lymphoblasts. However, *MARS2* mutations have no effect on the steady-state levels of tRNA<sup>Met</sup> (**Fig. 3**), suggesting that an aminoacylation defect does not destabilize the tRNA. Together our results suggest that 5' *MARS2* mutations associated with duplication appear to modify the control of the expression of *MARS2* that leads to a decrease in mitochondrial protein synthesis. It is still unclear how the ARSAL mutations cause the loss of function observed, though the overexpression of *MARS2* in many of our cases is more in favour that it is translation that is impaired.

*MARS2* has a large CpG island (1037/3028 bp, 34%) as is often found in vertebrate housekeeping genes [11, 12]. Aminoacyl-tRNA synthetases are among the most phylogenetically ancient proteins [13]. The *MARS2* protein shares a high degree of homology with other mammalian mitochondrial tRNA<sup>Met</sup> synthetases but very little with human cytoplasmic *MARS* which maps to chromosome 12. *MARS2*, like other mitochondrial aaRS, catalyzes in two steps the activation, or charging, of its cognate tRNA by transferring an aminoacyladenylate intermediate to the terminal adenosine of the tRNA [14-16]. *MARS2* functions uniquely in mitochondria and the Methionine (Met) is the exclusive initiation amino acid of 12 of the 13 proteins coded by mtDNA. In recent years, the discovery of pathological mutations in autosomal genes coding for components of the mitochondrial protein-synthesis machinery has heightened the interests in this field [5, 14]. Mutations in three of the elongation factors and a tRNA modifying enzyme have already been reported [17-20]. Strikingly many will lead to diseases that affect central nervous system white matter [5, 6, 21]. Some authors have speculated that many new pathological mutations will be found in more than 100 nuclear genes coding for mitochondrial ribosome subunits, the aminoacyl-tRNA synthetases, tRNA modification enzymes, initiation factors, elongation factors, translation factors and termination factors [5, 22]. However, the absence of an in vitro mitochondrial translational system continues to hamper the progress of knowledge on the regulation of mitochondrial protein synthesis [15]. The origin and evolution of AARS is particularly interesting regarding the pathogenic CNVs occurring in *MARS2*. The AARS family of enzymes has

undergone several complex LGT events suggesting that AARS genes are highly susceptible to mutation and rearrangement [13, 23, 24]. Mammalian *MARS2* gene has already been reshaped by similar events given the observation that met-tRNA is positively selected and became intronless during its evolution in higher mammalian [24].

It is well known that mitochondrial disorders are a heterogeneous group of neurodegenerative diseases in which ataxia is a frequent manifestation [25, 26]. Many authors have suggested that mitochondrial dysfunction plays a central role in many neurodegenerative disorders [16, 27]. Therefore, a better understanding of how *AARS gene* mutations lead to cerebellar and white matter disease may shed light on the underlying pathophysiology of other mitochondrial cerebellar degenerative processes and more frequent white matter diseases. ARSAL is the first known disease involving a monoexonic gene that was reported with complex rearrangements associated with a duplication [28, 29]. Our study demonstrates the power of dense CNV analysis technologies to uncover complex small deletions and duplications in housekeeping genes that could be missed otherwise.

## ACKNOWLEDGMENTS

---

We thank Dr Alexandre Montpetit, Alexandre Belzile and Francois Bacot from McGill University-Génomique Québec Innovation Center for technical assistance. We are grateful for the generous collaboration of many colleagues and most of all for the contributions from ARSAL patients and their families. This study was supported by Canadian Institute of Health Research (CIHR grant#144202), the ARSACS Foundation and the Association Canadienne des Ataxies Familiales (ACAF). B.B., I.T. and G.B. are Scholar of Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and Réseau de médecine Génétique du Québec (RMGA-FRSQ). J.D.L. is Scholar of by Canadian Institute of Health Research. E.A.S. is an International Scholar of the Howard Hughes Medical Institute.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

I.T. performed the genome-wide scan, sequence analysis, Western Blot, qPCR and CGH-array analysis. M.T. contributed to the mutation, qPCR, CGH-array design and analysis. F.S. and E.S. performed the mitochondrial assays. B.B., J.M., J.-P. B., M.-F. R. all contributed key patients to the study. J.D.L. contributed to the analysis of the genome-wide scan and mutation characterization. J.L. reviewed all patients' MRI. G.B. reviewed the patient's charts. M.J.D. performed the Southern and Northern blots. L.L. helped to the patient recruitment. V.B and H.B contributed to the gene analysis and discussion. I.T. and B.B. designed the study and wrote the paper with contributions from many of the other coauthors.

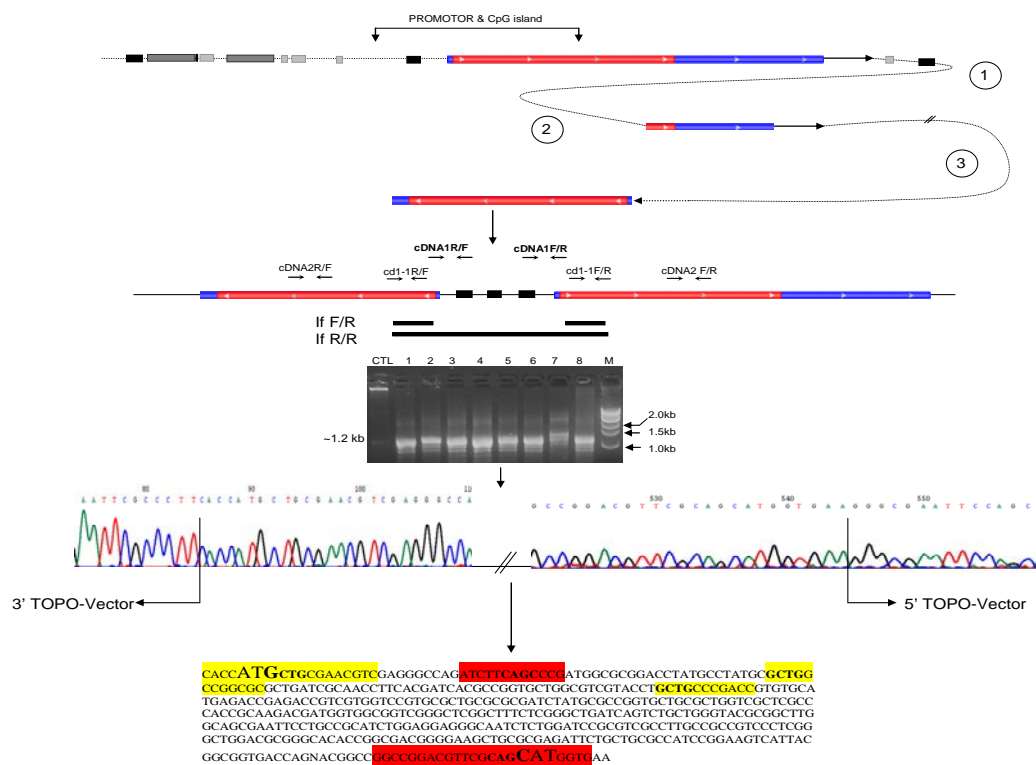
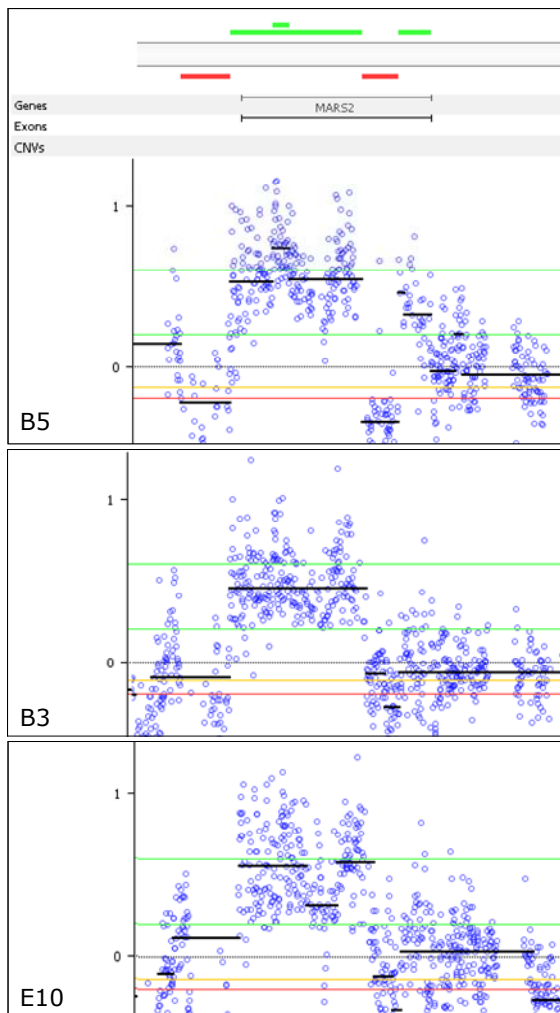
**COMPETING INTERESTS STATEMENT:**

The authors declare no competing financial interests.

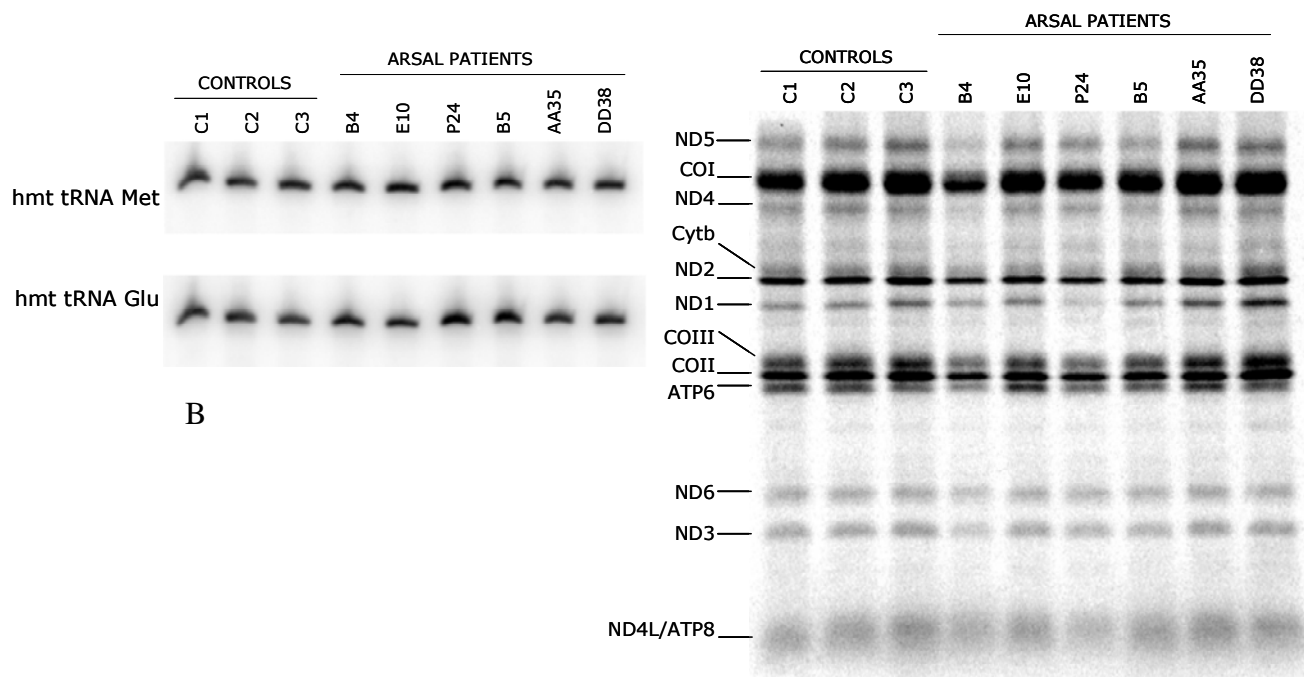
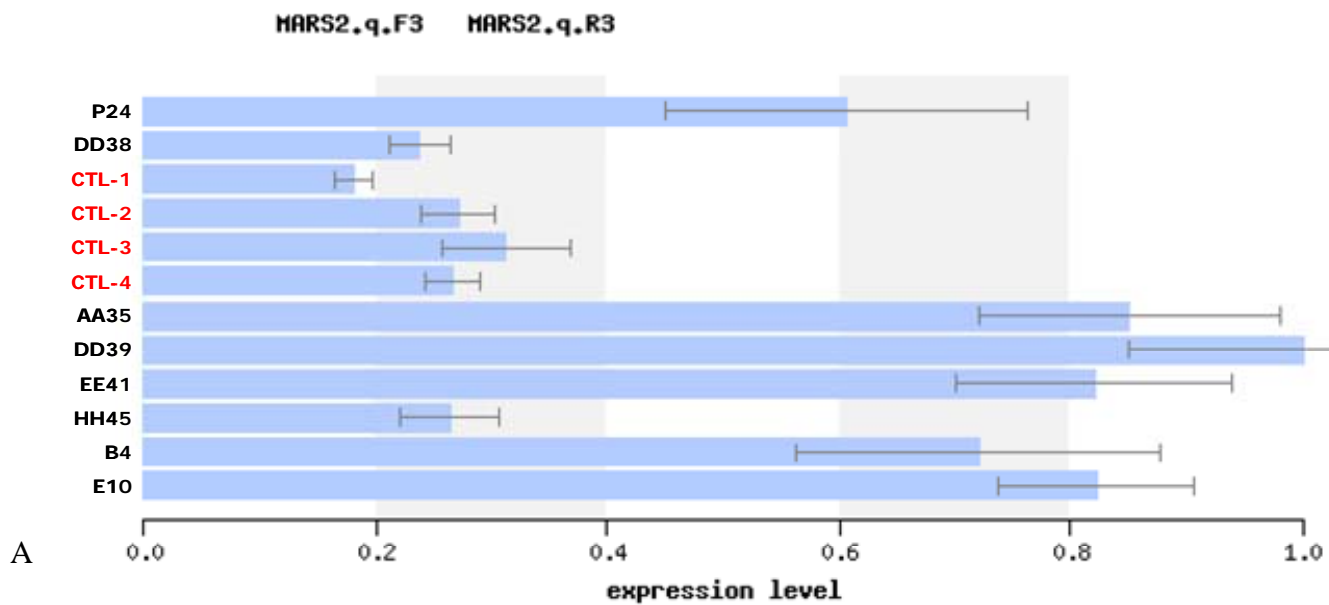


**Figure 1: A)** Presence of a more than 200bp deletion in *MARS2* segregating in ARSAL family E. This mutation is indicated by a head arrow. Normal amplicon size is about 500 bp. **B)** Schematic diagram showing the region of *MARS2* where we have identified a 268 bp deletion in 15 ARSAL families. DNA sequencing of the amplicon of heterozygous cases E10 and E11 correspond to the deletion that results in premature STOP codon at position 236. **C)** Western Blot analysis using commercial polyclonal antibody against *MARS2* (Abnova, H00092935-Q01) was performed on protein extracted from lymphoblast cultured cells; Lane S (Abnova synthetic protein 1-107 AA—size 34 kDa); E10 & E11 (blue arrow: c.681Δ268bpfx236X—estimated size 23 kDa); Control case 1, 2, 3 and 4—estimated normal size of *MARS2* is 67 kDa—black arrow head).





**Figure 2: A)** Non-recurrent rearrangement involving *MARS2* gene was confirmed by oligonucleotide custom aCGH. The array data of two homozygous ARSAL family members (B5 and B3; DUP/DUP) and one compound heterozygous (DUP/DEL) are depicted. The *MARS2* gene is triplicated in subject B5 and the triplication is embedded within the duplication. As demonstrated by the black lines, the two family members harbored different hybridization patterns suggestive of a complex unstable rearrangement. In patient E10, the array discriminated the presence of the duplication as well as the deletion. **B)** The Schematic representation of *MARS2* complex rearrangement: DNA template switching appears to have occurred at least twice via the homology of partial AluSq and AluSx sequences yielding a complex rearrangement accompanying the *MARS2* duplication. Repeat elements are depicted as dark grey boxes (L1PA/B), light grey (L1ME) and black boxes (Alu). Sequencing of the insert show partial sequence of *MARS2* in both orientation and a de novo Alu sequence which suggest that at least two FoSTeS events occurred.



C

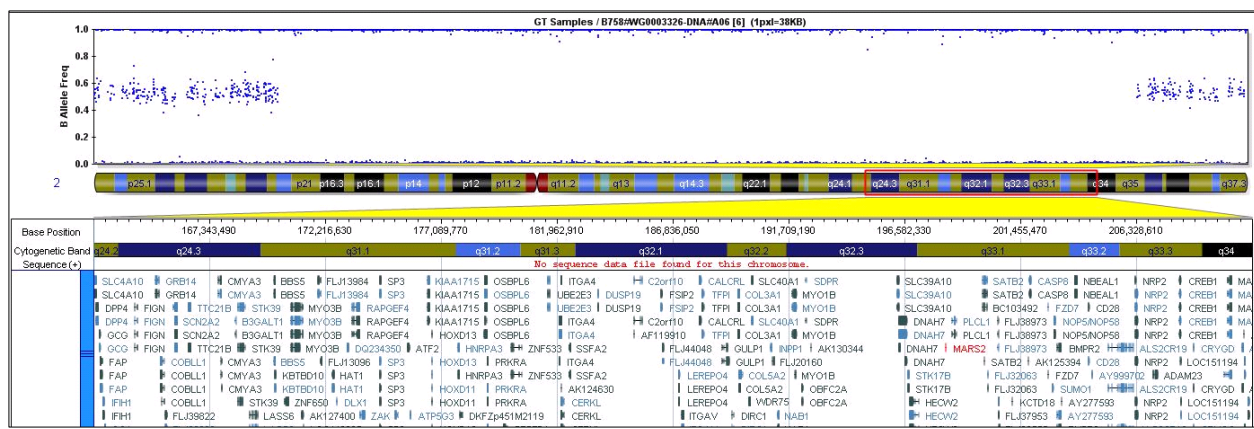
**Figure 3: A)** Quantification of *MARS2* mRNA expression level was performed on eight ARSAL cases and four controls. Relative expression levels were normalized with respect to a set of reference primer pairs in *GAPDH*. ARSAL patients expressed up to 3X more *MARS2* mRNA versus control RNAs. **B)** Total, steady-state levels of mitochondrial (mt) tRNA Met in patients and controls are similar, suggesting that decreased amino-acylation does not interfere with the stability of mt tRNA Met. Human mt tRNA Glu was used as a loading control. **C)** Mitochondrial protein synthesis was measured in lymphoblasts from four controls and five ARSAL patients by pulse-labelling mitochondrial translation products with [<sup>35</sup>S]-methionine for 1 hour in the presence of emetine, followed by electrophoresis on a 15-20% linear-gradient polyacrylamide gel. The 13 mitochondrial products are identified at the left of the figure. A generalized mitochondrial translation deficiency is observed in three of the five ARSAL patients tested.

Supplementary Figure 1 A

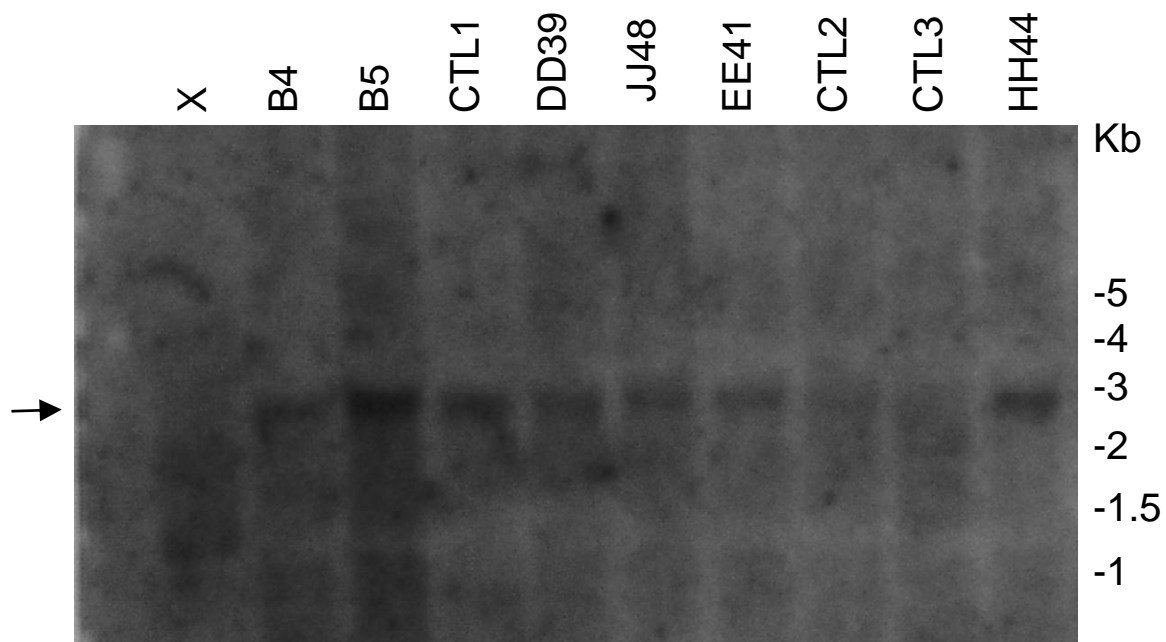
dbSNP ID	Chr	FAMILY ID	FAMILY A		FAMILY B			FAMILY C		FAMILY D		FAMILY E				
			2	1	4	4	5	3	3	6	6	9	9	10	10	11
PATIENTS ID	STATUS	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT
rs2697303	2	197784909	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs263513	2	197786195	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs2697300	2	197786255	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<b>rs1881401</b>	2	<b>197796152</b>	<b>A</b>	<b>A*</b>	<b>G*</b>	<b>A*</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
rs2049680	2	197900111	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs7559692	2	197805197	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs11902332	2	197806003	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs2712885	2	<b>197817222</b>	<b>A*</b>	<b>A*</b>	<b>G*</b>	<b>A*</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
rs2697290	2	197821402	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<b>rs6434921</b>	2	<b>19782442</b>	<b>G*</b>	<b>G*</b>	<b>A*</b>	<b>G*</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
rs2697276	2	197838599	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs2712867	2	197843657	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs6727480	2	197852116	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs1429411	2	197852247	G	A	A	G	G	G	G	G	A	A	A	A	A	A
rs12619296	2	197857012	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs13033821	2	197881781	C	A	C	C	C	C	C	C	A	A	C	C	C	C
rs1429412	2	197899139	G	A	G	A	G	G	G	G	A	A	C	G	G	G
rs12472355	2	197914085	A	C	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs787997	2	197924516	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs787994	2	197931366	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs789008	2	197940884	G	G	G	G	G	G	G	G	<b>A*</b>	<b>G*</b>	G	G	G	G
<b>rs16865262</b>	2	<b>197971391</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
rs788018	2	197973771	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs3754822	2	198035559	G	-	-	-	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs788016	2	198060538	A	G	A	G	A	G	G	G	G	A	A	G	G	G
<b>rs7506997</b>	2	<b>198068791</b>	<b>A*</b>	<b>A*</b>	<b>G*</b>	<b>A*</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
rs1455633	2	198186565	G	A	A	A	G	G	G	G	G	A	A	G	G	G
rs970552	2	198205757	A	C	A	C	A	A	A	A	A	C	C	A	A	C
rs2045244	2	198214711	G	G	A	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G
rs1902249	2	198229601	A	G	A	G	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A
rs2341510	2	198266924	G	A	G	A	G	G	G	G	G	A	A	G	G	A
<b>MARS2</b>	2	<b>198278146-19828142</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>
rs4850808	2	198284387	G	A	G	A	G	G	G	G	G	A	A	G	G	A
rs700642	2	198308975	A	C	A	C	A	A	A	A	A	C	C	A	A	C
rs700645	2	198313759	A	G	A	G	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G
rs700646	2	198316756	-	-	-	-	G	G	G	G	G	A	A	G	G	-
rs1069593	2	198322857	G	A	G	A	G	G	G	G	G	A	A	G	G	A
rs2233255	2	198323971	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs13425988	2	198330623	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs700650	2	198332530	G	A	A	G	G	G	G	G	A	A	G	G	G	A
<b>rs700651</b>	2	<b>198339959</b>	<b>G*</b>	<b>A*</b>	<b>A*</b>	<b>A*</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>
rs700653	2	198345678	A	G	A	G	A	A	A	A	A	G	G	A	A	A
rs700654	2	198351666	A	G	A	G	G	G	G	G	A	A	G	G	G	A
<b>rs1851779</b>	2	<b>198353553</b>	<b>G*</b>	<b>A*</b>	<b>G*</b>	<b>A*</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>
rs770657	2	198382429	C	A	A	C	C	C	C	C	C	A	A	C	C	C
rs700667	2	198385753	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs16824376	2	198392587	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs996427	2	198393854	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs700670	2	198395529	A	G	G	A	A	A	A	A	A	G	G	A	A	A
rs700671	2	198398246	A	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs4550684	2	198399650	G	A	A	G	G	G	G	G	-	G	A	A	G	A
rs700675	2	198408461	G	A	A	G	G	G	G	G	G	A	A	G	G	A
rs700677	2	198410669	C	A	C	A	C	C	C	C	C	A	A	C	C	C
rs700679	2	198415161	G	A	G	A	G	G	G	G	G	A	A	G	G	A
rs6707521	2	198421476	G	A	G	A	G	G	G	G	G	A	A	G	G	A
rs1435568	2	198471124	A	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs938929	2	198489105	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A	A	G	A	A
rs11892344	2	198504108	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C	A	A	C
rs1518364	2	198518220	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A	G	A	A
rs7581202	2	198545022	A	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs1016883	2	198589913	A	G	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs2196176	2	198613159	A	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs7572733	2	198638051	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs6434955	2	198654796	G	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs1064213	2	198658485	G	G	G	G	G	G	G	G	<b>A*</b>	<b>G*</b>	G	G	G	A
rs7595412	2	198670488	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	A	A	A
rs3713362	2	198671076	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A	A
rs3732231	2	198674502	G	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs892515	2	198686066	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A	A	A
rs11811576	2	198686232	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	A	A	C

ANCESTRAL HAPLOTYPE

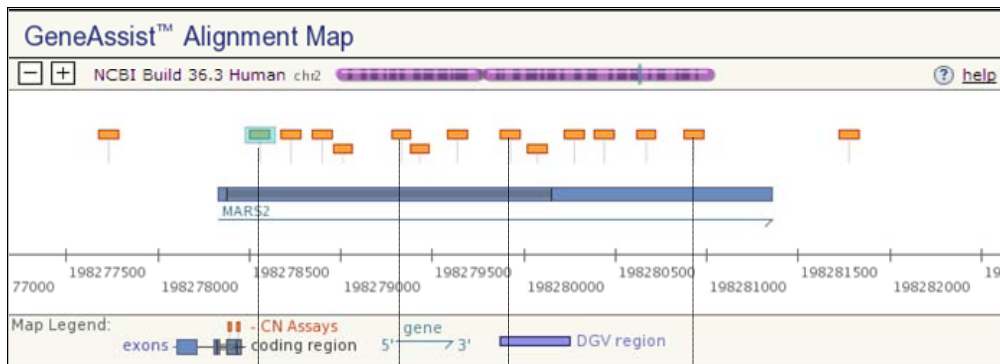
Supplementary Figure 1 B



**Supplementary Figure 1:** **A)** SNP haplotype results of nine ARSAL cases from six families. This analysis confirmed the chromosome 2 results and defines a 0.658 Mb candidate interval based on the UCSC map. **B)** Array data for patient B4 of the chromosome 2 SNP marker map using Illumina's BeadStudio software. The homozygosity detected by HAP300 SNP chip analysis spans over 50 Mb in Family B. *MARS2* gene is highlighted in red.

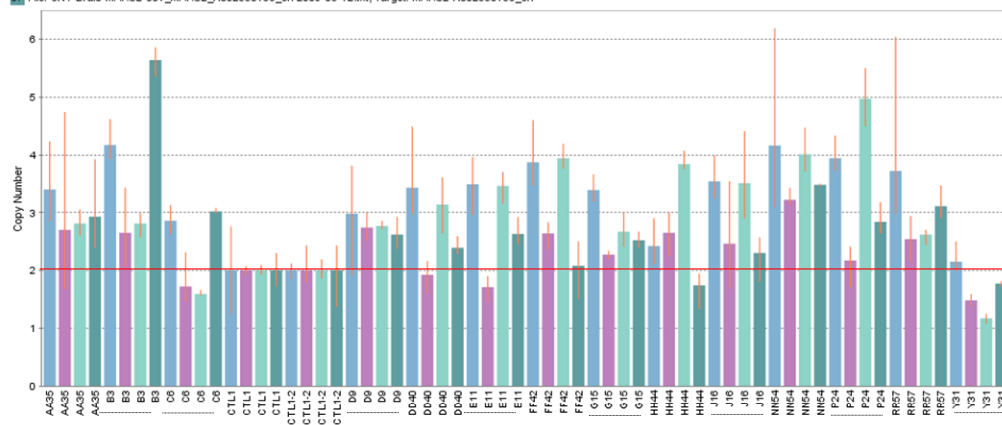


**Supplementary Figure 2** Northern Blot analysis using [<sup>32</sup>P] *MARS2* probe encompassing one third of the gene; controls RNAs show a high molecular weight mRNA signal (arrow) compared to ARSAL cases. mRNA signals are increased in ARSAL patients suggesting mRNA degradation (arrowheads)



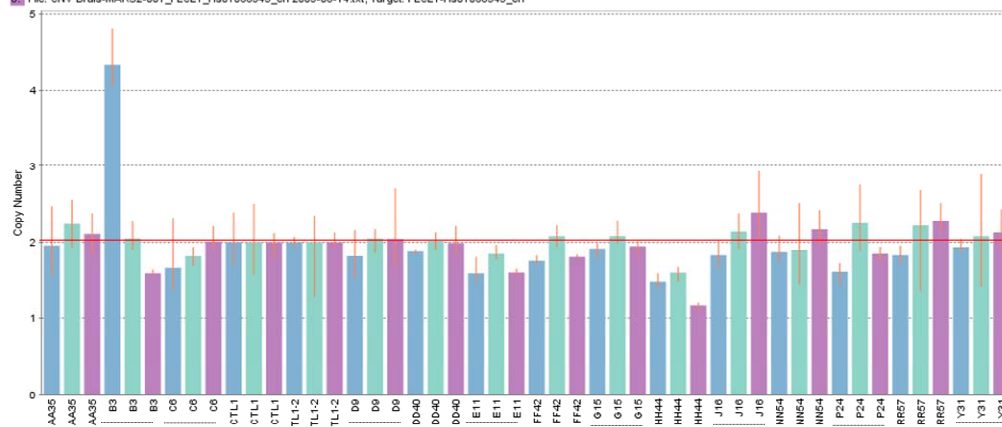
Applied Biosystems CopyCaller™ Software v1.0

- 2. File: CNV Brais-MARS2-001\_MARS2\_Hs01848862\_cn 2009-08-11.txt, Target: MARS2-Hs01848862\_cn
- 3. File: CNV Brais-MARS2-001\_MARS2\_Hs02141409\_cn 2009-08-11.txt, Target: MARS2-Hs02141409\_cn
- 4. File: CNV Brais-MARS2-001\_MARS2\_Hs02277482\_cn 2009-08-12.txt, Target: MARS2-Hs02277482\_cn
- 5. File: CNV Brais-MARS2-001\_MARS2\_Hs02550138\_cn 2009-08-12.txt, Target: MARS2-Hs02550138\_cn



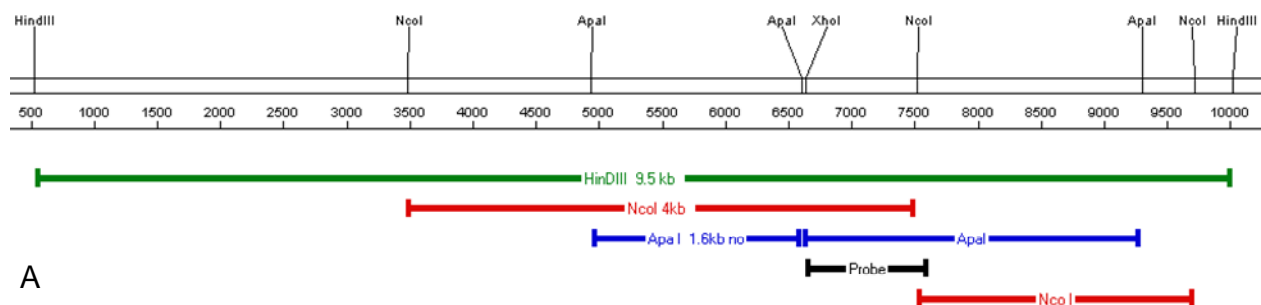
Applied Biosystems CopyCaller™ Software v1.0

- 6. File: CNV Brais-MARS2-001\_CQO10\_Hs00506215\_cn 2009-08-13.txt, Target: CQO10B-Hs00506215\_cn
- 7. File: CNV Brais-MARS2-001\_HSPD1\_Hs00304988\_cn 2009-08-13.txt, Target: HSPD1-Hs00304988\_cn
- 8. File: CNV Brais-MARS2-001\_PLCL1\_Hs01068343\_cn 2009-08-14.txt, Target: PLCL1-Hs01068343\_cn

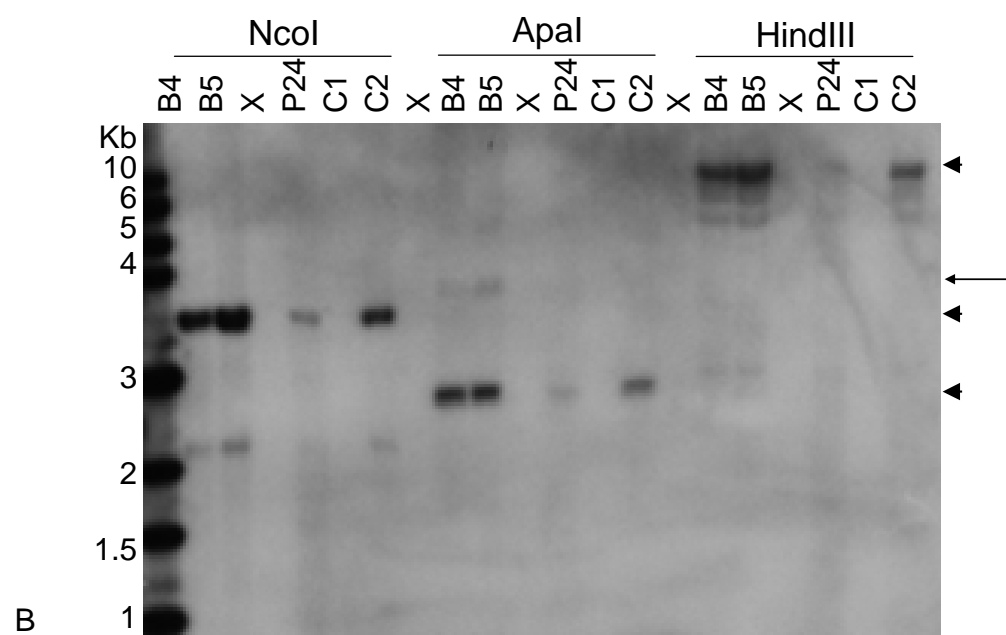




**Supplementary Figure 3:** Graphic representation of the seven pre-designed ABI®-based Copy Number Assays; four were located in MARS2 coding region, one in each coding sequence of the surrounding genes (*PLCL1*, *HSPD1* and *COQ10B*). CNV analysis for each assay is normalized to a reference gene (*RNSAP*) and with CEPH DNA CTL.



A



B

**Supplementary Figure 4:** Southern Blot analysis using [<sup>32</sup>P] MARS2 probe encompassing one third of the gene; signals are increased in homozygous ARSAL patients (B4 and B5) suggesting a duplication of the gene MARS2 (arrowheads). Using Apa1 restriction enzyme, we observed an additional band at ~3.7Kb in cases B4 and B5. The decreased signal intensity of the additional band compare to the normal band (2.9Kb) could reflect a bad hybridization due to a rearrangement more complex than a simple duplication.

**Tables****Table 1** Major clinical features & *MARS2* mutations in individuals with ARSAL

**Supplementary Table 1** SUSPECTS Scores for ARSAL SNP candidate interval on chromosome 2q33-34 (197,963,784-198,542,862bp)

WHITE MATTER PHENOTYPE & ATAXIA						
Gene id	Symbol	GO matches	Prospectr score	Prospectr rank	GO rank	Total rank
ENSG00000152428	MARS2	translation (EIF2B1, EIF2B5, EIF2B3, EIF2B2, EIF2B4)	65.8361	1	2	1
ENSG00000152430	BOLL	translation (EIF2B1, EIF2B3, EIF2B2, EIF2B4) regulation of translation (EIF2B5)	38.841	8	1	2
ENSG00000144381	HSPD1		65.4075	2		3
ENSG00000115541	HSPE1		65.4075	3		4
ENSG00000115520	NP_079423		58.5162	4		5
ENSG00000115540	PREI3		47.6268	5		6
ENSG00000115896	PLCL1		44.4233	6		7
ENSG00000162944	C2orf11		39.7714	7		8
ENSG00000115524	SF3B1		28.864	9		9

**Supplementary Table 2 ARSAL Primers and ABI®-based Copy Number Assays for human copy number screening**

<b>ARSAL qPCR Primers</b>		
<b>PRIMERS FOWARD</b>	<b>SEQUENCES</b>	<b>EXON SIZE &amp; PRODUCT SIZE (bp)</b>
B-Globuline_ex2-f	ggtgctgatatagcttgac	121
B-Globuline_ex2-r	gctggatgacgtgagtaaac	
MLH1_ex10-F	cagtgtatgcagcctatttg	120
MLH1_ex10-R	aaagaggagagcctgatagaac	
MSH2_ex3-F	gaggctctcctcatccagattg	125
MSH2_ex3-R	ggcctggaatctcctctatcac	
MARS2_q19F	TGTGTCCGGCAAATAATGG	201
MARS2_q19R	CTCTGAGGCAGAGACCCC	
MARS2.q.F1	GCCAGGGTTGGTGGGGC	119
MARS2.q.R1	CCTTATATATCCGAAAGTTATCATAGTGGTCTGCT	
MARS2.q.F2	TCTCCTGCACAGATTTTCATCCGCA	121
MARS2.q.R2	CAATACCAACCTTCATAGACGCCCTTG	
MARS2.q.F3	TGAGGGTCAGGGTTGGAGGC	158
MARS2.q.R3	TTTAAATGGGGATACACATGGGCAAAAATCA	
BC021693_q1-F	AATTCCAGTATGCTGCAGTGG	205
BC021693_q1-R	TGCAAGGGTCAATGTTATGAG	
BC021693_q1-2F	cgggtgttgtaatggag	269
BC021693_q1-2R	TGTAGGAAGATTACTATGTTCAGCC	
HSP60_F	GAGTAGAGGGCGGAGGGAGG	121
HSP60_R	CGTTTGCAGAAATCGTAGCA	
PLCL1_F	CCTGAGCAAAAGAAGTTGC	119
PLCL1_R	GGAGGTAGGATTCTGAGGGC	
<b>ARSAL cDNA Primers</b>		
<b>PRIMERS FOWARD</b>	<b>SEQUENCES</b>	<b>EXON SIZE &amp; PRODUCT SIZE (bp)</b>
MARS2_Cdna_1F	CACCATGCTGCGAACGTC	284
MARS2_Cdna_1R	CGTCGGTACCAGTGGAGAAT	
MARS2_Cdna_2F	CTACTGGCGGACGCCCTAT	294
MARS2_Cdna_2R	GACGCCCTTGTAGAGCAGAC	
MARS2_Cdna_3F	ACAGATTTTCATCCGCCACCAC	386
MARS2_Cdna_3R	TGGTACTTCTGCGAGACAC	
MARS2_Cdna_4F	CCGAACCATTTCATCACGTA	380
MARS2_Cdna_4R	GCAAGTCCTAGGATCCACCA	
MARS2_Cdna_5F	CCATCCCCTGGACAGTCT	553
MARS2_Cdna_5R	CCCAAAGACTCGCAAACATT	
MARS2cDNA synthesis-f	GATGATGCTTGTGATGCGCGCCTAC	1668
MARS2cDNA synthesis-r	GGTCCGGTGGGCTTTCACCAGCCAAG	
MARS2cDNA_5UTR-f	caccatgctgcgaacgct	2934
MARS2cDNA_3UTR-r	cagttaaattacctgaaagtgtgt	
BC021693_cDNaf	gccttgacagttgatctcag	951
BC021693_cDNAr	aggagacaatcaaagtatcctcag	

<b>ARSAL Genomic Primers</b>		
<b>PRIMERS FOWARD</b>	<b>SEQUENCES</b>	<b>EXON SIZE &amp; PRODUCT SIZE (bp)</b>
MARS2_5utr-gc-RPT-M13f	CACGACGTTGTAAAACGACTACGA AGGCAAAGAGGTTTCG	380
MARS2_5utr-gc-RPT-r	cctccaggagagacagccta	
MARS2_(gcn)RPT-M13f	CACGACGTTGTAAAACGACGAGCT GTTTTCTGGCAAGC	221
MARS2_(gcn)RPT-R	TGACAGCACGTGTGAGAGG	
mars_EXON1_A	CGTTTCATTGGCTTTCCG	Exon1_1: 757 bp, Product size 886
mars_EXON1_B	TACTTCTGCGAGACACGGAC	
mars_EXON1,2_A	AGTTCCGGAAGCCACTCC	Exon1_2: 757 bp, Product size 875
mars_EXON1,2_B	AGTACCCAGCCAGGGAGC	
mars_EXON1,3_A	ATATAAGGCTCTGGAGGCCG	Exon1_3: 757 bp, Product size 874
mars_EXON1,3_B	TCTAGGACACTGGTTCAAGGG	
mars_EXON1,4_A	TTACTGGTGGTTTTACAGGGG	Exon1_4: 757 bp, Product size 871
mars_EXON1,4_B	AAGCATTGGTCAGTTCTCTCC	
mars_promoteur_a	tgatcacacaaatgtgcaagaa	PRODUCT SIZE: 656
mars_promoteur_b	caacaaaagtagatttggatctgc	
mars_promoteur_2a	ttggcaagaacttggcagat	PRODUCT SIZE: 787
mars_promoteur_2b	GCACATCACAAGCATCATCG	
bc021684_EX1a	cacttgaggaggagtgctgc	PRODUCT SIZE: 459
bc021684_EX1b	ccagtcaaagaaaggggtga	
bc021684_EX2a	atttgggacctcccatgta	PRODUCT SIZE: 488
bc021684_EX2b	tgacaagttaatgggtgcag	
bc021684_EX3a	tgtggcaaaatgttgatgtct	PRODUCT SIZE: 396
bc021684_EX3b	ttcaattttaccatagctacatagg	
bc021684_EX4a	actctggctgccttgtgaat	PRODUCT SIZE: 1194
bc021684_EX4b	ttttcccttagccacatcct	
BC021693_EP_ex3A	AAGAGGGTAAGGAAGTGGGG	Exon3: 58 bp, Product size 651
BC021693_EP_ex3B	TTTGTGTAGCATACTGGTGTGG	
BC021693_EP_ex4A	cgggtgttgtaatggag	Exon4: 809 bp, Product size 1000
BC021693_EP_ex4B	TTGTATTCATTTGGACTGTTATGC	
Mars_ex1re-A	gagctgttttctggcaagc	862
Mars_ex1re-B	TTCCTTGGTCCAGGAGACTG	
Mars_ex2re-A	GGCACCTGTACTCGGCACTA	902
Mars_ex2re-B	GCAAGTCCTAGGATCCACCA	
Mars_ex2re-C	GGGGGATTCGTTTCCTGTAT	997
Mars_ex2re-D	CCCAAAGACTCGCAAACATT	
Mars_ex3re-A	TCTCTGAACCGATGCACTG	806
Mars_ex3re-B	CCATCTTTCCCTGAAGACA	
MARS2_LR_FR1-F	gggttagacaaacggctga	2461
MARS2_LR_FR1-R	tgggccctctacttgcta	
MARS2_LR_FR2-F	gggttagacaaacggctga	1699
MARS2_LR_FR2-R	AGGGAAGCAGGTAGTGCAGA	

ARSAL CNV ASSAYS	CNV ASSAY_ID	PROBE		
		POSITIONS & INTERSPACE (bp)	EXON	
MARS2	Hs02277482_cn	198278558		1
	Hs02141409_cn	198279333	775	1
	Hs01848862_cn	198279929	596	1
	Hs02550138_cn	198280672	743	1
HSPD1	Hs00304988_cn	198062204	216354	4
COQ10	Hs00506215_cn	198043117	235441	4
PLCL1	Hs01068343_cn	198657233	378675	3

**Supplementary Table 3** Quantification of the mitochondrial protein synthesis

	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>DD38</b>	<b>B4</b>	<b>E10</b>	<b>P24</b>	<b>B5</b>	<b>AA35</b>
<b>%</b>	<b>80</b>	<b>97</b>	<b>105</b>	<b>118</b>	<b>54</b>	<b>89</b>	<b>67</b>	<b>79</b>	<b>107</b>
<b>ND5</b>	105	91	99	105	32	75	50	28	103
<b>CO I</b>	80	98	104	119	54	96	71	69	111
<b>ND4</b>	97	120	79	104	22	67	58	75	102
<b>cyt b</b>	71	99	98	133	57	74	45	115	86
<b>ND2</b>	77	90	111	122	49	79	53	88	113
<b>ND1</b>	45	74	98	182	36	81	31	87	115
<b>CO III</b>	71	104	96	128	57	84	60	81	103
<b>CO II</b>	74	91	109	126	55	80	66	84	97
<b>ATP6</b>	98	112	88	102	51	119	83	95	107
<b>ND6</b>	96	104	116	84	60	90	100	80	116
<b>ND3</b>	85	89	127	100	52	82	78	61	91
<b>A8/ND4L</b>	87	96	128	89	90	117	97	101	118

Remarks: Quantification of the mitochondrial protein synthesis shows a generalized deficiency in the patients homozygous for the common mutation (54% and 79% of the average of controls). On the other hand, patients compound heterozygous for the common mutation and deletion of *MARS2* have a variable effect; one patient has a 67% deficiency (P24) and two have normal mitochondrial translation (89% and 107% of the average of four controls). This variation could be attributable to the complexity and variability in the rearrangement or to the heteroplasmy of the mitochondria.



**Supplementary Table 4:** Human Mitochondrial or Cytoplasmic t-RNA synthetase and diseases

	<b>Human GENES</b>	<b>CHR.</b>	<b>LOCALIZATION</b>	<b>ID</b>	<b>DISEASES</b>	<b>REFERENCE</b>
<b>1</b>	seryl-tRNA synthetase	<b>1</b>	CYTO.	SARS		
<b>2</b>	mitochondrial tryptophanyl tRNA synthetase	<b>1</b>	MITO.	WARS2		
<b>3</b>	threonyl-tRNA synthetase 2	<b>1</b>	MITO.	TARS2		
<b>4</b>	aspartyl-tRNA synthetase 2 (mitochondrial	<b>1</b>	MITO.	DARS2	LBSL	Nat Genet. 2007 Apr;39(4):534-9.
<b>5</b>	glutamyl-prolyl tRNA synthetase	<b>1</b>	CYTO.	EPRS		
<b>6</b>	mitochondrial isoleucine tRNA synthetase	<b>1</b>	MITO.	IARS2		
<b>7</b>	tyrosyl-tRNA synthetase	<b>1</b>	CYTO.	YARS		
<b>8</b>	prolyl-tRNA synthetase	<b>1</b>	MITO.	PARS2		
<b>9</b>	aspartyl-tRNA synthetase	<b>2</b>	CYTO.	DARS		
<b>10</b>	methionyl-tRNA synthetase 2	<b>2</b>	MITO.	MARS2	ARSAL	
<b>11</b>	phenylalanyl-tRNA synthetase, BETA subunit	<b>2</b>	CYTO.	FARSB		
<b>12</b>	leucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	<b>3</b>	MITO.	LARS2	novel type 2 diabetes susceptibility gene	Diabetes. 2005 Jun;54(6):1892-5.
<b>13</b>	glutaminyl-tRNA synthetase	<b>3</b>	CYTO.	QARS		
<b>14</b>	histidyl-tRNA synthetase	<b>5</b>	CYTO.	HARS		

<b>15</b>	histidyl-tRNA synthetase 2	<b>5</b>	MITO.	HARS2		
<b>16</b>	leucyl-tRNA synthetase	<b>5</b>	CYTO.	LARS		
<b>17</b>	arginyl-tRNA synthetase	<b>5</b>	CYTO.	RARS		
<b>18</b>	threonyl-tRNA synthetase	<b>5</b>	CYTO.	TARS		
<b>19</b>	valyl-tRNA synthetase 2-like	<b>6</b>	MITO.	VAR2		
<b>20</b>	valyl-tRNA synthetase	<b>6</b>	CYTO.	VAR		
<b>21</b>	alanyl-tRNA synthetase like	<b>6</b>	MITO.	AARS2		
<b>22</b>	phenylalanyl-tRNA synthetase 2 precursor	<b>6</b>	MITO.	FARS2		
<b>23</b>	arginyl-tRNA synthetase 2	<b>6</b>	MITO.	RARS2	Pontocerebellar hypoplasia	Am J Hum Genet. 2007 Oct;81(4):857-62.
<b>24</b>	glycyl-tRNA synthetase	<b>7</b>	CYTO.	GARS	Charcot-Marie-Tooth	Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jul 3;104(27):11239-44.
<b>25</b>	isoleucyl-tRNA synthetase	<b>9</b>	CYTO.	IARS		
<b>26</b>	cysteinyl-tRNA synthetase isoform a	<b>11</b>	CYTO.	CARS		
<b>27</b>	asparaginyl-tRNA synthetase 2	<b>11</b>	MITO.	NARS2		
<b>28</b>	tyrosyl-tRNA synthetase	<b>12</b>	MITO.	YARS2		
<b>29</b>	methionyl-tRNA synthetase	<b>12</b>	CYTO.	MARS		

<b>30</b>	cysteinyl-tRNA synthetase 2	<b>13</b>	MITO.	CARS2
<b>31</b>	tryptophanyl-tRNA synthetase isoform b	<b>14</b>	CYTO.	WARS
<b>32</b>	threonyl-tRNA synthetase-like 2	<b>15</b>	MITO.	TARSL2
<b>33</b>	glutamyl-tRNA synthetase 2	<b>16</b>	MITO.	EARS2
<b>34</b>	alanyl-tRNA synthetase	<b>16</b>	CYTO.	AARS
<b>35</b>	lysyl-tRNA synthetase	<b>16</b>	CYTO.	KARS
<b>36</b>	alanyl-tRNA synthetase domain containing 1	<b>17</b>	?	AARSD1
<b>37</b>	asparaginyl-tRNA synthetase	<b>18</b>	CYTO.	NARS
<b>38</b>	phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit	<b>19</b>	?	FARSA

## Methods

### Clinical information

All probands and family members underwent a detailed neurological examination by experienced neurologists. All medical records and imaging were reviewed. All families were of French Canadian ancestry. There was no apparent relationship between families or consanguinity within families. All MRI were reviewed by JL. This project was approved by institutional Ethics Committee of CRCHUM. Informed consent was obtained from all patients, all family members and controls. Genomic DNA was extracted from blood using a standard method or by saliva (Oragene, DNA Genotek).

### Cell culture and RNA extraction

Cell lines were maintained under normal condition (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in standard culture media (DMEM containing 10% FCS and 100ug/ml Pen-Strep and 50ug/ml gentamicine). We extracted RNA from 5 X 10<sup>6</sup> cells using TRIZOL according to the manufacturer instruction (Invitrogen).

### SNP Genome Scan

A SNP genome wide scan with the Illumina HAP300 SNP chip was conducted at Genome Quebec Innovation Center, McGill University (Montreal, Canada) on nine affected individuals and six non-affected family members. BeadStudio Software was used as an analysis tool for genotyping, homozygosity and loss of heterozygosity analysis. Copy number analysis was performed using PennCNV program as previously described [8].

### Mutational analysis.

We designed primers (**Supplementary Table. 2 online**) using Primer 3 or ExonPrimer (see URLs section below). We analyzed exon fragments on an ABI3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). RNAs were treated with DNaseI to avoid genomic DNA amplification. We synthesized cDNA from 3 ug total RNA using random hexamer, OligodT and Superscript III (Invitrogen) according to the vendor's protocol. We prepared cDNA from total RNA and performed cDNA analysis by PCR with the primers as indicated in manufacturer's protocol. Purified PCR fragments were subcloned into pCR®II-TOPO TA cloning kit (Invitrogen) **Supplementary Table 2 online**.

**Quantitative real-time PCR.**

We performed the quantitative real-time PCR experiments using an ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems) on genomic and cDNA. We generated transcript-specific primers with Primer Express software (Applied Biosystems) designed to prevent nonspecific amplification. The PCR conditions and analysis of the obtained data were optimized using published protocol [30, 31]. We normalized the cycle of threshold value (Ct) to the transcripts for the housekeeping genes *β-globuline*, and *GAPDH*. We performed calculations as described previously [30, 31]. Primers sequences are shown in [32]

**Supplementary Table 2 online.**

**In vitro labeling of mitochondrial translation products.**

Detailed protocol was previously described [33].

**Steady-state levels of tRNAMet.**

Ten micrograms of total RNA extracted from control and patient lymphoblasts were run on a 10% polyacrylamide gel containing 7M urea, followed by transfer to Hybond N+ membrane (GE Healthcare). Pre-hybridization and hybridization were carried out in EXPRESSHyb solution (Clontech) according to the manufacturer's instructions. The oligonucleotides used for the generation of the <sup>32</sup>P-labelled probes had the following sequences: 5'TGGTAGTACGGGAAGGGTATAACC3' for tRNAMet and 5'TGGTATTCTCGCACGGACTACAAC3' for tRNAGlu.

**Antibody to MARS2, western blotting.**

N-terminal rabbit polyclonal antibody was obtained from Abnova (MARS2-H00092935-Q01). Protein was extracted from cultured cells (10ug) and was subjected to SDS-page and transferred them to PVDF membranes (Millipore). The blot was probed overnight at 4°C with the antibody to MARS2 (1/1000), then were probed for 1 hour at room temperature with anti-rabbit IgG-HRP secondary antibody (1/10,000; Santa Cruz Biotechnology). We visualized proteins using ECL-plus Western Blot detection reagent (Perkin Elmer).

**Southern Blot.**

Southern Blot analysis was performed in order to assess *MARS2* genomic rearrangements. Southern blots were produced using standard protocol with

control and mutation carriers DNA. The following three restriction enzymes for DNA digestion were used: NcoI, Apa1, and HindIII. cDNA probe was obtained from commercial human cDNA digested with Xho/PtsI (OriGene; SC100504). The blots were hybridized with a [32P]-labeled *MARS2* cDNA probe as described (see URL Southern Blot).

#### **CNV and CGH-array.**

We used seven pre-designed ABI®-based Copy Number Assays for human CNV screening; four were located in *MARS2* coding region, one in each coding sequence of the surrounding genes (*PLCL1*, *HSPD1* and *COQ10*) **Supplementary Table 2 online**. Each reaction were performed in quadruplicates on 384 PCR plate with the ABI® Copy Number Reference Assay (*RNaseP*) and CopyCaller™ Software was used for data analysis, all steps were done according to the manufacturer instruction (Applied Biosystems). NimbleGen CGH-array was performed using a chr2 specific fine-tilling oligonucleotide (HG18 CHR2 FT) to detect chromosomal changes. The median probe spacing was ~500 bp. A custom high resolution NimbleGen's 12 x 135K CGH arrays (38 725 probes per array on Chr2) was designed to cover the entire 0.845Mb surrounding *MARS2*. Designed was based on recent publications [34, 35]. The median probe spacing was 1 bp.

#### **URLs.**

UCSC: <http://genome.ucsc.edu/>;

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>;

Protein: <http://www.genecards.org/>;

ExonPrimer: <http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>;

SUSPECTS: <http://www.genetics.med.ed.ac.uk/suspects/>;

mRNA polyadenylation site database: <http://polya.umdj.edu/polyadb/>;

miRNA regulatory site database: <http://www.targetscan.org/>;

MITOCHONDRIA: <http://mitomap.org>

Database of Genome Variation: <http://projects.tcag.ca/variation/>

Southern Blot: [http://www-ufk.med.uni-rostock.de/lablinks/protocols/e\\_protocols/southern.htm](http://www-ufk.med.uni-rostock.de/lablinks/protocols/e_protocols/southern.htm).

## Accession numbers.

We used sequences for *MARS2* with accession number NM\_138395.2 and NP\_612404.1

- [1] Klockgether T: [Ataxias. Diagnostic procedure and treatment]. *Nervenarzt* 2005, 76:1275-1283; quiz 1284-1275.
- [2]. Thiffault I, Rioux MF, Tetreault M, Jarry J, Loiselle L, Poirier J, Gros-Louis F, Mathieu J, Vanasse M, Rouleau GA, et al: A new autosomal recessive spastic ataxia associated with frequent white matter changes maps to 2q33-34. *Brain* 2006, 129:2332-2340.
- [3]. Palau F: Friedreich's ataxia and frataxin: molecular genetics, evolution and pathogenesis (Review). *Int J Mol Med* 2001, 7:581-589.
- [4]. Petzold GC, Bohner G, Klingebiel R, Amberger N, van der Knaap MS, Zschenderlein R: Adult onset leucoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and normal lactate. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006, 77:889-891.
- [5]. Scheper GC, van der Kloek T, van Andel RJ, van Berkel CG, Sissler M, Smet J, Muravina TI, Serkov SV, Uziel G, Bugiani M, et al: Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet* 2007, 39:534-539.
- [6]. Edvardson S, Shaag A, Kolesnikova O, Gomori JM, Tarassov I, Einbinder T, Saada A, Elpeleg O: Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia. *Am J Hum Genet* 2007, 81:857-862.
- [7]. Montermini L, Richter A, Morgan K, Justice CM, Julien D, Castellotti B, Mercier J, Poirier J, Capozzoli F, Bouchard JP, et al: Phenotypic variability in Friedreich ataxia: role of the associated GAA triplet repeat expansion. *Ann Neurol* 1997, 41:675-682.
- [8]. Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, Grant SF, Hakonarson H, Bucan M: PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res* 2007, 17:1665-1674.
- [9]. Zhang F, Khajavi M, Connolly AM, Towne CF, Batish SD, Lupski JR: The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nat Genet* 2009, 41:849-853.
- [10]. Oshima J, Magner DB, Lee JA, Breman AM, Schmitt ES, White LD, Crowe CA, Merrill M, Jayakar P, Rajadhyaksha A, et al: Regional genomic instability predisposes to complex dystrophin gene rearrangements. *Hum Genet* 2009, 126:411-423.
- [11]. Winrow CJ, Pankratz DG, Vibat CR, Bowen TJ, Callahan MA, Warren AJ, Hilbush BS, Wynshaw-Boris A, Hasel KW, Weaver Z, et al: Aberrant recombination involving the granzyme locus occurs in *Atm*<sup>-/-</sup> T-cell lymphomas. *Hum Mol Genet* 2005, 14:2671-2684.
- [12]. Yamashita R, Suzuki Y, Sugano S, Nakai K: Genome-wide analysis reveals strong correlation between CpG islands with nearby transcription start sites of genes and their tissue specificity. *Gene* 2005, 350:129-136.
- [13]. Woese CR, Olsen GJ, Ibba M, Soll D: Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, 64:202-236.

- [14]. Spencer AC, Heck A, Takeuchi N, Watanabe K, Spremulli LL: Characterization of the human mitochondrial methionyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 2004, 43:9743-9754.
- [15]. Rorbach J, Soleimanpour-Lichaei R, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM: How do mammalian mitochondria synthesize proteins? *Biochem Soc Trans* 2007, 35:1290-1291.
- [16]. Antonellis A, Green ED: The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008, 9:87-107.
- [17]. Valente L, Tiranti V, Marsano RM, Malfatti E, Fernandez-Vizarra E, Donnini C, Mereghetti P, De Gioia L, Burlina A, Castellan C, et al: Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu. *Am J Hum Genet* 2007, 80:44-58.
- [18]. Smeitink JA, Elpeleg O, Antonicka H, Diepstra H, Saada A, Smits P, Sasarman F, Vriend G, Jacob-Hirsch J, Shaag A, et al: Distinct clinical phenotypes associated with a mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs. *Am J Hum Genet* 2006, 79:869-877.
- [19]. Fernandez-Vizarra E, Berardinelli A, Valente L, Tiranti V, Zeviani M: Nonsense mutation in pseudouridylate synthase 1 (PUS1) in two brothers affected by myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anaemia (MLASA). *J Med Genet* 2007, 44:173-180.
- [20]. Coenen MJ, Antonicka H, Ugalde C, Sasarman F, Rossi R, Heister JG, Newbold RF, Trijbels FJ, van den Heuvel LP, Shoubbridge EA, Smeitink JA: Mutant mitochondrial elongation factor G1 and combined oxidative phosphorylation deficiency. *N Engl J Med* 2004, 351:2080-2086.
- [21]. Labauge P, Fogli A, Niel F, Rodriguez D, Boespflug-Tanguy O: [CACH/VWM syndrome and leucodystrophies related to EIF2B mutations] *Rev Neurol (Paris)* 2007, 163:793-799.
- [22]. Jacobs HT, Hutchin TP, Kappi T, Gillies G, Minkkinen K, Walker J, Thompson K, Rovio AT, Carella M, Melchionda S, et al: Mitochondrial DNA mutations in patients with postlingual, nonsyndromic hearing impairment. *Eur J Hum Genet* 2005, 13:26-33.
- [23]. Brindefalk B, Viklund J, Larsson D, Thollesson M, Andersson SG: Origin and evolution of the mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Biol Evol* 2007, 24:743-756.
- [24]. Shaul S, Nussinov R, Pupko T: Paths of lateral gene transfer of lysyl-aminoacyl-tRNA synthetases with a unique evolutionary transition stage of prokaryotes coding for class I and II varieties by the same organisms. *BMC Evol Biol* 2006, 6:22.
- [25]. Puccio H, Koenig M: Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* 2000, 9:887-892.
- [26]. Finsterer J: Genetic, pathogenetic, and phenotypic implications of the mitochondrial A3243G tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) mutation. *Acta Neurol Scand* 2007, 116:1-14.
- [27]. Calabrese V, Lodi R, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, Mangiameli A, Pennisi G, Stella AM, Butterfield DA: Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* 2005, 233:145-162.
- [28]. Zhang F, Carvalho CM, Lupski JR: Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends Genet* 2009, 25:298-307.
- [29]. Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR: A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 2007, 131:1235-1247.



- [30] Rouleau E, Lefol C, Bourdon V, Coulet F, Noguchi T, Soubrier F, Bieche I, Olschwang S, Sobol H, Lidereau R: Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to MLH1 germline mutations in Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009, 30:867-875.
- [31] Morlan J, Baker J, Sinicropi D: Mutation detection by real-time PCR: a simple, robust and highly selective method. *PLoS One* 2009, 4:e4584.
- [32] Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J: qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 2007, 8:R19.
- [33] Leary SC, Sasarman F, Nishimura T, Shoubridge EA: Human SCO2 is required for the synthesis of CO II and as a thiol-disulphide oxidoreductase for SCO1. *Hum Mol Genet* 2009, 18:2230-2240.
- [34] Tayeh MK, Chin EL, Miller VR, Bean LJ, Coffee B, Hegde M: Targeted comparative genomic hybridization array for the detection of single- and multiexon gene deletions and duplications. *Genet Med* 2009, 11:232-240.
- [35] Saillour Y, Cossee M, Leturcq F, Vasson A, Beugnet C, Poirier K, Commere V, Sublemontier S, Viel M, Letourneur F, et al: Detection of exonic copy-number changes using a highly efficient oligonucleotide-based comparative genomic hybridization-array method. *Hum Mutat* 2008, 29:1083-1090.

**CHAPITRE V:**

**CONCLUSION**

## CONCLUSION

Les chapitres précédents dépeignent le succès du clonage positionnel et de l'identification du gène muté responsable de cette nouvelle forme d'ataxie spastique autosomique récessive avec leucoencéphalopathie (ARSAL). L'approche a permis la caractérisation clinique d'ARSAL, la cartographie du locus génétique et l'identification des mutations dans le gène *MARS2*. Afin de conclure cette thèse, je vais discuter des implications de cette découverte sur le champ de recherche sur les ataxies, de l'impact de ce type de mutations complexes, des mécanismes pathophysiologiques et moléculaires pouvant être impliqués dans ce syndrome récessif rare de neurodégénération et, en dernier lieu, des perspectives et hypothèses dans le contexte de ce projet.

### **Caractérisation clinique de la cohorte canadienne-française, exclusion des loci connus d'ARCA et identification du locus génétique du gène responsable d'ARSAL**

L'étude des ataxies au Québec a un historique riche en découvertes scientifiques grâce à la qualité des neurologues et neurogénéticiens, et sans conteste, par la présence des nombreux effets fondateurs génétiques qui caractérisent la population canadienne-française et qui ont marqué chacune de ses régions d'une façon unique. Pour n'énumérer que quelques exemples, il existe en ce moment au moins une forme prédominante d'ataxie par région: FRDA en Gaspésie/Acadie, ARSACS au Saguenay-Lac St-Jean, ARCA1 pour la région de la Beauce, Tay-Sachs pour Bas-du-Fleuve/Rimouski, AOA2 pour la péninsule gaspésienne et ARSAL pour le comté de Portneuf [1].

Tel que décrit dans le Chapitre 1, le champ de recherche sur les ataxies est en constante progression et évolution. La caractérisation clinique a laissé place à la caractérisation génétique [2]. Un nombre incessant de nouveaux loci et gènes sont rapportés chaque année dans la littérature. À cet effet, le

nombre de syndromes récessifs ataxiques est passé à plus de 34 entités [2], sans compter les syndromes dont le phénotype chevauche et brouille celui des ARCA, par exemple les paraplégies spastiques ( $n \geq 17$ ) [3;4] et les leucodystrophies (VWM; OMIM 603 896 ;  $n \geq 6$ ) [5;6].

Pour ce projet, nous avons débuté la cohorte d'ARSAL avec trois familles présentant un phénotype similaire d'ataxie spastique récessive sans diagnostic moléculaire. Les informations généalogiques liaient les familles à la région de Portneuf, ce qui renforçait notre hypothèse de nouvelle forme d'ataxie récessive avec effet fondateur canadien-français. Le recrutement de la cohorte, comprenant environ 50 familles, s'est échelonné sur plus de deux ans. Le succès de l'approche a reposé sur la qualité des échantillons obtenus de nos divers collaborateurs, ce qui a permis de bien rapporter la présentation clinique et d'obtenir la puissance nécessaire pour réduire l'intervalle candidat. Afin de minimiser le bruit de fond de nos analyses génotypes et haplotypes, chaque famille a été testée afin d'exclure les loci connus (Chapitre 2).

En 2004, nous avons effectué un premier criblage du génome entier par marqueurs microsatellites avec les trois premières familles recrutées (familles A, B et C). Les analyses de liaison ont identifié un LOD score maximal au marqueur D2S2321 sur le chromosome 2q33-34. Le typage de la cohorte entière a permis de renforcer l'ancrage à l'intervalle candidat de  $\sim 3.3$ Mb. Les haplotypes suggéraient la présence de deux ou trois mutations différentes. Selon nos résultats et les renseignements généalogiques recueillis, deux mutations différentes ont émergées dans la population du comté de Portneuf, alors que la troisième mutation semble avoir une généalogie avec la région du Saguenay Lac-St-Jean. L'hétérogénéité de notre cohorte a facilité la cartographie du locus ainsi que l'identification du gène muté.

L'intervalle candidat, bien que riche en gènes, est très pauvre en marqueurs polymorphiques de qualité. À ce problème, nous avons privilégié une approche par gènes candidats. ARSAL s'ajoute aux cinq syndromes neurodégénératifs qui ont été localisés sur le chromosome 2q33-34; la

paraplégie spastique héréditaire 13 (SPG13; *HSP60*; OMIM 605280), la paralysie cérébrale spastique héréditaire (CPSQ1, *GAD1*, OMIM 603513), la sclérose latérale amyotrophique de type 2 (ALSJ, *ALS2*, OMIM 205100), le locus pour la paraplégie spastique héréditaire 30 (SPG30; 2q37) [7] et le locus d'une paraplégie spastique avec dystonie (2q24-31) [8]. Plus de 37 gènes ont été séquencés desquels aucun variant, autres que des polymorphismes (SNP), n'a été identifié.

L'avènement des micropuces SNP pour le génotypage a rapidement fait compétition au criblage de génome entier par marqueurs microsatellites. Le projet HAPMAP a eu un effet levier sur le développement de technologies de génotypage à haute-densité, sur la production de plateformes alternatives et surtout, sur l'accessibilité. Les plateformes de type Illumina et Affymetrix sont devenues abordables et adaptables pour les petits projets [9-11]. L'un des héritages les plus valables du projet HAPMAP est l'information générée sur le déséquilibre de liaison (LD) du génome humain. Il est devenu clair que le génome humain affiche beaucoup plus de régions de LD que ce qui avait été observé et prédit [12]. Ces observations suggèrent que les méthodes analytiques basées sur le LD ont une plus grande valeur informative que précédemment. De plus, la définition des haplogroupes permet de réduire le nombre de marqueurs SNP nécessaires lors du design d'une étude puisque les SNP issus d'un même haplogroupe sont corrélés ensemble [13].

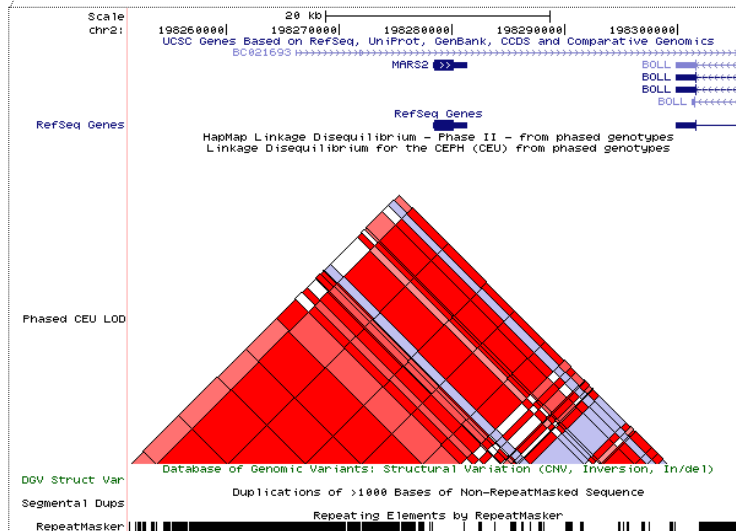
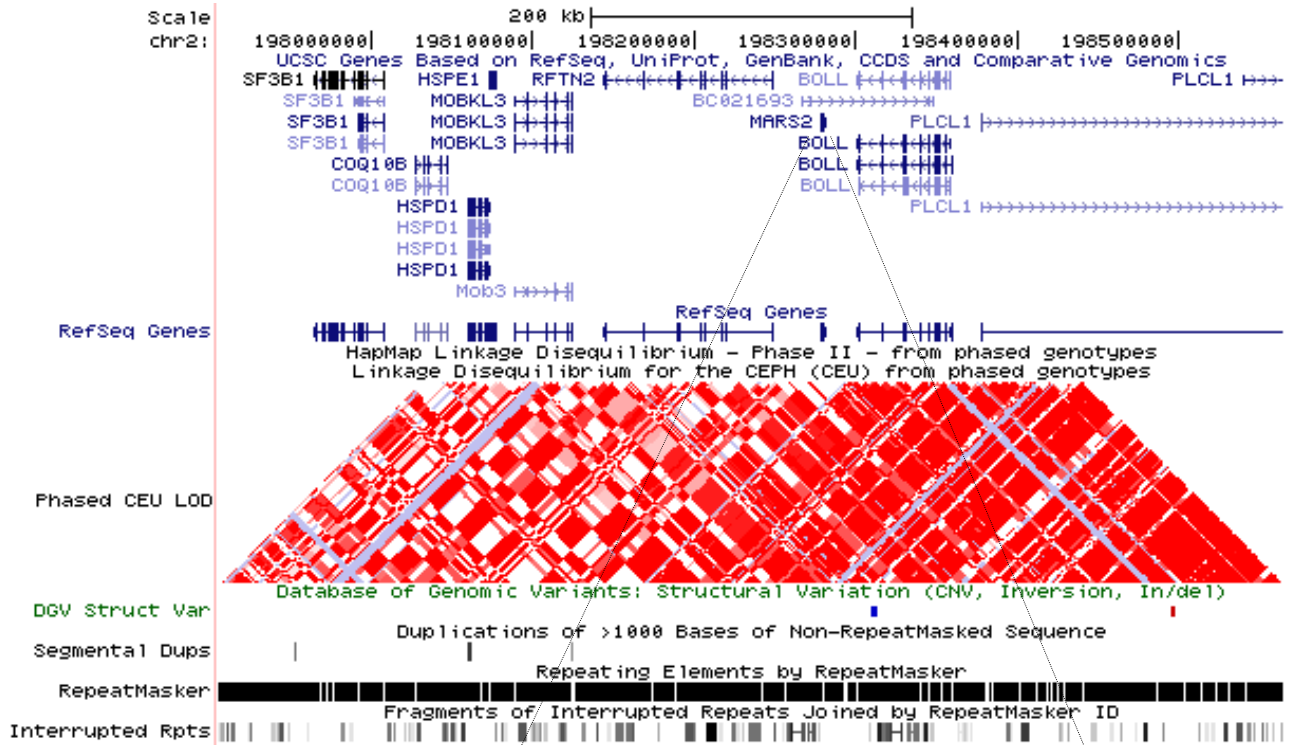
Les données de la HAP300 ont confirmé la localisation du locus ARSAL sur le chromosome 2q33-34 et permis la réduction de l'intervalle. Plusieurs facteurs influencent le succès du clonage positionnel par homozygotie et les analyses de déséquilibre de liaison. Pour ce projet, nous avons une cohorte relativement homogène où les facteurs tels que l'utilisation de grandes familles, la dérive génétique, l'isolement, le haut coefficient de parenté typique à notre population, ont positivement contribué à la réussite [14-17]. Par exemple, les analyses de BEADSTUDIO révélaient une région d'homozygotie de plus de 50Mb pour la grande famille (B) sur le chromosome 2q (Chapitre 3, Figure 2). Aucune autre région du génome n'a démontré autant d'homozygotie pour les atteints de la famille B. Heureusement, l'analyse des haplotypes a confirmé la présence d'au moins trois mutations dans la cohorte ARSAL et a

démontré la présence de recombinaisons inter- et intrafamiliales, réduisant ainsi notre intervalle à 0.658Mb (Chapitre 3, Figure 3). Cet intervalle est situé dans une région à haut taux de déséquilibre de liaison dans la population caucasienne tel que démontré dans la Figure 2. Les études récentes ont démontré que des régions de "hotspots", perte de LD et sites potentiels de recombinaison sont notablement liés à des régions de duplication, typiquement enrichies de séquences répétées LINE, SINE, répétitions simples et hautement conservées entre les espèces. Ces régions contiennent principalement les gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADN, l'ARN, protéine, la réparation de l'ADN et le cycle cellulaire [18]. Ces observations sont applicables à la région entourant le gène *MARS2* qui est aussi liée à un fort taux de déséquilibre de liaison (Figure 1 et 2; données extraites de HapMap LD Phased Track, UCSC) très riche en séquences répétées (Figure 1; repeatmasker) et conservées entre les espèces. Il est intéressant de souligner que la région du 3'UTR de *MARS2* et intergénique de *BOLL*, à la différence de sa séquence codante, et se situe dans un endroit faible en LD et pauvre en séquences répétées (Figure 1 et Figure 2). L'analyse de la structure et des composantes de la séquence entourant *MARS2* contribue à la compréhension des mutations, des éléments pouvant prédisposer à l'instabilité génomique régionale et contribuer à l'initiation de réarrangement (Figure 1).



**Figure 1 :** Schéma graphique, modifié du Genome Browser de UCSC, représentant la structure du chr2 en position 198257136-198302555 (taille de 45,420 bp). Le gène *MARS2* est constitué d'une séquence riche en GC et son îlot CpG couvre plus du 50 % de sa séquence codante. La séquence de *MARS2* est chevauchée par la présence d'un gène non-codant (BC021693) constitué de quatre exons. La région ne contient aucun CNV, inversion, in/del, duplication ou variation structurelle, tel que démontré par l'absence d'information pour chacune des bases de données énumérées au centre de l'image. Par ailleurs, les données extraites de RepeatMasker soulignent la richesse des éléments répétés entourant la séquence de *MARS2*. Les éléments de la famille SINE sont principalement des Alu de type Sx, Sg et Sp. Trois éléments de la famille MIR sont représentés en gris pale. Les éléments de type LINE sont particulièrement denses en 5' du gène. La plupart sont issus du sous-groupe L1PA ou L1PB. Leur homologie est soulignée par la représentation de séquences répétées interrompues (Fragments of Interrupted Repeat). À moins de 150 pb du 5'UTR de *MARS2* se situe une courte répétition non polymorphique d'ADN de (CGGGG)<sub>n</sub>. Plusieurs séquences de faible complexité entourent *MARS2*, chacune est de type AT-rich. Aucun pseudogène de *MARS2* ou autre gène ne se situe dans cette région du 2q33-34





**Figure 2** : Schéma graphique de l'intervalle candidat SNP de 0.658Mb extrait de UCSC, PHASE II HAPMAP, analyses de déséquilibre de liaison (LD) calculées avec les génotypes phasés de la population caucasienne (CEU). Le rouge indique une valeur élevée de LD entre deux ou plusieurs marqueurs (SNP). Ceci signifie que les marqueurs sont transmis en « block ». Une faible valeur de LD suggère que les marqueurs tendent à être hérités de façon presque aléatoire.

## **Identification et caractérisation des mutations causant ARSAL**

La découverte des premiers indices de mutations dans le gène *MARS2* a été un événement excitant qui a soulevé, tout au long des deux dernières années, autant de questionnements que d'enthousiasme. Avec l'utilisation d'outils d'analyse de la variation du nombre de copies (CNV), nous avons découvert que les résultats préliminaires des premiers PCR, révélant ce qui apparaissait comme de simples insertions et délétions, étaient en fait des portions « de puzzle » de réarrangements complexes et non récurrents.

De nombreux champs d'application bénéficient de la technologie des « puces à ADN ». Depuis quelques années, elle est devenue une technologie de référence robuste et reproductible dans les laboratoires de diagnostics moléculaires pour l'identification d'aberrations chromosomiques jadis effectuée par caryotypage. Ces avancées ont transformé les études de variations génotypiques par l'association de variations dans le nombre de copies et la susceptibilité ou développement de la maladie [19]. Les CNV constituent maintenant la plus grande source de diversité humaine [20]. Il est reconnu que les CNV peuvent apparaître par différents mécanismes ; soit par recombinaison, par réplication ou de façon de novo [21]. Les CNV peuvent être la cause de maladies mendéliennes, sporadiques ou complexes. Leur impact moléculaire peut être variable ; impact phénotypique bénin, dosage génique, disruption d'un gène, fusion génique, effet de localisation (ex. : site de répression, régulation, épissage) etc. [21]. De nombreuses études rapportent leur importance dans l'évolution des génomes, plus particulièrement dans la duplication génique et le remaniement des exons [22;23].

Jusqu'à tout récemment, peu de réarrangements (grandes délétions, insertions et réarrangements complexes) avaient été rapportés dans les bases de données de mutations mendéliennes. Les méthodes standard de PCR servant de criblage pour les régions et les gènes candidats ne permettaient pas leur identification. Depuis 2004, les outils de criblage entier du génome par SNP ont permis de remplir le gap technologique et d'identifier plus de 38 000 CNV (résolution de >100 pb) [24]. Depuis, des CNV pathologiques ont

été rapportées dans quelques maladies neurologiques complexes telles que la schizophrénie, l'autisme, le parkinson et le retard mental [21]. Des CNV ont aussi été rapportées dans les maladies mendéliennes neuromusculaires ; syndrome de leucodystrophie Pelizaeus-Merzbacher [25], paraplégie spastique 2 [25], dystrophie musculaire de Duchenne [26], réarrangements de six gènes incluant l'ataxie de Charlevoix-Saguenay (ARSACS) [27] etc. Tel que discuté dans le Chapitre III, différentes plateformes génomiques permettent l'analyse des CNV. Dans notre étude, deux des trois plateformes utilisées ont échoué dans l'identification des mutations de *MARS2* à cause de leur faible résolution. Ce n'est qu'en 2009 qu'une nouvelle génération de plateforme CGH est devenue commerciale. La performance de criblages à haute densité a prouvé leur efficacité dans la détection de CNV d'un seul exon (taille approximative de 100pb, résolution de 1pb) [28;29] et dans l'interprétation de mutations complexes [30;31]. L'exploitation des données haut débit nécessite des compétences bioinformatiques et statistiques spécifiques. Les outils d'analyse permettent une visualisation des données et donnent une approximation des événements génomiques. Toutefois, une interprétation fine et précise nécessite l'utilisation de plusieurs programmes d'analyse et de bases de données afin de comprendre les subtilités et la complexité de ce type de mutations. L'avènement de cette nouvelle ère de CGH permettra d'identifier les mutations complexes qui n'ont pu être détectées par les anciennes technologies et permettra de mieux définir les réarrangements identifiés grâce à sa résolution précise et sa couverture complète des séquences introniques. La confirmation par méthodes alternatives de quantification telles les essais ABI-CNV est nécessaire. Par ailleurs, tel que présenté dans le Chapitre IV, l'amplification des jonctions des réarrangements et l'interprétation de leurs séquences sont complexes et hasardeuses. Les données actuelles nous permettent de stipuler sur la plus probable hypothèse du mécanisme ayant causé les réarrangements dans *MARS2*. Il est toutefois difficile de prouver et localiser chaque jonction et l'impact réel sur la séquence en 5' de *MARS2*. Les études similaires effectuées par le laboratoire de Lupski ont généralement un taux de succès de 33 % pour l'amplification des séquences flanquant les réarrangements (pourcentage augmenté par délétions) et un taux de réussite de clonage/séquençage de moins de 17 % [30;31]. L'identification et la caractérisation de trois mutations originales et complexes dans le gène *MARS2*

responsable de l'ARSAL constituent une découverte importante puisqu'il s'agit du premier syndrome autosomique récessif causé par des réarrangements complexes. De plus, la nature complexe des mutations dans ce gène à exon unique semble avoir été générée par plus d'un événement de type FoSTeS, mécanisme de réarrangement causé par le désengagement de la fourche de réplication [21]. Ces événements semblent avoir été influencés par la forte homologie des éléments répétés entourant la séquence riche en GC de *MARS2* (Figure 1). Les similarités de séquences des jonctions amplifiées (séquences d'Alu, fragments sens et anti-sens de *MARS2*) suggèrent que les deux réarrangements impliquant une duplication du gène ont été initiés par un processus similaire induit par la formation d'épingle ou « hairpin » suivi d'un désengagement de la fourche de réplication, glissement de séquence ou « template-switching ». Ce procédé de désengagement peut arriver à plusieurs reprises, surtout lorsque la séquence du réarrangement est particulièrement instable. L'instabilité a été observée par l'amplification des jonctions en 5' de l'ATG de *MARS2* et pourrait possiblement contribuer à la variabilité phénotypique inter- et intra familiale. La révision des bases de données CNV et de la littérature ne révèlent aucun événement similaire dans la région de *MARS2* (Figure 1). Ceci renforce les éléments de preuves de la pathogénécité des réarrangements de type CNV identifiés dans la cohorte ARSAL.

### **AARS : nouvelle famille de gènes causant des syndromes neurodégénératifs complexes**

Les aminoacyl-tRNA synthétases mitochondriales sont associées à une variété de maladies humaines récessives et dominantes incluant les myopathies mitochondriales, les leucoencéphalopathies, la surdité, le cancer, les désordres immunologiques et le diabète [32]. ARSAL est le troisième syndrome neurodégénératif avec leucoencéphalopathie   être causé par des mutations dans un gène aminoacyl-tRNA synthétase (AARS) mitochondrial. Les deux premiers ont été rapportés en 2007: la leucoencéphalopathie avec atteinte de la moelle épinière et élévation en lactate (LBSL, OMIM 611105) causée par l'aspartyl-tRNA synthétase (DARS2) [33] et l'hypoplasie pontocérébelleuse (PH, OMIM 611 523) causée par l'arginyl-tRNA synthétase

(RARS2) [34]. Il est intéressant de souligner que, dans les trois maladies, le cervelet est impliqué. Dans LBSL, la présentation clinique débute par une ataxie cérébelleuse congénitale progressive [33;35], tandis que pour les rares cas décrits de PH, tous meurent en très bas âge d'une hypoplasie du cervelet [34].

Deux autres syndromes neurologiques sont associés à des mutations dans les AARS. Une forme dominante de Charcot-Marie-Tooth est causée par des mutations dans le glycyL-tRNA synthétase (CMT2D, GARS, OMIM 600 287) [36]. Bien que ce gène soit identifié comme une AARS cytoplasmique, l'évolution de ce dernier dans le génome humain lui a conféré les deux fonctions par l'ajout en N-terminal d'un signal peptide pour l'importation dans la mitochondrie [37]. Le syndrome de MERRF (« Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers » ou épilepsie myoclonique avec fibres rouges déchiquetées) est une encéphalomyopathie mitochondriale caractérisée par des crises myocloniques (MERRF, OMIM 545 000). Ce dernier est causé par des mutations dans le gène mitochondrial codant pour la phényl-tRNA synthétase [38]. Par ailleurs, une substitution dans le gène nucléaire codant pour la leucyl-tRNA synthétase mitochondriale (LARS2, OMIM 604544) semble être un facteur de risque pour le diabète de type 2 [39]. Les similitudes et différences phénotypiques des maladies AARS humaines sont résumées en Table 1.

**Table 1** : Caractéristiques cliniques et pathologiques entre l'ARSAL et les principales maladies humaines des AARS mitochondriales ou cytoplasmiques.

Human Diseases	ARSAL	Leukoencephalopathy (LSBL)	Pontocerebellar Hypoplasia	Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2D)	Type 2 diabetes susceptibility gene
Chromosome Genes	Recessive 2q33 <i>MARS2</i>	Recessive 1q25.1 <i>DARS2</i>	Recessive 6q16.1 <i>RARS2</i>	Dominante 7p15 <i>GARS</i>	Complexe 3p21,3 <i>LARS2</i>
Age at diagnosis (yr)	2-59	childhood	3 days	childhood	Adult
Lactate elevation	Unknown	Yes	CSF lactate--yes	No	Unknown
Spasticity	Unknown	Yes	Yes	No	Unknown
Ataxia	Yes	Yes	Unknown	No	Unknown
Dystonia	Yes	Yes	Yes	No	Unknown
White matter changes	Yes	Yes	Yes	No	Unknown
Cerebellar atrophy	Yes	Yes	Yes	No	Unknown
Corpus Callosum atrophy	Yes	Yes	Yes	No	Unknown
Sensory involvement	Unknown	Yes	Unknown	Yes	Unknown
Mental retardation	Yes	Yes	Yes	Rare	Unknown
References:	In preparation	Scheper et al. Nat. Gen. 2007	Edvardson et al. AJHG 2007	Antonellis, A et al. AJHG 2003	Hart LM et al. Diabetes. 2005

## AARS : Fonctions et dysfonctions des mitochondries

Les mitochondries, organelles présents à une centaine d'exemplaires dans chaque cellule de l'organisme, ont pour fonction spécifique la production d'énergie chimique sous forme d'ATP couplée à la consommation d'oxygène (phosphorylation oxydative). Sous le terme de maladie mitochondriale, on désigne des maladies multisystémiques ou à expression tissu spécifique dues à un déficit de la phosphorylation oxydative qui est assurée par le fonctionnement de cinq complexes protéiques enzymatiques correspondant à l'assemblage d'environ 80 sous-unités protéiques parmi lesquelles 13 sont codées par le génome mitochondrial, et les autres par le génome nucléaire ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)). La rigueur de la synthèse des protéines mitochondriales repose sur cette famille d'enzymes essentielles nommée aminoacyl-tRNA synthétases (AARS). L'évolution phylogénique des AARS mitochondriales est associée à une réduction de la diversité de la population tRNA et accompagnée par une versatilité fonctionnelle [40;41]. Le génome humain comprend plus de 20 AARS mitochondriales, tel que décrit dans la Table 4 (Chapitre IV). Les changements attribués à cette famille d'enzymes chez les eucaryotes supérieurs sont aussi liés à l'évolution de génome mitochondrial. La théorie endosymbiotique basée sur le principe que la mitochondrie est d'origine  $\alpha$ -protéobactérienne explique pourquoi seulement 13 protéines sont codées par l'ADN mitochondrial, vestige du génome de l'endosymbionte [40]. Toutes les autres protéines sont codées par le génome nucléaire. Les protéines mitochondriales possédant un homologue procaryote résultent probablement du mécanisme de transfert de gène latéral (LGT). Par exemple, pour les AARS humaines, il existe deux met-tRNA synthétase codées par l'ADN nucléaire: *MARS2* a une fonction mitochondriale et *MARS* a une fonction cytoplasmique. Les deux gènes partagent peu d'homologie, étant issus de deux génomes différents. Le LGT est une force évolutionnaire dominante qui est responsable du déplacement de séquences codantes mitochondriales au noyau [42;43]. Le gène transféré au noyau peut coder les protéines qui seront ensuite importées à l'intérieur de la matrice mitochondriale (via un peptide signal en position N-terminal pour les AARS) [44]. La phylogénie et les études sur l'évolution des AARS soulèvent l'hypothèse que ces gènes sont sensibles aux réarrangements et mutations. La structure du gène humain *MARS2* est un exemple récent de

changement évolutif positif par la perte de ses séquences introniques. Ce type de changement appelé réaménagement exonique (« exon shuffling ») est causé par des mécanismes tels que ceux impliqués dans les CNV: FoSTeS, recombinaison homologue ou non-homologue, recombinaison non-allèlique ou via retrotransposon [21].

Les maladies AARS entrent dans la famille des cytopathies mitochondriales liées à des mutations de gènes nucléaires. Ce groupe se sous-divise en deux catégories de sortes de gènes: (i) des gènes codant pour les sous-unités de la chaîne respiratoire, et (ii) des gènes codant pour des protéines impliquées dans le maintien et la réplication de l'ADN mitochondrial (ex. *MARS2*). La Table 2 résume l'impact sur la chaîne respiratoire des formes classiques de cytopathies mitochondriales.

Dans le deuxième groupe, on retrouve aussi les gènes *NDUFS* contrôlant des protéines du complexe I qui sont mises en cause dans le syndrome de Leigh avec cardiomyopathie [45]. On peut rapprocher ces anomalies des protéines de structure à celles des déficits touchant la co-enzyme Q10 dont les phénotypes associés de façon variable sont : myoglobinurie, retard mental et ataxie [46]. Dans ce groupe se trouvent également les mutations affectant des gènes qui contrôlent des protéines d'assemblage de la chaîne respiratoire. Il s'agit essentiellement de l'assemblage du complexe IV. Le déficit, là encore, s'exprime chez l'enfant par un syndrome de Leigh et touche le gène *SURF-1* [47;48]. Des mutations dans les gènes *SCO1* et *SCO2* dont les protéines sont impliquées dans l'incorporation de l'atome de cuivre dans le site catalytique du complexe IV sont reconnues comme à l'origine de cardioencéphalopathie ou de coma acido-cétosique infantile [49;50].

Enfin, il y a aussi les mutations dans des gènes nucléaires codant pour des facteurs mitochondriaux indirectement impliqués dans la phosphorylation oxydative qui s'expriment par des maladies non véritablement considérées comme des maladies de la chaîne respiratoire, mais physiopathologiquement liées à des modifications de la production énergétique. Il s'agit du gène de la paraplégine avec expression phénotypique dans des paraplégies spastiques



autosomiques dominantes ou récessives, du gène *DDP1* codant pour une protéine d'importation mitochondriale impliquée dans le syndrome de surdité, dystonie, atrophie optique [51;52], du gène *ABC7* codant pour un transporteur du fer impliqué dans l'anémie sidéroblastique [53;54], du gène de la frataxine, assurant le stockage du fer mitochondrial mis en cause dans l'ataxie de Friedreich. La mutation (GAA)<sub>n</sub> est responsable d'une diminution de l'expression de la frataxine [55;56], ce qui perturbe le métabolisme du fer au niveau mitochondrial, et enfin du gène *ATP7B* lui aussi impliqué dans la régulation du métabolisme du fer responsable de la maladie de Wilson [53;54].

En pratique, bien que l'épidémiologie des maladies mitochondriales reste imprécise, certains suggèrent une prévalence de 12,5 pour 100. Il est certain que l'importance des maladies mitochondriales reste encore sous estimée [57;58]. Les mutations dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans le maintien et la réplication de l'ADN mitochondrial (ex. AARS) peuvent s'accompagner d'anomalies quantitatives et/ou qualitatives de l'ADNmt : délétions multiples et déplétion de l'ADNmt [59-61]. Les acteurs moléculaires régulant ces processus sont encore peu connus et à l'heure actuelle, le gène muté a été caractérisé pour seulement 30 % des patients présentant une déficience en ADNmt [60]. Les analyses mitochondriales effectuées à ce jour pour l'ARSAL n'ont pas évaluées le déficit potentiel en ADNmt. Toutefois, nos analyses ont observé une diminution dans la traduction mitochondriale, les taux varient entre les patients et semblent corréler avec la sévérité (Chapitre IV, Figure 3 et Table 3 supplémentaire).

**Neurodégénérescence et mitochondrie : Serait-ce possible que la variabilité et la sévérité soient expliquées par une instabilité de l'ADNmt ?**

De façon générale, les troubles neurodégénératifs aboutissent à la détérioration progressive de la fonction du système nerveux central (CNS). La maladie de Parkinson, la maladie d'Huntington (HD), l'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique (SLA) affectent différents types de cellules dans le CNS. Toutefois, la progression de la maladie dans ces cellules partage

beaucoup de similitudes. Bien que plusieurs gènes associés à chacune de ces maladies aient été identifiés, leur processus de neurodégénération demeure inexpliqué. Autres caractéristiques semblables ; l'âge d'apparition des symptômes varie, et bien que les gènes soient exprimés dans toutes les cellules, la dégénérescence est limitée à certaines régions du CNS [62;63]. Au cours de la vie, le ratio de mitochondries et de types de mitochondries dans une cellule ou dans un tissu peut changer. Cet aspect particulier de la génétique mitochondriale pourrait influencer la variabilité des signes, les symptômes et la sévérité, autant inter- qu'intra-familiale. De plus, l'hétéroplastie et la distribution de mutations héritées et acquises dans le génome mitochondrial peuvent varier parmi les types de cellules, contribuant partiellement à une explication de la spécificité du type cellulaire dans la pathogenèse et dans la neurodégénération [64;65]. Les études récentes démontrent que l'ADN mitochondriale des patients atteints d'Alzheimer et de Parkinson contient des délétions et mutations [65;66]. Par ailleurs, certains patients atteints de SLA ont une activité mitochondriale déficiente [67]. De plus, le rôle potentiel de la mitochondrie dans l'apoptose pourrait aussi influencer la corrélation entre l'âge, la sévérité et le processus général de dégénérescence neuronale.

Une preuve génétique supplémentaire que des mutations dans *MARS2* sont responsables d'ARSAL est venue de la découverte simultanée de mutations dans le gène homologue de *MARS2* chez la Drosophile (*aats-met*). L'impact des mutations dans l'homologue de *MARS2* cause un phénotype de neurodégénération selon nos collaborateurs (communication personnelle, D<sup>rs</sup> Vafa Bayat et Hugo J. Bellen, Baylor's College, Houston, Texas). Le partage des connaissances et des résultats contribue à mieux définir les hypothèses sur la pathophysiologie d'ARSAL et à élargir le questionnement. Par exemple, l'analyse des mutants *aars-met* par microscopie électronique démontre la présence d'une désorganisation cellulaire dès la naissance. Les études longitudinales ont permis d'observer une dégénérescence progressive ainsi que la présence de mitochondries vacuolées. Cette observation est particulièrement intéressante puisque qu'elle souligne la similitude d'ARSAL avec la SLA causée par *SOD1*. Le processus de vacuolation mitochondriale dans la SLA est répandu et observé pendant les premières phases de

dégénérescence du motoneurone. Les modèles murins ont permis de caractériser le mécanisme responsable de la vacuolation ; il s'agit d'une expansion de l'espace inter membranaire mitochondrial et de l'extension de la membrane extérieure, et impliquant les peroxysomes. [68;69]. Les études suggèrent également une diminution des mécanismes de réparation de l'ADNmt, donc une diminution des mécanismes de protection contre le stress oxydatif et l'accumulation d'espèces réactives oxygénées [70;71]. Des études similaires ont été publiées sur l'ataxie de Friedreich [10-13-14-18]. Cette observation a aussi été validée par marquage immunohistochimique dans le modèle aats-met Drosophile (communication personnelle). Il est intéressant de noter que les plus récentes études FRDA stipulent que le ROS et les accumulations de fer semblent être des événements tardifs de la pathogénie. Les premiers impacts des mutations sont biochimiques, soit la dysfonction de la chaîne respiratoire par les complexes I-III et la dysfonction des complexes protéiques fer-soufre (ISC) [19-21]. Dans les études effectuées sur cinq patients ARSAL, les mutations semblent avoir un impact principalement sur le complexe I, et légèrement sur le IV. Pour certains patients, la diminution de la traduction mitochondriale affecte tous les complexes de façon globale.

## **Perspectives**

En continuation avec les intérêts développés par les découvertes de mon projet de doctorat, mon projet de stage postdoctoral repose sur la technologie de reprogrammation cellulaire permettant de produire des lignées de cellules pluripotentes induites (iPS) à partir de lignées de fibroblastes dermiques humains [39]. Ces lignées cellulaires seront ensuite différenciées afin de produire un modèle adéquat d'étude des mécanismes biochimiques impliqués dans la fonction et dysfonction mitochondriale ainsi que la neurodégénération [39;41].

Ainsi, mon hypothèse de travail est qu'en produisant des cellules souches pluripotentes induites (iPS) avec les fibroblastes de patients ARSAL ayant des génotypes et phénotypes différents, nous pourrions avoir un modèle cellulaire approprié à la compréhension de la maladie et nous pourrions possiblement expliquer la variabilité phénotypique.

**Les buts spécifiques afin de tester les hypothèses de recherche sont :**

1. La génération de cellules iPS patients-spécifiques en utilisant les protocoles récemment publiés [72-74]. Nous produirons des cellules iPS patients-spécifiques en utilisant les lignées fibroblastiques obtenues par des biopsies de peau ;

2. Différenciation des cellules iPS en différents types cellulaires appropriés à l'ARSAL en premier lieu, nous produirons des lignées neuronales ;

3. L'évaluation bioénergétique et métabolique mitochondriale des différents mutants *MARS2* dans le contexte de différents types cellulaires, et leur impact sur la fonction mitochondriale par immunohistochimie, gel de type PAGE Native Blue, les essais quantitatifs et qualitatifs de la fonction des complexes de la chaîne respiratoire, l'accumulation et production d'espèces réactives oxygénées ;

4. L'évaluation des défauts dans la traduction mitochondriale des cellules différenciées des patients ARSAL et leurs effets sur l'assemblage des complexes OXPHO ou leurs fonctions. Nous testerons si les mutations produisent des défauts de traduction mitochondriale dans les différents types cellulaires en examinant la synthèse et les niveaux de production de la traduction mitochondriale.

5. L'évaluation du renouvellement mitochondrial, la biogenèse et le transport. Les mitochondries sont des organelles dynamiques dont la régulation du nombre et de la fonction est critique au métabolisme et à la survie cellulaire. Dans l'ARSAL, il serait possible d'observer dans le début du développement de la maladie un déficit dans le transport mitochondrial, suivi de changements dans le renouvellement mitochondrial. Effectuer des mesures quantitatives de la libération des signaux pro-apoptotiques, des protéines impliquées dans les processus de protection et intégrité cellulaire ;

6. Utiliser les lignées cellulaires iPS pour le criblage pharmacologique afin d'identifier des molécules thérapeutiques pouvant réguler la fonction mitochondriale. La mitochondrie joue une variété de rôles en intégrant les signaux extracellulaires et en exécutant des événements intracellulaires importants pour la survie neuronale et la mort [75]. Dans ce contexte, les approches thérapeutiques peuvent exercer quelques mécanismes salutaires et neuroprotecteurs pour ralentir ou arrêter la progression de l'ARSAL et autres processus neurodégénératifs.

Une meilleure compréhension de l'impact des mutations sur l'expression, la fonction de *MARS2* et la dysfonction mitochondriale comme cause d'ARSAL mènera à une meilleure compréhension des raisons pour lesquelles le système nerveux central, la matière blanche et le cervelet sont particulièrement vulnérables au dysfonctionnement des AARS.

**Table 2: Classic Cytopathies affecting the Mitochondrial Respiratory Chain**

MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN: COMPOSITION					
Complex Enzyme	I	II	III	IV	V
<b>Inhibitor</b>	NADH-CoQ Reductase Rotenone Amytal	Succinate-CoQ Reductase TTFA malonate	CoQ-Cytochrome C Reductase Antimycin A	Cytochrome C Oxidase Cyanide Carbon Monoxide Azide	ATP Synthase Oligomycin
<b>Nuclear DNA Subunits</b>	39	4	10	10	~14
<b>Mitochondrial DNA Subunits</b>	7 ND1-6, ND4L	0	1 Cytochrome b	3 Cytochrome oxidase I, II, III	2 ATPase 6 ATPase 8
<b>Flavoprotein</b>	Flavin mono nucleotide	FAD (SDHA)			
<b>Iron protein</b>	Iron Sulfur (FeS) protein NDUFS1	FeS protein SDHB	Rieske FeS; Cytochrome (Heme) b, c1	Cytochrome (Heme) a, a3	
<b>Other features</b>		Membrane proteins Cytochrome b560 SDHC SDHD		Copper protein	
<b>Disorders</b>	General Alpers Alzheimer's/ Parkinsonism Cardiomyopathy Deficiency Barth Lethal Infantile Encephalopathy Infantile CNS Leber's Leigh Longevity MELAS MERRF Myopathy ± CNS PEO Spinal cord	General Kearns-Sayre Leigh's Myopathy Infantile ± CNS Paraganglioma Pheochromocytoma	General Cardiomyopathy Fatal infantile GRACILE Leber's Myopathy ± CNS PEO	General Alper's Ataxia Deafness Leber's Leigh's Myopathy Infantile Fatal Benign Adult Rhabdomyolysis PEO, KSS, MNGIE MERRF, MELAS	ATP12 Cardiomyopathy Leber's Leigh NARP

**Notes**

- Most mitochondrial encephalomyopathies are associated with mutations in mitochondrial DNA
- Nuclear mutations Defects in respiratory chain
  - Leigh's: Flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase (complex II):
  - Fatal multisystemic complex I deficiency: Infantile onset
    - NADH Dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S Protein 4
      - 18-kD (AQDQ) subunit of complex I
  - Barth syndrome: Tafazzins
  - Hereditary spastic paraparesis 7: Paraplegin
- ~ 1,000 mitochondrial peptides not involved in the respiratory chain: Encoded by nuclear DNA
  - Superoxide dismutase 2 (SOD2)
    - Intramitochondrial free radical scavenging enzyme
    - Degrades superoxide produced as a byproduct of oxidative phosphorylation

## Reference List

- [1] N.Dupre, N.Chrestian, I.Thiffault, B.Brais, G.A.Rouleau, J.P.Bouchard. [Hereditary ataxias, spastic parapareses and neuropathies in Eastern Canada], *Rev Neurol (Paris)*. 164 (2008) 12-21.
- [2] D.S.Di, C.Gellera, C.Mariotti. The complex clinical and genetic classification of inherited ataxias. II. Autosomal recessive ataxias, *Neurol Sci*. 22 (2001) 219-228.
- [3] C.Depienne, G.Stevanin, A.Brice, A.Durr. Hereditary spastic paraplegias: an update, *Curr Opin Neurol*. 20 (2007) 674-680.
- [4] E.Rosulescu, C.Stanoiu, E.Buteica, B.Stanoiu, F.Burada, M.Zavaleanu. Hereditary spastic paraplegia, *Rom J Morphol Embryol*. 50 (2009) 299-303.
- [5] A.Fogli, R.Schiffmann, E.Bertini, S.Ughetto, P.Combes, E.Eymard-Pierre, C.R.Kaneski, M.Pineda, M.Truncoso, G.Uziel, R.Surtees, D.Pugin, M.P.Chaunu, D.Rodriguez, O.Boespflug-Tanguy. The effect of genotype on the natural history of eIF2B-related leukodystrophies, *Neurology*. 62 (2004) 1509-1517.
- [6] J.C.Pronk, P.A.Leegwater, M.S.van der Knaap. [From gene to disease; a defect in the regulation of protein production leading to vanishing white matter], *Ned Tijdschr Geneesk*. 146 (2002) 1933-1936.
- [7] S.Klebe, H.Azzedine, A.Durr, P.Bastien, N.Bousslam, N.Elleuch, S.Forlani, C.Charon, M.Koenig, J.Melki, A.Brice, G.Stevanin. A new locus for autosomal recessive spastic paraplegia (SPG30) on chromosome 2. *Am.J.Hum.Genet. Abstract ASHG meeting 2005*. 2005.  
Ref Type: Abstract
- [8] D.L.Gilbert, E.J.Leslie, M.Keddache, N.D.Leslie. A novel hereditary spastic paraplegia with dystonia linked to chromosome 2q24-2q31, *Mov Disord*. 24 (2009) 364-370.
- [9] E.M.Smith, X.Wang, J.Littrell, J.Eckert, R.Cole, A.H.Kissebah, M.Olivier. Comparison of linkage disequilibrium patterns between the HapMap CEPH samples and a family-based cohort of Northern European descent, *Genomics*. 88 (2006) 407-414.
- [10] S.F.Saccone, J.P.Rice, N.L.Saccone. Power-based, phase-informed selection of single nucleotide polymorphisms for disease association screens, *Genet Epidemiol*. 30 (2006) 459-470.
- [11] S.A.McCarroll, T.N.Hadnott, G.H.Perry, P.C.Sabeti, M.C.Zody, J.C.Barrett, S.Dallaire, S.B.Gabriel, C.Lee, M.J.Daly, D.M.Altshuler. Common deletion polymorphisms in the human genome, *Nat Genet*. 38 (2006) 86-92.

- [12] B.E.Stranger, A.C.Nica, M.S.Forrest, A.Dimas, C.P.Bird, C.Beazley, C.E.Ingle, M.Dunning, P.Flicek, D.Koller, S.Montgomery, S.Tavare, P.Deloukas, E.T.Dermitzakis. Population genomics of human gene expression, *Nat Genet.* 39 (2007) 1217-1224.
- [13] F.J.Steemers, K.L.Gunderson. Illumina, Inc, *Pharmacogenomics.* 6 (2005) 777-782.
- [14] V.Menard, H.Girard, M.Harvey, L.Perusse, C.Guillemette. Analysis of inherited genetic variations at the UGT1 locus in the French-Canadian population, *Hum Mutat.* 30 (2009) 677-687.
- [15] F.Durocher, Y.Labrie, P.Soucy, O.Sinilnikova, D.Labuda, P.Bessette, J.Chiquette, R.Laframboise, J.Lepine, B.Lesperance, G.Ouellette, R.Pichette, M.Plante, S.V.Tavtigian, J.Simard. Mutation analysis and characterization of ATR sequence variants in breast cancer cases from high-risk French Canadian breast/ovarian cancer families, *BMC Cancer.* 6 (2006) 230.
- [16] N.Lee, M.J.Daly, T.Delmonte, E.S.Lander, F.Xu, T.J.Hudson, G.A.Mitchell, C.C.Morin, B.H.Robinson, J.D.Rioux. A genomewide linkage-disequilibrium scan localizes the Saguenay-Lac-Saint-Jean cytochrome oxidase deficiency to 2p16, *Am J Hum Genet.* 68 (2001) 397-409.
- [17] M.Labuda, D.Labuda, M.Korab-Laskowska, D.E.Cole, E.Zietkiewicz, J.Weissenbach, E.Popowska, E.Pronicka, A.W.Root, F.H.Glorieux. Linkage disequilibrium analysis in young populations: pseudo-vitamin D-deficiency rickets and the founder effect in French Canadians, *Am J Hum Genet.* 59 (1996) 633-643.
- [18] A.V.Smith, D.J.Thomas, H.M.Munro, G.R.Abecasis. Sequence features in regions of weak and strong linkage disequilibrium, *Genome Res.* 15 (2005) 1519-1534.
- [19] I.Ionita-Laza, A.J.Rogers, C.Lange, B.A.Raby, C.Lee. Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis, *Genomics.* 93 (2009) 22-26.
- [20] W.Al-Sukhni, S.Gallinger. Germline copy number variation in control populations, *Cytogenet Genome Res.* 123 (2008) 211-223.
- [21] F.Zhang, W.Gu, M.E.Hurles, J.R.Lupski. Copy number variation in human health, disease, and evolution, *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 10 (2009) 451-481.
- [22] Y.S.He, W.Zhang, Z.Q.Yang. [Structural variation in the human genome], *Yi Chuan.* 31 (2009) 771-778.
- [23] N.Takezaki, M.Nei. Genomic drift and evolution of microsatellite DNAs in human populations, *Mol Biol Evol.* 26 (2009) 1835-1840.



- [24] R.Redon, S.Ishikawa, K.R.Fitch, L.Feuk, G.H.Perry, T.D.Andrews, H.Fiegler, M.H.Shapero, A.R.Carson, W.Chen, E.K.Cho, S.Dallaire, J.L.Freeman, J.R.Gonzalez, M.Gratacos, J.Huang, D.Kalaitzopoulos, D.Komura, J.R.MacDonald, C.R.Marshall, R.Mei, L.Montgomery, K.Nishimura, K.Okamura, F.Shen, M.J.Somerville, J.Tchinda, A.Valsesia, C.Woodwark, F.Yang, J.Zhang, T.Zerjal, J.Zhang, L.Armengol, D.F.Conrad, X.Estivill, C.Tyler-Smith, N.P.Carter, H.Aburatani, C.Lee, K.W.Jones, S.W.Scherer, M.E.Hurles. Global variation in copy number in the human genome, *Nature*. 444 (2006) 444-454.
- [25] K.Inoue. PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2, *Neurogenetics*. 6 (2005) 1-16.
- [26] J.Oshima, D.B.Magner, J.A.Lee, A.M.Breman, E.S.Schmitt, L.D.White, C.A.Crowe, M.Merrill, P.Jayakar, A.Rajadhyaksha, C.M.Eng, G.D.del. Regional genomic instability predisposes to complex dystrophin gene rearrangements, *Hum Genet*. 126 (2009) 411-423.
- [27] H.J.McMillan, M.T.Carter, P.J.Jacob, E.E.Laffan, M.D.O'Connor, K.M.Boycott. Homozygous contiguous gene deletion of 13q12 causing LGMD2C and ARSACS in the same patient, *Muscle Nerve*. 39 (2009) 396-399.
- [28] M.R.Hegde, E.L.Chin, J.G.Mulle, D.T.Okou, S.T.Warren, M.E.Zwick. Microarray-based mutation detection in the dystrophin gene, *Hum Mutat*. 29 (2008) 1091-1099.
- [29] Y.Saillour, M.Cossee, F.Leturcq, A.Vasson, C.Beugnet, K.Poirier, V.Commere, S.Sublemontier, M.Viel, F.Letourneur, J.C.Barbot, N.Deburgrave, J.Chelly, T.Bienvenu. Detection of exonic copy-number changes using a highly efficient oligonucleotide-based comparative genomic hybridization-array method, *Hum Mutat*. 29 (2008) 1083-1090.
- [30] F.Zhang, C.M.Carvalho, J.R.Lupski. Complex human chromosomal and genomic rearrangements, *Trends Genet*. 25 (2009) 298-307.
- [31] F.Zhang, M.Khajavi, A.M.Connolly, C.F.Towne, S.D.Batish, J.R.Lupski. The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans, *Nat Genet*. 41 (2009) 849-853.
- [32] S.G.Park, P.Schimmel, S.Kim. Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105 (2008) 11043-11049.

- [33] G.C.Scheper, K.T.van der, R.J.van Andel, C.G.van Berkel, M.Sissler, J.Smet, T.I.Muravina, S.V.Serkov, G.Uziel, M.Bugiani, R.Schiffmann, I.Krageloh-Mann, J.A.Smeitink, C.Florentz, C.R.van, J.C.Pronk, M.S.van der Knaap. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation, *Nat Genet.* 39 (2007) 534-539.
- [34] S.Edvardson, A.Shaag, O.Kolesnikova, J.M.Gomori, I.Tarassov, T.Einbinder, A.Saada, O.Elpeleg. Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia, *Am J Hum Genet.* 81 (2007) 857-862.
- [35] M.S.van der Knaap, d.van, V, F.Barkhof, C.R.van, I.Krageloh-Mann, A.Feigenbaum, S.Blaser, J.S.Vles, P.Rieckmann, P.J.Pouwels. A new leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and high lactate, *Ann Neurol.* 53 (2003) 252-258.
- [36] A.Antonellis, S.Q.Lee-Lin, A.Wasterlain, P.Leo, M.Qezado, L.G.Goldfarb, K.Myung, S.Burgess, K.H.Fischbeck, E.D.Green. Functional analyses of glycyl-tRNA synthetase mutations suggest a key role for tRNA-charging enzymes in peripheral axons, *J Neurosci.* 26 (2006) 10397-10406.
- [37] T.Cihara, D.Luginbuhl, L.Luo. Cytoplasmic and mitochondrial protein translation in axonal and dendritic terminal arborization, *Nat Neurosci.* 10 (2007) 828-837.
- [38] J.Ling, H.Roy, D.Qin, M.A.Rubio, J.D.Alfonzo, K.Fredrick, M.Ibba. Pathogenic mechanism of a human mitochondrial tRNA<sup>Phe</sup> mutation associated with myoclonic epilepsy with ragged red fibers syndrome, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104 (2007) 15299-15304.
- [39] L.M.'t Hart, T.Hansen, I.Rietveld, J.M.Dekker, G.Nijpels, G.M.Janssen, P.A.Arp, A.G.Uitterlinden, T.Jorgensen, K.Borch-Johnsen, H.A.Pols, O.Pedersen, C.M.van Duijn, R.J.Heine, J.A.Maassen. Evidence that the mitochondrial leucyl tRNA synthetase (LARS2) gene represents a novel type 2 diabetes susceptibility gene, *Diabetes.* 54 (2005) 1892-1895.
- [40] S.Smit, J.Widmann, R.Knight. Evolutionary rates vary among rRNA structural elements, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 3339-3354.
- [41] C.R.Woese, G.J.Olsen, M.Ibba, D.Soll. Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process, *Microbiol Mol Biol Rev.* 64 (2000) 202-236.
- [42] O.G.Berg, C.G.Kurland. Growth rate-optimised tRNA abundance and codon usage, *J Mol Biol.* 270 (1997) 544-550.
- [43] O.G.Berg, C.G.Kurland. Why mitochondrial genes are most often found in nuclei, *Mol Biol Evol.* 17 (2000) 951-961.
- [44] S.L.Rusch, D.A.Kendall. Protein transport via amino-terminal targeting sequences: common themes in diverse systems, *Mol Membr Biol.* 12 (1995) 295-307.

- [45] R.Fato, E.Estornell, B.S.Di, F.Pallotti, C.G.Parenti, G.Lenaz. Steady-state kinetics of the reduction of coenzyme Q analogs by complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in bovine heart mitochondria and submitochondrial particles, *Biochemistry*. 35 (1996) 2705-2716.
- [46] C.Sobreira, M.Hirano, S.Shanske, R.K.Keller, R.G.Haller, E.Davidson, F.M.Santorelli, A.F.Miranda, E.Bonilla, D.S.Mojon, A.A.Barreira, M.P.King, S.Dimauro. Mitochondrial encephalomyopathy with coenzyme Q10 deficiency, *Neurology*. 48 (1997) 1238-1243.
- [47] V.Tiranti, C.Galimberti, L.Nijtmans, S.Bovolenta, M.P.Perini, M.Zeviani. Characterization of SURF-1 expression and Surf-1p function in normal and disease conditions, *Hum Mol Genet*. 8 (1999) 2533-2540.
- [48] V.Tiranti, M.Jaksch, S.Hofmann, C.Galimberti, K.Hoernagel, L.Lulli, P.Freisinger, L.Bindoff, K.D.Gerbitz, G.P.Comi, G.Uziel, M.Zeviani, T.Meitinger. Loss-of-function mutations of SURF-1 are specifically associated with Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency, *Ann Neurol*. 46 (1999) 161-166.
- [49] S.C.Leary, B.A.Kaufman, G.Pellecchia, G.H.Guercin, A.Mattman, M.Jaksch, E.A.Shoubbridge. Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase, *Hum Mol Genet*. 13 (2004) 1839-1848.
- [50] S.C.Leary, F.Sasarman, T.Nishimura, E.A.Shoubbridge. Human SCO2 is required for the synthesis of CO II and as a thiol-disulphide oxidoreductase for SCO1, *Hum Mol Genet*. 18 (2009) 2230-2240.
- [51] M.F.Bauer, U.Rothbauer, N.Muhlenbein, R.J.Smith, K.Gerbitz, W.Neupert, M.Brunner, S.Hofmann. The mitochondrial TIM22 preprotein translocase is highly conserved throughout the eukaryotic kingdom, *FEBS Lett*. 464 (1999) 41-47.
- [52] M.F.Bauer, W.Neupert. Import of proteins into mitochondria: a novel pathomechanism for progressive neurodegeneration, *J Inherit Metab Dis*. 24 (2001) 166-180.
- [53] R.Allikmets, W.H.Raskind, A.Hutchinson, N.D.Schueck, M.Dean, D.M.Koeller. Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A), *Hum Mol Genet*. 8 (1999) 743-749.
- [54] M.A.Burke, H.Ardehali. Mitochondrial ATP-binding cassette proteins, *Transl Res*. 150 (2007) 73-80.

- [55] V.Campuzano, L.Montermini, M.D.Molto, L.Pianese, M.Cossee, F.Cavalcanti, E.Monros, F.Rodius, F.Duclos, A.Monticelli, F.Zara, J.Canizares, H.Koutnikova, S.I.Bidichandani, C.Gellera, A.Brice, P.Trouillas, M.G.De, A.Filla, F.R.De, F.Palau, P.I.Patel, D.S.Di, J.L.Mandel, S.Cocoza, M.Koenig, M.Pandolfo. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion, *Science*. 271 (1996) 1423-1427.
- [56] M.Pandolfo, A.Pastore. The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin, *J Neurol*. 256 Suppl 1 (2009) 9-17.
- [57] A.H.Schapira. Mitochondrial disease, *Lancet*. 368 (2006) 70-82.
- [58] C.M.Verity, A.M.Winstone, L.Stellitano, D.Krishnakumar, R.Will, R.McFarland. The clinical presentation of mitochondrial diseases in children with progressive intellectual and neurological deterioration: a national, prospective, population-based study, *Dev Med Child Neurol*. (2009).
- [59] J.Marin-Garcia, M.J.Goldenthal, L.Flores-Sarnat, H.B.Sarnat. Severe mitochondrial cytopathy with complete A-V block, PEO, and mtDNA deletions, *Pediatr Neurol*. 27 (2002) 213-216.
- [60] S.Rollins, R.A.Prayson, J.T.McMahon, B.H.Cohen. Diagnostic yield muscle biopsy in patients with clinical evidence of mitochondrial cytopathy, *Am J Clin Pathol*. 116 (2001) 326-330.
- [61] H.B.Sarnat, J.Marin-Garcia. Pathology of mitochondrial encephalomyopathies, *Can J Neurol Sci*. 32 (2005) 152-166.
- [62] A.Antonellis, E.D.Green. The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases, *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 9 (2008) 87-107.
- [63] E.Trushina, C.T.McMurray. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases, *Neuroscience*. 145 (2007) 1233-1248.
- [64] J.Finsterer. Genetic, pathogenetic, and phenotypic implications of the mitochondrial A3243G tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) mutation, *Acta Neurol Scand*. 116 (2007) 1-14.
- [65] M.B.Graeber, U.Muller. Recent developments in the molecular genetics of mitochondrial disorders, *J Neurol Sci*. 153 (1998) 251-263.
- [66] L.Devi, V.Raghavendran, B.M.Prabhu, N.G.Avadhani, H.K.Anandatheerthavarada. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain, *J Biol Chem*. 283 (2008) 9089-9100.
- [67] P.Shi, J.Gal, D.M.Kwinter, X.Liu, H.Zhu. Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis, *Biochim Biophys Acta*. (2009).

- [68] J.Kong, Z.Xu. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1, *J Neurosci.* 18 (1998) 3241-3250.
- [69] Z.Xu, C.Jung, C.Higgins, J.Levine, J.Kong. Mitochondrial degeneration in amyotrophic lateral sclerosis, *J Bioenerg Biomembr.* 36 (2004) 395-399.
- [70] T.Murakami, M.Nagai, K.Miyazaki, N.Morimoto, Y.Ohta, T.Kurata, Y.Takehisa, T.Kamiya, K.Abe. Early decrease of mitochondrial DNA repair enzymes in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice carrying a mutant SOD1 gene, *Brain Res.* 1150 (2007) 182-189.
- [71] E.Y.Xu, F.L.Moore, R.A.Pera. A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (2001) 7414-7419.
- [72] A.Abeliovich, C.A.Doege. Reprogramming therapeutics: iPS cell prospects for neurodegenerative disease, *Neuron.* 61 (2009) 337-339.
- [73] G.Amabile, A.Meissner. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine, *Trends Mol Med.* 15 (2009) 59-68.
- [74] J.T.Dimos, K.T.Rodolfa, K.K.Niakan, L.M.Weisenthal, H.Mitsumoto, W.Chung, G.F.Croft, G.Saphier, R.Leibel, R.Goland, H.Wichterle, C.E.Henderson, K.Eggan. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons, *Science.* 321 (2008) 1218-1221.
- [75] S.Kosel, G.Hofhaus, A.Maassen, P.Vierregge, M.B.Graeber. Role of mitochondria in Parkinson disease, *Biol Chem.* 380 (1999) 865-870.

# Table PENNCNV : Analyses complètes des données de la HAP300 pour tous les chromosomes ARSAL

Family	Sample	Chr	Start	End	NbSNP	Intensity	Type(copy)	size	overlap	GqCNV	PennCnv
A	Father	1	5013771	5070572	16	0	DEL	56802	0.175733249	(5060591-5070572)	(5013771-5070572)
A	Father	1	211503823	211558022	5	-0.378686	DEL	54200		(211503823-211558022)	
A	Father	1	27721887	27763120	5	0	DEL	41234			(27721887-27763120)
A	Father	2	212873082	212898738	6	-0.486707	DEL	25657		(212873082-212898738)	
A	Father	2	145723325	145732417	4	0	DEL	9093			(145723325-145732417)
A	Father	4	70052120	70155288	5	0	DEL	103169			(70052120-70155288)
A	Father	5	121282047	121293824	4	0	DEL	11778			(121282047-121293824)
A	Father	6	48879752	48900571	3	0	AMP	20820			(48879752-48900571)
A	Father	6	32735692	32766602	7	-0.988313	DEL	30911		(32735692-32766602)	
A	Father	8	55970045	5591685	3	0	DEL	1641			(55970045-5591685)
A	Father	8	65777295	65883751	11	0	DEL	106457			(65777295-65883751)
A	Father	8	84654614	84662096	4	0	DEL	7483			(84654614-84662096)
A	Father	14	21816895	21869910	15	0	DEL	53016			(21816895-21869910)
A	Father	16	34373576	34464860	4	0	AMP	91285			(34373576-34464860)
A	Father	18	54535172	54582058	4	0	DEL	46887			(54535172-54582058)
A	13	1	2086498	3686396	202	0	AMP	1599899			(2086498-3686396)
A	13	1	245075062	245172749	18	0	DEL	97688	0.530361969	(245113401-245165210)	(245075062-245172749)
A	13	1	80070538	80475894	35	0	DEL	405357			(80070538-80475894)
A	13	1	100147935	100348521	18	0	DEL	200587			(100147935-100348521)
A	13	1	187860674	188026432	50	0	DEL	364014			(187860674-188026432)
A	13	1	192552316	192857024	32	0	DEL	304709			(192552316-192857024)
A	13	1	193082712	193412546	31	0	DEL	329835			(193082712-193412546)
A	13	1	193629627	194115651	42	0	DEL	486025			(193629627-194115651)
A	13	1	215981481	216093200	22	0	DEL	111720			(215981481-216093200)
A	13	2	34918750	34957893	5	-0.783358	DEL	39144		(34918750-34957893)	
A	13	2	13933985	14175819	25	0	DEL	241835			(13933985-14175819)
A	13	2	40662553	40918328	21	0	DEL	255776			(40662553-40918328)
A	13	2	49440827	50394244	138	0	DEL	953418			(49440827-50394244)
A	13	2	50977187	51051888	14	0	DEL	74702			(50977187-51051888)
A	13	2	55274329	55444265	18	0	DEL	169937			(55274329-55444265)
A	13	2	55534000	55651444	20	0	DEL	161145			(55534000-55651444)
A	13	2	57367904	57689073	43	0	DEL	321170			(57367904-57689073)
A	13	2	57759199	58284672	48	0	DEL	525474			(57759199-58284672)
A	13	2	60972975	61415162	50	0	DEL	442188			(60972975-61415162)
A	13	2	76794557	77180340	54	0	DEL	385784			(76794557-77180340)
A	13	2	140340463	140495158	25	0	DEL	154696			(140340463-140495158)
A	13	2	141593671	141842203	34	0	DEL	248533			(141593671-141842203)
A	13	2	155311726	155345484	11	0	DEL	33759			(155311726-155345484)
A	13	2	182126538	182201296	15	0	DEL	74759			(182126538-182201296)
A	13	2	185476099	185778285	28	0	DEL	302187			(185476099-185778285)
A	13	2	186590394	188026432	91	0	DEL	1436039			(186590394-188026432)
A	13	2	194953354	195374603	31	0	DEL	421250			(194953354-195374603)
A	13	2	202291687	202373472	18	0	DEL	81786			(202291687-202373472)
A	13	2	203314999	203754771	26	0	DEL	439773			(203314999-203754771)
A	13	2	211603512	211934422	47	0	DEL	330911			(211603512-211934422)
A	13	2	212142282	212288142	24	0	DEL	145861			(212142282-212288142)
A	13	2	214605630	214785625	29	0	DEL	179996			(214605630-214785625)
A	13	3	123901440	124170860	72	0	AMP	269421	0.917890588	(123901440-124148738)	(123901440-124170860)
A	13	3	12898197	13110575	41	0	AMP	212379			(12898197-13110575)
A	13	3	57368283	57474809	23	0	DEL	106527	0.200540708	(57432480-57453842)	(57368283-57474809)
A	13	3	23118465	23617470	51	0	DEL	499006			(23118465-23617470)
A	13	3	34625610	34719756	10	0	DEL	91147			(34625610-34719756)
A	13	3	78907602	79068495	20	0	DEL	160894			(78907602-79068495)
A	13	3	79304261	79839174	41	0	DEL	534914			(79304261-79839174)
A	13	3	83700179	84312075	63	0	DEL	611897			(83700179-84312075)
A	13	3	85106341	85399338	28	0	DEL	292998			(85106341-85399338)
A	13	3	86346973	86851806	37	0	DEL	504834			(86346973-86851806)
A	13	3	88538189	88819045	26	0	DEL	280857			(88538189-88819045)
A	13	3	96812101	97489207	43	0	DEL	677107			(96812101-97489207)
A	13	3	106876990	107174255	27	0	DEL	297266			(106876990-107174255)
A	13	3	108041072	108216821	23	0	DEL	175750			(108041072-108216821)
A	13	3	122453594	122529158	7	0	DEL	256069			(122453594-122529158)
A	13	3	153110678	153339665	30	0	DEL	228688			(153110678-153339665)
A	13	3	163455191	163941192	56	0	DEL	486002			(163455191-163941192)
A	13	3	166136118	166574172	27	0	DEL	438055			(166136118-166574172)
A	13	3	167255321	167408221	16	0	DEL	152901			(167255321-167408221)
A	13	3	168996427	169101581	19	0	DEL	105155			(168996427-169101581)
A	13	3	175989466	176321550	44	0	DEL	332085			(175989466-176321550)
A	13	3	183521024	183642121	13	0	DEL	121098			(183521024-183642121)
A	13	3	191927205	192112079	26	0	DEL	184875			(191927205-192112079)
A	13	3	198278255	198478090	16	0	DEL	199836			(198278255-198478090)
A	13	4	1149680	1649224	48	0	AMP	499545			(1149680-1649224)
A	13	4	3673523	3762007	14	0	AMP	88485			(3673523-3762007)
A	13	4	27870188	28138936	32	0	DEL	268749			(27870188-28138936)
A	13	4	29127028	29373035	25	0	DEL	246008			(29127028-29373035)
A	13	4	30996622	31417795	42	0	DEL	421174			(30996622-31417795)
A	13	4	31838364	32740999	83	0	DEL	902636			(31838364-32740999)
A	13	4	33803333	34482072	51	0	DEL	678740			(33803333-34482072)
A	13	4	42905172	43521958	52	0	DEL	616787			(42905172-43521958)
A	13	4	44544102	44663360	22	0	DEL	119259			(44544102-44663360)
A	13	4	44734354	44978623	26	0	DEL	244270			(44734354-44978623)
A	13	4	69847111	70089270	17	0	DEL	242160			(69847111-70089270)
A	13	4	70535659	70736595	24	0	DEL	200027			(70535659-70736595)
A	13	4	71943570	72200308	17	0	DEL	256739			(71943570-72200308)
A	13	4	90897564	90984303	13	0	DEL	86740			(90897564-90984303)
A	13	4	92489733	92721390	24	0	DEL	231658			(92489733-92721390)
A	13	4	100111219	100503222	45	0	DEL	392004			(100111219-100503222)
A	13	4	112949230	113414124	28	0	DEL	464895			(112949230-113414124)
A	13	4	115229130	115701203	44	0	DEL	472074			(115229130-115701203)
A	13	4	117837574	118117106	25	0	DEL	279533			(117837574-118117106)
A	13	4	124215529	124408501	18	0	DEL	192973			(124215529-124408501)
A	13	4	133846437	134006023	18	0	DEL	159587			(133846437-134006023)
A	13	4	136929280	137290785	28	0	DEL	361506			(136929280-137290785)
A	13	4	141460148	141701031	32	0	DEL	240884			(141460148-141701031)
A	13	4	156282205	156337775	11	0	DEL	55571			(156282205-156337775)
A	13	4	164996206	165396088	52	0	DEL	399883			(164996206-165396088)
A	13	4	171908613	172125231	19	0					

Family	Sample	Chr	Start	End	NbSNP	Intensity	Type(copy)	size	overlap	GqCNV	PennCnv
A	13	6	56571971	57150668	36	0	DEL	578698			(56571971-57150668)
A	13	6	62021131	63805008	96	0	DEL	177698			(62021131-63805008)
A	13	6	65873533	66129263	28	0	DEL	255731			(65873533-66129263)
A	13	6	67959331	68159040	32	0	DEL	199710			(67959331-68159040)
A	13	6	72745743	73086596	38	0	DEL	340854			(72745743-73086596)
A	13	6	81446800	81913384	40	0	DEL	466585			(81446800-81913384)
A	13	6	93095019	93184674	17	0	DEL	89656			(93095019-93184674)
A	13	6	101101769	101594194	37	0	DEL	492426			(101101769-101594194)
A	13	6	102776205	102972083	18	0	DEL	195879			(102776205-102972083)
A	13	6	116299831	116493827	20	0	DEL	193997			(116299831-116493827)
A	13	6	120543209	120695160	15	0	DEL	151952			(120543209-120695160)
A	13	6	12466814	124817149	33	0	DEL	148936			(12466814-124817149)
A	13	6	132574241	132759924	19	0	DEL	185684			(132574241-132759924)
A	13	6	142487349	142639061	19	0	DEL	151713			(142487349-142639061)
A	13	6	155927951	156091721	24	0	DEL	163771			(155927951-156091721)
A	13	7	81609392	82223668	97	0	DEL	614277	0.057399186 (81685587-81720845)		(81609392-82223668)
A	13	7	82576472	82761303	41	0	DEL	184832	0.080824749 (82661860-82676798)		(82576472-82761303)
A	13	7	9647047	9659607	5	-0.854156	DEL	12561	(9647047-9659607)		
A	13	7	9742272	9855812	17	0	DEL	113541			(9742272-9855812)
A	13	7	13362893	13412371	8	0	DEL	49479			(13362893-13412371)
A	13	7	14403342	14704609	38	0	DEL	301354			(14403342-14704609)
A	13	7	15895606	16117142	26	0	DEL	221537			(15895606-16117142)
A	13	7	38119915	38330273	32	0	DEL	210359			(38119915-38330273)
A	13	7	79629883	79920902	40	0	DEL	291020			(79629883-79920902)
A	13	7	84704244	85062600	39	0	DEL	358357			(84704244-85062600)
A	13	7	88029554	88494958	48	0	DEL	465405			(88029554-88494958)
A	13	7	91369910	91597533	15	0	DEL	227624			(91369910-91597533)
A	13	7	94457612	94743726	21	0	DEL	286115			(94457612-94743726)
A	13	7	103014143	103153828	27	0	DEL	139686			(103014143-103153828)
A	13	7	112838024	113089498	17	0	DEL	251475			(112838024-113089498)
A	13	7	115149783	115698047	52	0	DEL	548265			(115149783-115698047)
A	13	7	119180851	119428305	12	0	DEL	247455			(119180851-119428305)
A	13	7	125809889	126435525	83	0	DEL	625637			(125809889-126435525)
A	13	7	146621451	146826798	35	0	DEL	205348			(146621451-146826798)
A	13	8	47180142	47365080	25	0	AMP	184939			(47180142-47365080)
A	13	8	142574760	143718931	182	0	AMP	1144172			(142574760-143718931)
A	13	8	144356084	144765210	61	0	AMP	409127			(144356084-144765210)
A	13	8	145028388	145813738	53	0	AMP	788991			(145028388-145813738)
A	13	8	93252948	93427879	30	0	DEL	174932	0.142152379 (93282186-93307052)		(93252948-93427879)
A	13	8	14116108	14209227	23	0	DEL	93120			(14116108-14209227)
A	13	8	17066999	17202683	23	0	DEL	135685			(17066999-17202683)
A	13	8	51492279	52331177	57	0	DEL	838899			(51492279-52331177)
A	13	8	64145757	64270401	14	0	DEL	124645			(64145757-64270401)
A	13	8	64687010	65360306	47	0	DEL	673297			(64687010-65360306)
A	13	8	65769470	65902972	13	0	DEL	133503			(65769470-65902972)
A	13	8	111704941	113724772	147	0	DEL	2019832			(111704941-113724772)
A	13	8	114862208	115055004	47	0	DEL	192797			(114862208-115055004)
A	13	8	115096852	115656017	62	0	DEL	559166			(115096852-115656017)
A	13	8	121942526	122077124	22	0	DEL	134599			(121942526-122077124)
A	13	9	135444521	135921778	113	0	AMP	477258			(135444521-135921778)
A	13	9	136233032	136908800	143	0	AMP	675769			(136233032-136908800)
A	13	9	137127054	137432359	90	0	AMP	305306			(137127054-137432359)
A	13	9	137698704	139188163	136	0	AMP	1489460			(137698704-139188163)
A	13	9	7798973	8021935	44	0	DEL	222963			(7798973-8021935)
A	13	9	8287668	8916956	156	0	DEL	629289			(8287668-8916956)
A	13	9	9691354	9767072	19	0	DEL	75719			(9691354-9767072)
A	13	9	10913290	11119139	29	0	DEL	205850			(10913290-11119139)
A	13	9	12290716	12394591	24	0	DEL	103876			(12290716-12394591)
A	13	9	29505381	29589001	24	0	DEL	83621			(29505381-29589001)
A	13	9	82419303	83088766	85	0	DEL	669464			(82419303-83088766)
A	13	9	87465301	87730330	21	0	DEL	254930			(87465301-87730330)
A	13	9	87956533	88152828	25	0	DEL	196296			(87956533-88152828)
A	13	9	112382006	112473999	18	0	DEL	91994			(112382006-112473999)
A	13	10	133820578	135034116	143	0	AMP	1213539			(133820578-135034116)
A	13	10	25595320	25774065	25	0	DEL	178746			(25595320-25774065)
A	13	10	55909436	56024124	24	0	DEL	114689			(55909436-56024124)
A	13	10	57281689	57636336	22	0	DEL	356468			(57281689-57636336)
A	13	10	58099928	58623966	39	0	DEL	524039			(58099928-58623966)
A	13	10	64578695	65084096	34	0	DEL	505402			(64578695-65084096)
A	13	10	66242221	66897691	87	0	DEL	656371			(66242221-66897691)
A	13	11	343757	1447672	120	0	AMP	1103916			(343757-1447672)
A	13	11	1759014	2438668	88	0	AMP	679655			(1759014-2438668)
A	13	11	2680180	3222527	92	0	AMP	542348			(2680180-3222527)
A	13	11	86454640	86504070	18	0	DEL	49431	0.908235723 (86454640-86499534)		(86454640-86504070)
A	13	11	102442889	102892960	49	0	DEL	450072	0.171779182 (102729328-102806640)		(102442889-102892960)
A	13	11	85361202	85379778	5	-0.967209	DEL	18577	(85361202-85379778)		
A	13	11	23414369	23816567	52	0	DEL	402199			(23414369-23816567)
A	13	11	36940346	37144489	33	0	DEL	204144			(36940346-37144489)
A	13	11	38221290	38534362	33	0	DEL	313073			(38221290-38534362)
A	13	11	49173278	49510435	15	0	DEL	237161			(49173278-49510435)
A	13	11	72838030	72966953	10	0	DEL	128924			(72838030-72966953)
A	13	11	86541925	86702707	20	0	DEL	160783			(86541925-86702707)
A	13	11	88407924	88730464	21	0	DEL	322541			(88407924-88730464)
A	13	11	89843914	90018986	18	0	DEL	175073			(89843914-90018986)
A	13	11	96854460	97046847	21	0	DEL	192388			(96854460-97046847)
A	13	11	103441679	103653559	22	0	DEL	211881			(103441679-103653559)
A	13	12	21206682	21304899	18	0	DEL	98218			(21206682-21304899)
A	13	12	24052317	24154246	28	0	DEL	101930			(24052317-24154246)
A	13	12	25155526	25287302	18	0	DEL	131777			(25155526-25287302)
A	13	12	59405533	59751235	21	0	DEL	345703			(59405533-59751235)
A	13	12	77776404	77861095	18	0	DEL	84492			(77776404-77861095)
A	13	12	78586361	78840229	9	0	DEL	253869			(78586361-78840229)
A	13	12	79408654	80073653	82	0	DEL	665000			(79408654-80073653)
A	13	12	80605601	81012425	52	0	DEL	406825			(80605601-81012425)
A	13	13	81989192	82061918	16	0	DEL	72727	0.321874957 (81989192-82012600)		(81989192-82061918)
A	13	13	22060827	22131265	14	0	DEL	70439			(22060827-22131265)
A	13	13	39096104	39227032	14	0	DEL	130929			(39096104-39227032)
A	13	13	84426033	84510389	18	0	DEL	84357			(84426033-84510389)
A	13	13	85214485	85479868	30	0	DEL	265655			(85214485-85479868)
A	13	13	89021003	89227194	23	0	DEL	206192			(89021003-89227194)
A	13	14	100063798	100240293	29	0	AMP	176496			(100063798-100240293)
A	13	14	103623797	103851339	34	0	AMP	227543			(103623797-103851339)
A	13	14	27422655	27535402	14	0	DEL	112748			(27422655-27535402)
A	13	14	38444547	38906791	37	0	DEL	462245			(38444547-38906791)
A	13	14	42272857	42387419	13	0	DEL	114563			(42272857-42387419)
A	13	14	42560682	43280403	58	0	DEL	719722			(42560682-43280403)
A	13	14	47959934	48087167	14	0	DEL	127234			(47959934-48087167)
A	13	14	65997231	66696347	24	0	DEL	699117			(65997231-66696347)
A	13	15	75617145	75877685	37	0	AMP	240544			(75617145-75877685)
A											

Family	Sample	Chr	Start	End	NbSNP	Intensity	Type(copy)	size	overlap	GqCNV	PennCnv
A	13	18	64737923	64929306	49	0	DEL	191384			(64737923-64929306)
A	13	19	352714	2287008	243	0	AMP	1934295			(352714-2287008)
A	13	19	10255792	10403610	28	0	AMP	147619			(10255792-10403610)
A	13	19	35080325	35200825	5	-0.804857	DEL	120501		(35080325-35200825)	
A	13	20	59561847	62331424	378	0	AMP	2769578	0.008904967	(60448076-60472738)	(59561847-62331424)
A	13	21	44378972	44565251	42	0	AMP	186280			(44378972-44565251)
A	13	21	45561122	45885695	56	0	AMP	324574			(45561122-45885695)
A	13	21	14513560	14647513	50	0	DEL	133954			(14513560-14647513)
A	13	21	20485621	20675442	33	0	DEL	189822			(20485621-20675442)
A	13	21	21156834	21271294	27	0	DEL	114461			(21156834-21271294)
A	13	21	27639686	27723204	23	0	DEL	83519			(27639686-27723204)
A	13	22	18078129	18686993	134	0	AMP	608865			(18078129-18686993)
A	13	22	35941753	36240341	62	0	AMP	298589			(35941753-36240341)
A	13	22	42853645	43186137	86	0	AMP	332493			(42853645-43186137)
A	13	22	45339942	45535367	44	0	AMP	195426			(45339942-45535367)
A	13	22	47278985	47488673	49	0	AMP	209689			(47278985-47488673)
A	13	22	28824371	28911722	5	-0.89065	DEL	87352		(28824371-28911722)	
A	12	1	2973823	3134605	31	0	AMP	160783			(2973823-3134605)
A	12	1	52052238	52070739	5	0	DEL	18502			(52052238-52070739)
A	12	1	187893806	187990113	25	0	DEL	96308			(187893806-187990113)
A	12	1	192591449	192857024	29	0	DEL	265576			(192591449-192857024)
A	12	2	57367904	57597823	33	0	DEL	229920			(57367904-57597823)
A	12	2	155311726	155345484	11	0	DEL	33759			(155311726-155345484)
A	12	2	194999918	195338218	25	0	DEL	338301			(194999918-195338218)
A	12	3	123901440	124170860	78	0	AMP	269421	1	(123901440-124170860)	(123901440-124170860)
A	12	3	57368283	57474809	23	0	DEL	106527	0.232588921	(57426028-57450804)	(57368283-57474809)
A	12	3	152976373	152999983	16	0	DEL	23611	0.404218373	(152990440-152999983)	(152976373-152999983)
A	12	3	198278255	198504332	25	0	DEL	226078	0.305907696	(198435174-198504332)	(198278255-198504332)
A	12	3	88538189	88606865	11	0	DEL	68677			(88538189-88606865)
A	12	3	96854084	97228391	18	0	DEL	374308			(96854084-97228391)
A	12	3	166136118	166276452	10	0	DEL	140335			(166136118-166276452)
A	12	4	28554306	28576696	5	-0.603629	DEL	22391		(28554306-28576696)	
A	12	4	69847111	70089270	17	0	DEL	242160			(69847111-70089270)
A	12	4	112991417	113093879	11	0	DEL	102463			(112991417-113093879)
A	12	4	137056578	137160190	8	0	DEL	103613			(137056578-137160190)
A	12	4	149655212	149798530	16	0	DEL	143319			(149655212-149798530)
A	12	5	129787009	129953221	17	0	DEL	166213	0.476196206	(129874072-129953221)	(129787009-129953221)
A	12	5	60165118	60389740	10	0	DEL	224623			(60165118-60389740)
A	12	5	84269988	84447374	19	0	DEL	177387			(84269988-84447374)
A	12	5	85647891	85743225	11	0	DEL	95335			(85647891-85743225)
A	12	5	121282047	121379525	6	0	DEL	97479			(121282047-121379525)
A	12	6	56670411	57028763	24	0	DEL	358533			(56670411-57028763)
A	12	6	63723105	63805008	4	0	DEL	81904			(63723105-63805008)
A	12	6	101101769	101446321	25	0	DEL	344553			(101101769-101446321)
A	12	6	132574241	132739275	17	0	DEL	165035			(132574241-132739275)
A	12	8	64145757	64270401	20	0	DEL	124645	0.420787035	(64145757-64198205)	(64145757-64270401)
A	12	8	72558655	72619125	6	-0.388804	DEL	60471		(72558655-72619125)	
A	12	8	82761463	82795249	6	-0.298513	DEL	33787		(82761463-82795249)	
A	12	8	65769470	65902972	13	0	DEL	133503			(65769470-65902972)
A	12	8	115330310	115579946	20	0	DEL	249637			(115330310-115579946)
A	12	9	107412875	107444584	5	-0.588821	DEL	31710		(107412875-107444584)	
A	12	9	8460974	8503123	14	0	DEL	42150			(8460974-8503123)
A	12	9	87465301	87561739	11	0	DEL	96439			(87465301-87561739)
A	12	10	102654639	102697516	5	-0.594991	DEL	42878		(102654639-102697516)	
A	12	10	64615370	65069857	29	0	DEL	454488			(64615370-65069857)
A	12	10	66475022	66736404	36	0	DEL	261383			(66475022-66736404)
A	12	11	85359037	85379778	12	0	DEL	20742	1	(85359037-85379778)	
A	12	11	49173275	49510435	15	0	DEL	337161			(49173275-49510435)
A	12	11	72838030	72966953	10	0	DEL	128924			(72838030-72966953)
A	12	11	86454640	86504070	10	0	DEL	49431			(86454640-86504070)
A	12	12	25163294	25267596	15	0	DEL	104303			(25163294-25267596)
A	12	13	89096176	89195487	9	0	DEL	99312			(89096176-89195487)
A	12	15	48576417	48844473	21	0	DEL	268057			(48576417-48844473)
A	12	15	59989774	60126089	12	0	DEL	136316			(59989774-60126089)
A	12	15	70569351	70680504	9	0	DEL	111154			(70569351-70680504)
A	12	16	82540572	82596250	15	0	AMP	55679			(82540572-82596250)
E	10	5	97053242	97121798	15	0	DEL	68557	0.693977274	(97053242-97121798)	(97074222-97121798)
E	10	6	71732495	71789087	10	0	DEL	56593			(71732495-71789087)
E	10	7	11141758	111630866	51	0	DEL	274709	0.576589734	(11141758-111494978)	(11141758-111630866)
E	10	9	13233671	132367731	11	0	DEL	30991			(13233671-132367731)
E	10	10	103254177	103442635	11	0	DEL	188459			(103254177-103442635)
E	10	10	116833464	116910080	5	0	DEL	76617			(116833464-116910080)
E	10	11	63543965	63616327	12	0	DEL	72363			(63543965-63616327)
E	10	11	124247941	124274829	4	0	DEL	26889			(124247941-124274829)
E	10	12	31898373	31954269	22	0	AMP	55897	0.904109344	(31898373-31954269)	(31903733-31954269)
E	10	16	48889674	49006133	16	0	DEL	116460			(48889674-49006133)
E	10	17	43529490	44003898	9	0	DEL	74409			(43529490-44003898)
E	10	19	23259586	23412472	9	0	DEL	15387			(23259586-23412472)
E	10	19	40848428	41016164	20	0	DEL	167737			(40848428-41016164)
E	11	1	41127268	41159458	7	0.073864	AMP	32191		(41127268-41159458)	
E	11	1	151878757	151925104	5	0	DEL	46348			(151878757-151925104)
E	11	5	34271963	34376453	3	0	DEL	104491			(34271963-34376453)
E	11	6	109369880	109391882	5	-0.58365	DEL	22003		(109369880-109391882)	
E	11	6	71732495	71806841	14	0	DEL	74347			(71732495-71806841)
E	11	9	132261749	132367731	34	0	DEL	159983			(132261749-132367731)
E	11	12	31898373	31954269	12	0	AMP	55897			(31898373-31954269)
E	11	13	105579259	105606814	5	-1.13173	DEL	27556		(105579259-105606814)	
E	11	14	35524671	35676301	16	0	DEL	151631	0.130217436	(35524671-35558504)	(35538760-35676301)
E	11	14	76984427	77020877	6	0	DEL	36451			(76984427-77020877)
E	11	19	23259586	23361698	7	0	DEL	102113			(23259586-23361698)
D	9	1	198454268	198501004	5	-0.947001	DEL	46737		(198454268-198501004)	
D	9	1	36067219	36152720	5	0	DEL	85502			(36067219-36152720)
D	9	2	103565457	103668922	6	0	DEL	103466			(103565457-103668922)
D	9	2	19826924	198421476	24	0	DEL	154553			(19826924-198421476)
D	9	4	24490950	24571823	17	0	DEL	80874			(24490950-24571823)
D	9	6	43040178	43165559	17	0	DEL	125382	0.467068638	(43063079-43121640)	(43040178-43165559)
D	9	7	139655801	139754565	15	0	DEL	98765			(139655801-139754565)
D	9	8	15996570	16065839	9	0	DEL	69270			(15996570-16065839)
D	9	9	139986010	140128836	7	0	DEL	142827			(139986010-140128836)
D	9	10	73680791	74204180	28	0	DEL	523390			(73680791-74204180)
D	9	14	35538760	35676301	11	0	DEL	137542			(35538760-35676301)
D	9	15	74366145	74415495	10	0	DEL	49351	0.152215761	(74366145-74415495)	(74389267-74396778)
D	9	16	65777958	66063748	17	0	DEL	285791			(65777958-66063748)
D	9	18	54300079	54316662	9	0	DEL	16584			(54300079-54316662)
D	9	19	52955447	52981115	5	0	DEL	25669			(52955447-52981115)
D	9	19	60557339	60594069	8	0	DEL	36731			(60557339-60594069)
C	6	1	27721887	27804285	6	0	DEL	82399			(27721887-27804285)
C	6										



Family	Sample	Chr	Start	End	NbSNP	Intensity	Type(copy)	size	overlap	GqCNV	PennCNV
C	6	11	80463279	80613559	25	0.0780594	AMP	150281		(80463279-80613559)	
C	6	11	50523295	51228612	9		0 AMP	705318			(50523295-51228612)
C	6	11	63634650	63698310	9		0 DEL	63661			(63634650-63698310)
C	6	11	134429056	1344435899	3		0 DEL	4444			(134429056-134435899)
C	6	12	31157554	31298174	36		0 AMP	140621	1	(31157554-31298174)	(31157554-31298174)
C	6	12	36528296	36733128	7		0 AMP	204833			(36528296-36733128)
C	6	13	81634402	81857479	11		0 AMP	223078			(81634402-81857479)
C	6	14	83930302	83969190	4		0 AMP	38889			(83930302-83969190)
C	6	14	21637401	21660836	5	-0.451433	DEL	23436		(21637401-21660836)	
C	6	17	29671944	29708502	4		0 DEL	36559			(29671944-29708502)
C	6	19	6909134	6951401	14		0 DEL	42268	0.730860225	(6909134-6940025)	(6909134-6951401)
C	6	20	39472829	39494422	5		0 DEL	21594			(39472829-39494422)
C	6	22	49415426	49425117	3		0 AMP	9692			(49415426-49425117)
B	Mother	1	17158797	17185179	5	-0.474812	DEL	26383		(17158797-17185179)	
B	Mother	1	34020533	34030058	5	-0.434877	DEL	9526		(34020533-34030058)	
B	Mother	1	226139432	226154894	3		0 DEL	15463			(226139432-226154894)
B	Mother	2	110243431	110292012	14		0 AMP	48582	1	(110243431-110292012)	(110243431-110292012)
B	Mother	2	10223192	10244107	5	-0.333024	DEL	20916		(10223192-10244107)	
B	Mother	3	48846668	49029696	7		0 DEL	183029			(48846668-49029696)
B	Mother	5	175279303	17528566	8		0 DEL	249264	0.144914629	(175279303-17528566)	(175492445-17528566)
B	Mother	5	62113826	62159987	6	-0.406287	DEL	46162		(62113826-62159987)	
B	Mother	6	43034002	43095976	14		0 DEL	61975	0.581008471	(43042478-43097845)	(43034002-43095976)
B	Mother	7	100849779	100868518	12		0 AMP	18740	1	(100849779-100868518)	(100849779-100868518)
B	Mother	7	69831960	69861129	16		0 DEL	29170	1	(69831960-69861129)	(69831960-69861129)
B	Mother	7	44328148	44355144	7		0 DEL	26997			(44328148-44355144)
B	Mother	10	52941060	52965324	6	-0.711987	DEL	24265		(52941060-52965324)	
B	Mother	10	64219617	64275740	9		0 DEL	56124			(64219617-64275740)
B	Mother	11	2255611	2359323	15		0 DEL	103713			(2255611-2359323)
B	Mother	17	43969101	43994702	7		0 DEL	25602			(43969101-43994702)
B	Mother	18	64897188	64909977	5	-0.650614	DEL	12790		(64897188-64909977)	
B	Mother	19	48114839	48350666	8	0.1006272	AMP	23528		(48114839-48350666)	
B	Mother	19	6706007	6736141	11		0 DEL	30135	0.632586693	(6706007-6736141)	(6706007-6725069)
B	B3	1	17155012	17190652	8		0 DEL	35641			(17155012-17190652)
B	B3	1	27721887	27862207	10		0 DEL	140321			(27721887-27862207)
B	B3	1	154306934	154472745	22		0 DEL	165812			(154306934-154472745)
B	B3	2	110243431	110292012	14		0 AMP	48582	1	(110243431-110292012)	(110243431-110292012)
B	B3	2	198266924	198421476	24		0 DEL	154553			(198266924-198421476)
B	B3	3	49627152	50016317	24		0 DEL	389166	0.302917007	(49627152-49745036)	(49627152-50016317)
B	B3	6	43034002	43095976	9		0 DEL	61975			(43034002-43095976)
B	B3	7	29604959	29618788	6	-0.588004	DEL	13830		(29604959-29618788)	
B	B3	9	27750185	27830948	10		0 AMP	80764	1	(27750185-27830948)	(27750185-27830948)
B	B3	11	76451158	76475009	5	-0.739404	DEL	23852		(76451158-76475009)	
B	B3	15	49315372	49405038	21		0 DEL	89667	0.341619548	(49351633-49382264)	(49315372-49405038)
B	B3	16	28447349	28790742	16		0 DEL	343394	0.86523061	(28493628-28790742)	(28447349-28790742)
B	B3	16	65947949	66063748	11		0 DEL	115800	0.873264249	(65947949-66049072)	(65947949-66063748)
B	B3	17	6506471	6623939	30		0 DEL	117469	0.146302429	(6514688-6531873)	(6506471-6623939)
B	B3	17	7186095	7431901	41		0 DEL	245607			(7186095-7431901)
B	B3	17	8506081	8682102	27		0 DEL	176022			(8506081-8682102)
B	B3	17	43969101	44003898	8		0 DEL	34798			(43969101-44003898)
B	B3	18	18136401	18184689	10		0 DEL	48289	0.119054029	(18136401-18184689)	(18136401-18184689)
B	B3	18	8823819	8968472	34		0 DEL	144654			(8823819-8968472)
B	B3	19	19073298	19117870	6		0 DEL	44573			(19073298-19117870)
B	B3	19	56393703	56432651	5		0 DEL	38949			(56393703-56432651)
B	B3	20	36857610	37209214	32		0 DEL	351605			(36857610-37209214)
B	B3	20	43902338	43939380	6		0 DEL	37043			(43902338-43939380)
B	B3	21	42335448	42341436	5	-0.73692	DEL	5989		(42335448-42341436)	
B	4	1	995669	1415563	31		0 DEL	41989	0.073830362	(1153667-1184667)	(995669-1415563)
B	4	1	2322891	2825552	43		0 DEL	502662	0.138259904	(2386996-2456493)	(2322891-2825552)
B	4	1	10673019	10817311	30		0 DEL	144293	0.238646365	(10685019-10719453)	(10673019-10817311)
B	4	1	16919026	17283144	31		0 DEL	364119	0.088646843	(16919026-17187289)	(17155012-17283144)
B	4	1	27519669	28084237	36		0 DEL	564569	0.144820208	(27722525-27804285)	(27519669-28084237)
B	4	1	31815008	31975805	27		0 DEL	160798	0.229872262	(31908855-31945947)	(31815008-31975805)
B	4	1	109817255	110059887	34		0 DEL	242633	0.071606088	(109970713-109988086)	(109817255-110059887)
B	4	1	3043966	3152069	21		0 DEL	108104			(3043966-3152069)
B	4	1	3279384	3670589	55		0 DEL	391206			(3279384-3670589)
B	4	1	4039890	4136842	17		0 DEL	96953			(4039890-4136842)
B	4	1	6135457	6333801	18		0 DEL	198345			(6135457-6333801)
B	4	1	6472963	6494762	5		0 DEL	21800			(6472963-6494762)
B	4	1	6959389	7043984	16		0 DEL	84596			(6959389-7043984)
B	4	1	7441100	7683588	41		0 DEL	242489			(7441100-7683588)
B	4	1	10955414	11088889	10		0 DEL	133476			(10955414-11088889)
B	4	1	11399779	11549445	23		0 DEL	149667			(11399779-11549445)
B	4	1	11746890	12079875	54		0 DEL	332986			(11746890-12079875)
B	4	1	15559646	15681459	17		0 DEL	121814			(15559646-15681459)
B	4	1	17442536	17553864	21		0 DEL	111329			(17442536-17553864)
B	4	1	19088005	19460993	33		0 DEL	372983			(19088005-19460993)
B	4	1	20480787	20568418	23		0 DEL	87632			(20480787-20568418)
B	4	1	20641771	20756403	19		0 DEL	114633			(20641771-20756403)
B	4	1	25143159	25195634	15		0 DEL	52476			(25143159-25195634)
B	4	1	25929896	26097220	21		0 DEL	167325			(25929896-26097220)
B	4	1	26344330	26569213	40		0 DEL	224884			(26344330-26569213)
B	4	1	29370407	29535357	20		0 DEL	164951			(29370407-29535357)
B	4	1	29642665	29668805	7		0 DEL	26141			(29642665-29668805)
B	4	1	29955601	30102287	21		0 DEL	146687			(29955601-30102287)
B	4	1	30326129	30442056	18		0 DEL	115928			(30326129-30442056)
B	4	1	30624265	30757663	20		0 DEL	133399			(30624265-30757663)
B	4	1	30942824	31004863	11		0 DEL	62040			(30942824-31004863)
B	4	1	31093238	31160305	16		0 DEL	67068			(31093238-31160305)
B	4	1	31545037	31715942	10		0 DEL	170906			(31545037-31715942)
B	4	1	37188856	37366332	25		0 DEL	177477			(37188856-37366332)
B	4	1	37926757	38048389	12		0 DEL	121633			(37926757-38048389)
B	4	1	46643348	46719684	11		0 DEL	76337			(46643348-46719684)
B	4	1	46841171	46920315	8		0 DEL	79145			(46841171-46920315)
B	4	1	48009550	48218078	17		0 DEL	208529			(48009550-48218078)
B	4	1	110840363	110900289	11		0 DEL	59927			(110840363-110900289)
B	4	1	149724817	150068575	35		0				

Family	Sample	Chr	Start	End	NbSNP	Intensity	Type(copy)	size	overlap	GqCNV	PennCnv
B	4	2	10252284	10326337	18	0	DEL	74054			(10252284-10326337)
B	4	2	73183380	73354961	16	0	DEL	171582			(73183380-73354961)
B	4	2	119652272	119728641	13	0	DEL	7630			(119652272-119728641)
B	4	2	126703341	127095467	36	0	DEL	392127			(126703341-127095467)
B	4	2	128834685	129004143	26	0	DEL	169459			(128834685-129004143)
B	4	2	176643771	176750879	16	0	DEL	107109			(176643771-176750879)
B	4	2	231444854	231542083	21	0	DEL	97230			(231444854-231542083)
B	4	2	232913134	233095879	26	0	DEL	182746			(232913134-233095879)
B	4	3	11558254	11593468	7	-0.964794	AMP	35215		(11558254-11593468)	
B	4	3	9876479	9947493	16	0	DEL	71015	0.307765965	(9925638-9947493)	(9876479-9947493)
B	4	3	10277056	10549672	73	0	DEL	272617	0.051357766	(10390108-10404108)	(10277056-10549672)
B	4	3	38599257	38654368	19	0	DEL	55122	0.430432574	(38630647-38654368)	(38599257-38654368)
B	4	3	47391765	47593957	10	0	DEL	202193		(47391765-47593957)	(47391765-47593957)
B	4	3	48495293	48706491	21	0	DEL	211199	0.155540509	(48633471-48706491)	(48495293-48666320)
B	4	3	49835858	49936784	16	0	DEL	100927	0.631951807	(49835858-49936784)	(49873004-49936784)
B	4	3	52066294	52141187	12	0	DEL	74894	1	(52066294-52141187)	(52066294-52141187)
B	4	3	127132093	127595817	84	0	DEL	463725	0.086633242	(127329811-127351203)	(127132093-127595817)
B	4	3	196974680	197017729	23	0	DEL	43050	0.366178862	(196974680-196990443)	(196974680-197017729)
B	4	3	11580373	11593682	5	-1.119501	DEL	13310		(11580373-11593682)	
B	4	3	46709445	46728581	5	-1.381603	DEL	19137		(46709445-46728581)	
B	4	3	46874520	46910531	5	-1.180505	DEL	36012		(46874520-46910531)	
B	4	3	50128360	50153015	5	-1.544951	DEL	24656		(50128360-50153015)	
B	4	3	50480399	50584628	5	-1.137655	DEL	104230		(50480399-50584628)	
B	4	3	125961424	126003725	6	-1.313259	DEL	42302		(125961424-126003725)	
B	4	3	185766973	185794800	5	-1.561494	DEL	27828		(185766973-185794800)	
B	4	3	198199411	198227527	5	-1.232533	DEL	28117		(198199411-198227527)	
B	4	3	9042597	9095004	19	0	DEL	52408			(9042597-9095004)
B	4	3	10815599	10950251	26	0	DEL	134653			(10815599-10950251)
B	4	3	13370579	13628401	29	0	DEL	257823			(13370579-13628401)
B	4	3	13770678	14281118	58	0	DEL	510441			(13770678-14281118)
B	4	3	14518673	14566350	13	0	DEL	47678			(14518673-14566350)
B	4	3	52507158	52523858	4	0	DEL	16701			(52507158-52523858)
B	4	3	58528200	58601115	19	0	DEL	72916			(58528200-58601115)
B	4	3	124113013	124164620	15	0	DEL	51608			(124113013-124164620)
B	4	3	127724485	127860189	21	0	DEL	135705			(127724485-127860189)
B	4	3	128743919	128875420	10	0	DEL	131502			(128743919-128875420)
B	4	3	134733437	136443160	260	0	DEL	1709724			(134733437-136443160)
B	4	3	139002360	139677125	65	0	DEL	674766			(139002360-139677125)
B	4	3	140462955	142673228	279	0	DEL	220274			(140462955-142673228)
B	4	3	195234773	195362209	22	0	DEL	127437			(195234773-195362209)
B	4	3	195806228	195847296	11	0	DEL	41069			(195806228-195847296)
B	4	4	132685473	133676958	58	0	AMP	991486			(132685473-133676958)
B	4	4	1470080	1543447	22	0	DEL	73368	0.483426017	(1498513-1533980)	(1470080-1543447)
B	4	4	1697918	1871707	11	0	DEL	173790	0.552402325	(1697918-1871707)	(1740155-1836156)
B	4	4	6477971	6684732	38	0	DEL	206762	0.196917229	(6644018-6684732)	(6477971-6684732)
B	4	4	7153498	7202713	20	0	DEL	49216	0.473077861	(7153498-7183266)	(7159984-7202713)
B	4	4	7902977	8354457	100	0	DEL	451481	0.251791327	(7990094-8002037)	(8205434-7902977-8344298)
B	4	4	799787	842313	6	-1.00071	DEL	42527		(799787-842313)	
B	4	4	3185633	3233574	7	-0.813706	DEL	47942		(3185633-3233574)	
B	4	4	3392009	3442937	7	-1.057258	DEL	50929		(3392009-3442937)	
B	4	4	5806443	5820728	5	-1.195882	DEL	14286		(5806443-5820728)	
B	4	4	6384027	6407414	7	-1.10473	DEL	23388		(6384027-6407414)	
B	4	4	7526014	7540434	5	-1.449382	DEL	14421		(7526014-7540434)	
B	4	4	7658657	7673257	5	-1.196718	DEL	14601		(7658657-7673257)	
B	4	4	8418699	8605794	28	0	DEL	187096			(8418699-8605794)
B	4	5	28437779	29013431	53	0	AMP	575653			(28437779-29013431)
B	4	5	45948724	46384240	19	0	AMP	435517			(45948724-46384240)
B	4	5	548377	1281215	78	0	DEL	732839	0.442548773	(681294-918411)	(548377-1281215)
B	4	5	149515448	149646042	42	0	DEL	130595	0.598078027	(149515448-149548286)	(149524238-149646042)
B	4	5	176034429	176260942	45	0	DEL	226514	0.343073717	(176056235-176081374)	(176034429-176260942)
B	4	5	177343022	177524101	27	0	DEL	181080	0.644162801	(177343022-177417661)	(177343022-177524101)
B	4	5	178468319	178559043	22	0	DEL	90725	0.323416919	(178485124-178514465)	(178468319-178559043)
B	4	5	170786994	170808050	5	-1.389193	DEL	21057		(170786994-170808050)	
B	4	5	179457031	179465550	5	-1.176645	DEL	8520		(179457031-179465550)	
B	4	5	1542706	1618371	17	0	DEL	75666			(1542706-1618371)
B	4	5	1847148	1970151	20	0	DEL	123004			(1847148-1970151)
B	4	5	131350393	131465461	16	0	DEL	115069			(131350393-131465461)
B	4	5	131574567	131643492	9	0	DEL	68926			(131574567-131643492)
B	4	5	133268826	133827273	42	0	DEL	558448			(133268826-133827273)
B	4	5	133900603	133941452	11	0	DEL	40850			(133900603-133941452)
B	4	5	135194804	135258152	13	0	DEL	63349			(135194804-135258152)
B	4	5	150812182	150900301	21	0	DEL	88120			(150812182-150900301)
B	4	5	170969444	171130202	40	0	DEL	160759			(170969444-171130202)
B	4	5	177623145	177672234	11	0	DEL	49090			(177623145-177672234)
B	4	6	65873533	66461649	66	0	AMP	588117			(65873533-66461649)
B	4	6	93994118	94182713	37	0	AMP	188596			(93994118-94182713)
B	4	6	32158045	32311515	63	0	DEL	153471	0.264675411	(32179871-32217957)	(32298-32158045-32311515)
B	4	6	33070398	33310618	106	0	DEL	240221	0.034255956	(33244123-33252351)	(33070398-33310618)
B	4	6	33752011	33941469	54	0	DEL	189459	0.107933643	(33921021-33941469)	(33752011-33941469)
B	4	6	36812785	37002655	48	0	DEL	189871	0.029772846	(36812785-36823899)	(36812785-37002655)
B	4	6	41551451	41766544	44	0	DEL	215094	0.136354338	(41655290-41684618)	(41551451-41766544)
B	4	6	42959374	43295744	48	0	DEL	336371	0.216992547	(43048651-43211640)	(42959374-43295744)
B	4	6	43940155	44049623	28	0	DEL	109469	0.338689492	(44008421-44045496)	(43940155-44049623)
B	4	6	44132240	44602448	106	0	DEL	452074	0.204475031	(44255858-44270124)	(44132240-44602448)
B	4	6	33663882	33684555	5	-0.995633	DEL	20674		(33663882-33684555)	
B	4	6	33732199	33738995	5	-1.782615	DEL	6797		(33732199-33738995)	
B	4	6	35835633	35853633	5	-1.119595	DEL	18001		(35835633-35853633)	
B	4	6	43850557	43866463	5	-1.442137	DEL	15907		(43850557-43866463)	
B	4	6	120522	171015	15	0	DEL	50494			(120522-171015)
B	4	6	3476911	3564043	14	0	DEL	87133			(3476911-3564043)
B	4	6	31205280	31248026	31	0	DEL	42747			(31205280-31248026)
B	4	6	31701455	31754377	19	0	DEL	52923			(31701455-31754377)
B	4	6	34051992	34226564							

Family	Sample	Chr	Start	End	NbSNP	Intensity	Type (copy)	size	overlap	GqCNV	PennCnv
B	4	8	27152551	27254801	14	0	DEL	102251			(27152551-27254801)
B	4	8	27313704	27375722	13	0	DEL	62019			(27313704-27375722)
B	4	8	55249749	55341128	12	0	DEL	91580			(55249749-55341128)
B	4	8	133106326	133134290	13	0	DEL	27965			(133106326-133134290)
B	4	8	134577438	134635315	22	0	DEL	57878			(134577438-134635315)
B	4	8	142776025	142815249	9	0	DEL	39225			(142776025-142815249)
B	4	8	143360944	143563731	26	0	DEL	202788			(143360944-143563731)
B	4	9	116050226	116060938	5	0	AMP	10713			(116050226-116060938)
B	4	9	138754316	138799208	4	0	AMP	44893			(138754316-138799208)
B	4	9	33388606	33468434	25	0	DEL	79829	0.166017362	(33455182-33468434)	(33388606-33468434)
B	4	9	123328769	123384259	15	0	DEL	55491	0.134652466	(123376788-123384259)	(123328769-123384259)
B	4	9	128294129	128320931	12	0	DEL	26803	0.642316159	(128294129-128320931)	(128298658-128315873)
B	4	9	131951926	131998126	21	0	DEL	46201	0.702170949	(131951926-131984366)	(131951926-131998126)
B	4	9	135444521	135576188	47	0	DEL	131668	0.181980436	(135545450-135569410)	(135444521-135576188)
B	4	9	135706220	135782586	30	0	DEL	76367	0.521573455	(135713341-135745411)	(135706220-135782586)
B	4	9	136233032	136546350	70	0	DEL	313319	0.295567776	(136284673-136303539)	(136233032-136546350)
B	4	9	136580349	136634640	13	0	DEL	54292	0.694245929	(136580349-136618040)	(136580349-136634640)
B	4	9	136660757	136793924	39	0	DEL	133168	0.101187973	(136736770-136750244)	(136660757-136793924)
B	4	9	137698704	137793473	28	0	DEL	94770	0.442924976	(137742049-137784024)	(137698704-137793473)
B	4	9	138125255	138217164	21	0	DEL	91910	0.191970406	(138155232-138172875)	(138125255-138217164)
B	4	9	139876646	140128836	17	0	DEL	252191	0.418448715	(139880482-139986010)	(139876646-140128836)
B	4	9	95423426	95449191	5	-1.018571	DEL	25766		(95423426-95449191)	
B	4	9	34511867	34675940	23	0	DEL	164074			(34511867-34675940)
B	4	9	95609164	95670376	11	0	DEL	61213			(95609164-95670376)
B	4	9	100395445	100573794	29	0	DEL	178350			(100395445-100573794)
B	4	9	115949921	116040622	22	0	DEL	70702			(115949921-116040622)
B	4	9	116062430	116276378	55	0	DEL	213949			(116062430-116276378)
B	4	9	123911832	124023946	27	0	DEL	121115			(123911832-124023946)
B	4	9	124910287	125140829	24	0	DEL	230543			(124910287-125140829)
B	4	9	126089586	126109450	6	0	DEL	19865			(126089586-126109450)
B	4	9	126123754	126262060	13	0	DEL	138307			(126123754-126262060)
B	4	9	126575813	126683767	12	0	DEL	107955			(126575813-126683767)
B	4	9	127899007	127920098	7	0	DEL	21092			(127899007-127920098)
B	4	9	129329772	129708778	48	0	DEL	379007			(129329772-129708778)
B	4	9	129927677	130008219	12	0	DEL	80543			(129927677-130008219)
B	4	9	131398648	131469999	15	0	DEL	71352			(131398648-131469999)
B	4	9	131426269	13169678	13	0	DEL	46990			(131426269-13169678)
B	4	9	132535399	132846783	45	0	DEL	311385			(132535399-132846783)
B	4	9	132917699	132986005	14	0	DEL	68307			(132917699-132986005)
B	4	9	134895522	134922943	6	0	DEL	27422			(134895522-134922943)
B	4	9	137195848	137223172	10	0	DEL	27325			(137195848-137223172)
B	4	9	137250853	137286649	13	0	DEL	35797			(137250853-137286649)
B	4	9	137392698	137488983	18	0	DEL	96286			(137392698-137488983)
B	4	9	138576033	138736563	8	0	DEL	160531			(138576033-138736563)
B	4	9	138813813	138896221	5	0	DEL	82409			(138813813-138896221)
B	4	9	138940889	139023858	8	0	DEL	82970			(138940889-139023858)
B	4	9	139049256	139093641	4	0	DEL	44386			(139049256-139093641)
B	4	10	134816144	134921592	10	0	AMP	51449			(134816144-134921592)
B	4	10	44763520	44811377	14	0	DEL	47858	0.669585022	(44766054-44811377)	(44763520-44798098)
B	4	10	80542276	80577153	11	0	DEL	34878	0.555135042	(80542276-8057153)	(80542276-8057153)
B	4	10	88425798	88739172	40	0	DEL	313375	0.0948927	(88690618-88720354)	(88425798-88739172)
B	4	10	126278584	126288175	12	0	DEL	9592	0.274291076	(126278584-126288175)	(126278584-126288175)
B	4	10	134011507	134140516	27	0	DEL	129010	0.315618944	(134045961-134086678)	(134011507-134140516)
B	4	10	80730323	80758122	5	-1.693212	DEL	27800		(80730323-80758122)	
B	4	10	546129	591089	8	0	DEL	44961			(546129-591089)
B	4	10	1189671	1220968	8	0	DEL	31298			(1189671-1220968)
B	4	10	43465828	43758869	35	0	DEL	293042			(43465828-43758869)
B	4	10	72104200	72145774	11	0	DEL	41575			(72104200-72145774)
B	4	10	72720989	72785948	14	0	DEL	64940			(72720989-72785948)
B	4	10	73400079	73515890	18	0	DEL	115812			(73400079-73515890)
B	4	10	76478766	76702202	25	0	DEL	223437			(76478766-76702202)
B	4	10	98822687	98879703	12	0	DEL	57017			(98822687-98879703)
B	4	10	99462700	99531094	10	0	DEL	68395			(99462700-99531094)
B	4	10	100101382	100169841	15	0	DEL	68460			(100101382-100169841)
B	4	10	105164859	105230676	15	0	DEL	65818			(105164859-105230676)
B	4	10	126644888	126729328	21	0	DEL	84441			(126644888-126729328)
B	4	10	134622855	134804366	23	0	DEL	181512			(134622855-134804366)
B	4	10	134852827	134939025	13	0	DEL	86199			(134852827-134939025)
B	4	11	38049244	38278782	22	0	AMP	229539			(38049244-38278782)
B	4	11	50288640	51228612	16	0	AMP	939973			(50288640-51228612)
B	4	11	352668	501805	26	0	DEL	149138	0.261201035	(418385-457339)	(352668-501805)
B	4	11	539119	631191	19	0	DEL	92073	0.308244545	(599888-631191)	(539119-608665)
B	4	11	756479	3222527	369	0	DEL	2466049	0.118371533	(756479-793017)	(1180599-1180599)
B	4	11	17499225	17608071	22	0	DEL	108847	0.236708407	(17529905-17555669)	(17499225-17608071)
B	4	11	63539928	63634650	20	0	DEL	94723	0.352976574	(63582893-63616327)	(63539928-63634650)
B	4	11	63636973	63906946	36	0	DEL	269974	0.182921318	(63756105-63805488)	(63636973-63906946)
B	4	11	66880909	67194771	32	0	DEL	313863	0.163816697	(67129053-67180468)	(66880909-67194771)
B	4	11	67529305	67957871	46	0	DEL	428567	0.112719831	(67529305-67577612)	(67529305-67957871)
B	4	11	61060379	61127859	5	-1.531367	DEL	67481		(61060379-61127859)	
B	4	11	6352266	6629033	45	0	DEL	276768			(6352266-6629033)
B	4	11	7943923	9047820	141	0	DEL	1103898			(7943923-9047820)
B	4	11	10373830	12547358	41	0	DEL	416029			(10373830-12547358)
B	4	11	18761510	19084800	36	0	DEL	323291			(18761510-19084800)
B	4	11	44854276	44972997	23	0	DEL	118722			(44854276-44972997)
B	4	11	45783926	45891829	10	0	DEL	107904			(45783926-45891829)
B	4	11	61191108	61282647	15	0	DEL	91540			(61191108-61282647)
B	4	11	61421568	61572379	23	0	DEL	150812			(61421568-61572379)
B	4	11	64249338	64458776	18	0	DEL	209439			(64249338-64458776)
B	4	11	65338155	65532647	15	0	DEL	194493			(65338155-65532647)
B	4	11	68768714	68899054	23	0	DEL	130341			(68768714-68899054)
B	4	11	69278405	69548426	34	0	DEL	270022			(69278405-69548426)
B	4	11	72106789	72614922	44	0	DEL	508134			(72106789-72614922)
B	4	11	74840402	74970249	22	0	DEL	129448			(74840402-74970249)
B	4	11	75555689	75731175	29	0	DEL	175487			(75555689-75731175)
B	4	11	76098174	76671893	68	0	DEL	573720			(76098174-76671893)
B	4	11	116508959	116607858	11	0	DEL	98900			(116508959-116607858)
B	4	11	116908445	116986318	18	0	DEL	77874			(116908445-116986318)
B	4	11	118881882	119058888	18	0	DEL	177007			(118881882-119058888)
B	4	11	119477836	119508743	8	0	DEL	30908			(119477836-119508743)
B	4	11	120041103	120082633	10	0	DEL	41531			(120041103-120082633)
B	4	12	102384	197682	37	0	DEL	95299	0.37465241	(134100-169803)	(102384-197682)
B	4	12	30999635	31086539	28	0	DEL	86905	0.258949428	(31018427-31040930)	(30999635-31086539)
B	4	12	51744160	51907978	28	0	DEL	163819	0.209035582	(51873735-51907978)	(51744160-51907978)
B	4	12	56134906	56232744	17	0	DEL	9793			

Family	Sample	Chr	Start	End	NbSNP	Intensity	Type(copy)	size	overlap	GqCNV	PennCnv
B	4	14	104761137	105025750	11	0	AMP	264614	0.131009697	(104793771-105025750)	(104761137-104828437)
B	4	14	102029715	102307531	24	0	DEL	277817	0.318720597	(102079120-102167665)	(102029715-102307531)
B	4	14	1024227356	1025195256	16	0	DEL	92171	0.457226243	(102431770-102473912)	(1024227356-1025195256)
B	4	14	103623797	103756099	30	0	DEL	132303	0.206163126	(103673626-103700901)	(103623797-103756099)
B	4	14	104210939	104348254	27	0	DEL	137316	0.207805354	(104210939-104239473)	(104210939-104348254)
B	4	14	90036359	90072766	5	-1.198084	DEL	36408		(90036359-90072766)	
B	4	14	68857502	68891064	11	0	DEL	33563			(68857502-68891064)
B	4	14	76496278	76688061	34	0	DEL	191784			(76496278-76688061)
B	4	14	96141360	96256591	26	0	DEL	115232			(96141360-96256591)
B	4	14	100063798	100179505	14	0	DEL	115708			(100063798-100179505)
B	4	14	100193621	100240293	11	0	DEL	46673			(100193621-100240293)
B	4	14	100980531	101099030	20	0	DEL	118500			(100980531-101099030)
B	4	14	103056833	103235500	14	0	DEL	178614			(103056833-103235500)
B	4	14	103769248	103818429	6	0	DEL	49182			(103769248-103818429)
B	4	14	104686693	104750100	8	0	DEL	63408			(104686693-104750100)
B	4	14	104977118	105025750	5	0	DEL	48633			(104977118-105025750)
B	4	15	39658784	40250969	86	0	DEL	592186	0.08427082	(39885028-39934931)	(39658784-40250969)
B	4	15	73708691	73748573	14	0	DEL	39883	1	(73708691-73748573)	(73708691-73748573)
B	4	15	75638590	75984408	52	0	DEL	345819	0.254306444	(75699463-75759825)(75847)	(75638590-75984408)
B	4	15	27169093	27216380	10	0	DEL	47288			(27169093-27216380)
B	4	15	38326665	38352997	7	0	DEL	26333			(38326665-38352997)
B	4	15	43169290	43281530	14	0	DEL	112241			(43169290-43281530)
B	4	15	66774006	66872811	19	0	DEL	98806			(66774006-66872811)
B	4	15	71399430	71968591	58	0	DEL	569162			(71399430-71968591)
B	4	15	72300281	72329739	9	0	DEL	29459			(72300281-72329739)
B	4	15	72462711	72735116	26	0	DEL	272406			(72462711-72735116)
B	4	15	76681394	76898148	17	0	DEL	216755			(76681394-76898148)
B	4	16	969913	1265972	49	0	DEL	296060	0.096960076	(990878-1019583)	(969913-1265972)
B	4	16	82547590	82605823	21	0	DEL	58234	0.12722808	(82585624-82593032)	(82547590-82605823)
B	4	16	45320	132314	13	0	DEL	86995			(45320-132314)
B	4	16	259512	800674	76	0	DEL	541163			(259512-800674)
B	4	16	1495590	1548178	13	0	DEL	52589			(1495590-1548178)
B	4	16	1994156	2073902	12	0	DEL	79747			(1994156-2073902)
B	4	16	2958636	3065428	15	0	DEL	106793			(2958636-3065428)
B	4	16	3506363	3687205	24	0	DEL	180843			(3506363-3687205)
B	4	16	4307731	4674514	24	0	DEL	366784			(4307731-4674514)
B	4	16	11021507	11082153	13	0	DEL	60647			(11021507-11082153)
B	4	16	11202648	11358802	27	0	DEL	156155			(11202648-11358802)
B	4	16	12065401	12458623	52	0	DEL	393223			(12065401-12458623)
B	4	16	12523303	12573780	14	0	DEL	50478			(12523303-12573780)
B	4	16	15490744	16197033	95	0	DEL	706290			(15490744-16197033)
B	4	16	27772262	27843768	14	0	DEL	71509			(27772262-27843768)
B	4	16	28447349	28502050	8	0	DEL	54702			(28447349-28502050)
B	4	16	30413322	31271994	40	0	DEL	858673			(30413322-31271994)
B	4	16	48122762	48235013	21	0	DEL	112252			(48122762-48235013)
B	4	16	53597939	53776363	37	0	DEL	178425			(53597939-53776363)
B	4	16	54930723	54953987	8	0	DEL	23265			(54930723-54953987)
B	4	16	56159293	56319902	37	0	DEL	160610			(56159293-56319902)
B	4	16	66765434	66063748	18	0	DEL	298315			(66765434-66063748)
B	4	16	66459571	66582496	6	0	DEL	122926			(66459571-66582496)
B	4	16	69251501	69305909	8	0	DEL	54409			(69251501-69305909)
B	4	16	69315056	69562633	14	0	DEL	247578			(69315056-69562633)
B	4	16	71548787	71647540	20	0	DEL	98754			(71548787-71647540)
B	4	16	73634239	73725080	11	0	DEL	90842			(73634239-73725080)
B	4	16	79701010	79748114	12	0	DEL	47105			(79701010-79748114)
B	4	16	84178403	84247154	4	0	DEL	68752			(84178403-84247154)
B	4	16	86229994	86296359	15	0	DEL	66366			(86229994-86296359)
B	4	16	87395753	87643323	26	0	DEL	247571			(87395753-87643323)
B	4	16	88019550	88219799	7	0	DEL	200250			(88019550-88219799)
B	4	17	77249210	77398423	7	0	AMP	149214			(77249210-77398423)
B	4	17	3502351	35084561	11	0	DEL	6103	0.277826023	(35067606-35084561)	(3502351-35084561)
B	4	17	39683019	41496568	159	0	DEL	1813550	0.006935017	(39683019-39704251)	(39691675-41496568)
B	4	17	53738052	53772286	27	0	DEL	34235	0.991675186	(53738052-53772001)	(53738052-53772286)
B	4	17	73740166	73785521	27	0	DEL	45356	0.367889585	(73754653-73765190)(73777)	(73740166-73785521)
B	4	17	74642689	74694759	17	0	DEL	52071	0.374565497	(74651557-74671060)	(74642689-74694759)
B	4	17	3538571	3733656	27	0	DEL	195086			(3538571-3733656)
B	4	17	4623463	4754141	23	0	DEL	130679			(4623463-4754141)
B	4	17	7133979	7200392	14	0	DEL	66414			(7133979-7200392)
B	4	17	7232831	7360548	20	0	DEL	127718			(7232831-7360548)
B	4	17	7833899	9675381	278	0	DEL	1841483			(7833899-9675381)
B	4	17	16698929	16762350	12	0	DEL	63422			(16698929-16762350)
B	4	17	17206783	17775416	43	0	DEL	586334			(17206783-17775416)
B	4	17	18803830	19414112	28	0	DEL	610283			(18803830-19414112)
B	4	17	23862878	24314877	22	0	DEL	452000			(23862878-24314877)
B	4	17	30066545	30245574	23	0	DEL	179030			(30066545-30245574)
B	4	17	34443667	34603181	26	0	DEL	159515			(34443667-34603181)
B	4	17	36914267	37200732	33	0	DEL	286466			(36914267-37200732)
B	4	17	37295202	37572260	19	0	DEL	277059			(37295202-37572260)
B	4	17	42220599	42439278	28	0	DEL	218680			(42220599-42439278)
B	4	17	43057279	43458759	44	0	DEL	401481			(43057279-43458759)
B	4	17	43864446	44382115	302	0	DEL	2517670			(43864446-44382115)
B	4	17	52115613	53305299	200	0	DEL	1189687			(52115613-53305299)
B	4	17	53985473	54157457	11	0	DEL	171985			(53985473-54157457)
B	4	17	58931780	59421085	36	0	DEL	489306			(58931780-59421085)
B	4	17	68831812	68959933	23	0	DEL	128122			(68831812-68959933)
B	4	17	71061642	71437716	43	0	DEL	376075			(71061642-71437716)
B	4	17	71781664	71811754	10	0	DEL	30091			(71781664-71811754)
B	4	17	71898879	72200357	34	0	DEL	301479			(71898879-72200357)
B	4	17	72327280	72465215	28	0	DEL	173936			(72327280-72465215)
B	4	17	72790904	73040560	41	0	DEL	249657			(72790904-73040560)
B	4	17	74703643	74776367	15	0	DEL	72725			(74703643-74776367)
B	4	17	74885572	74973490	24	0	DEL	87919			(74885572-74973490)
B	4	17	76554009	76650303	16	0	DEL	96295			(76554009-76650303)
B	4	17	76658879	76739760	12	0	DEL	80882			(76658879-76739760)
B	4	17	76747354	76809616	11	0	DEL	62263			(76747354-76809616)
B	4	17	76893405	77241821	35	0	DEL	348417			(76893405-77241821)

Family	Sample	Chr	Start	End	NbSNP	Intensity	Type(copy)	size	overlap	GqCNV	PennCnv
B	4	19	46948446	47120607	12		0 DEL	172162			(46948446-47120607)
B	4	19	47147680	47196345	5		0 DEL	48666			(47147680-47196345)
B	4	19	51492273	51515856	9		0 DEL	23584			(51492273-51515856)
B	4	19	51526523	51605589	12		0 DEL	79067			(51526523-51605589)
B	4	19	52604135	52734788	13		0 DEL	130654			(52604135-52734788)
B	4	19	52828756	52897537	14		0 DEL	68782			(52828756-52897537)
B	4	19	53781523	53951341	24		0 DEL	169819			(53781523-53951341)
B	4	19	54820355	54900907	10		0 DEL	80553			(54820355-54900907)
B	4	19	55089075	55135873	11		0 DEL	47799			(55089075-55135873)
B	4	19	55873401	55922880	10		0 DEL	49480			(55873401-55922880)
B	4	19	56178879	56226942	10		0 DEL	48064			(56178879-56226942)
B	4	19	60244831	60317756	17		0 DEL	72926			(60244831-60317756)
B	4	19	60537198	60566454	8		0 DEL	29257			(60537198-60566454)
B	4	19	63725153	63776118	8		0 DEL	50966			(63725153-63776118)
B	4	20	39365770	39421666	16		0 DEL	55897	0.389215879 (39397744-39419499)		(39365770-39421666)
B	4	20	55587305	55718946	30		0 DEL	131642	0.2746236 (55597093-55633244)		(55587305-55718946)
B	4	20	60320976	60396019	16		0 DEL	75044	0.406175044 (60323959-60354439)		(60320976-60396019)
B	4	20	62046863	62306964	41		0 DEL	260102	0.113474714 (62129289-62158803)		(62046863-62306964)
B	4	20	546694	580959	12		0 DEL	34266			(546694-580959)
B	4	20	882948	970712	25		0 DEL	87765			(882948-970712)
B	4	20	3545874	3751596	44		0 DEL	205723			(3545874-3751596)
B	4	20	31256730	31404201	21		0 DEL	147472			(31256730-31404201)
B	4	20	35378588	35710773	45		0 DEL	332186			(35378588-35710773)
B	4	20	36730202	36874332	21		0 DEL	144131			(36730202-36874332)
B	4	20	36967783	37317726	31		0 DEL	349944			(36967783-37317726)
B	4	20	42468107	42721501	18		0 DEL	253395			(42468107-42721501)
B	4	20	43837117	44118385	37		0 DEL	281269			(43837117-44118385)
B	4	20	45119544	45268415	22		0 DEL	148872			(45119544-45268415)
B	4	20	46472769	46913183	53		0 DEL	440415			(46472769-46913183)
B	4	20	48088423	48745308	91		0 DEL	656886			(48088423-48745308)
B	4	20	56120836	56236297	16		0 DEL	115462			(56120836-56236297)
B	4	20	56705464	56763964	13		0 DEL	58501			(56705464-56763964)
B	4	20	60408945	60764860	32		0 DEL	355916			(60408945-60764860)
B	4	20	60836902	60894522	13		0 DEL	57621			(60836902-60894522)
B	4	20	61192853	61217967	6		0 DEL	25115			(61192853-61217967)
B	4	21	38037943	38179247	37		0 DEL	141305			(38037943-38179247)
B	4	21	41674998	41820236	34		0 DEL	145239			(41674998-41820236)
B	4	21	41909703	42006898	33		0 DEL	97196			(41909703-42006898)
B	4	21	42109550	42194597	33		0 DEL	85048			(42109550-42194597)
B	4	21	42334112	42382768	20		0 DEL	48657			(42334112-42382768)
B	4	21	43564562	43708680	42		0 DEL	144119			(43564562-43708680)
B	4	21	43989282	44082475	19		0 DEL	93194			(43989282-44082475)
B	4	21	44180915	44512009	47		0 DEL	331095			(44180915-44512009)
B	4	21	45671372	45825267	24		0 DEL	153896			(45671372-45825267)
B	4	21	46359676	46406530	13		0 DEL	46855			(46359676-46406530)
B	4	22	18350502	18401938	20		0 AMP	51437			(18350502-18401938)
B	4	22	48404501	48448431	7		0 AMP	43931			(48404501-48448431)
B	4	22	19546695	19674884	20		0 DEL	128190	0.120477416 (19654308-19674884)		(19546695-19674884)
B	4	22	18330428	18342203	7		0 DEL	11776			(18330428-18342203)
B	4	22	18409878	18621160	47		0 DEL	211283			(18409878-18621160)
B	4	22	19102598	19190931	14		0 DEL	88334			(19102598-19190931)
B	4	22	19706092	19739018	13		0 DEL	32927			(19706092-19739018)
B	4	22	22173675	22225043	11		0 DEL	51369			(22173675-22225043)
B	4	22	22304200	22386537	17		0 DEL	82338			(22304200-22386537)
B	4	22	22735492	22952648	17		0 DEL	217157			(22735492-22952648)
B	4	22	23830496	23928101	24		0 DEL	97606			(23830496-23928101)
B	4	22	29586066	29620637	8		0 DEL	34572			(29586066-29620637)
B	4	22	33860483	34147597	62		0 DEL	287115			(33860483-34147597)
B	4	22	35014038	35107685	21		0 DEL	93648			(35014038-35107685)
B	4	22	35854565	35883671	18		0 DEL	29107			(35854565-35883671)
B	4	22	36238961	36289160	9		0 DEL	50200			(36238961-36289160)
B	4	22	36893417	36958252	9		0 DEL	64836			(36893417-36958252)
B	4	22	37152246	37207407	15		0 DEL	55162			(37152246-37207407)
B	4	22	37984993	38189115	29		0 DEL	202123			(37984993-38189115)
B	4	22	38303472	38333255	7		0 DEL	29784			(38303472-38333255)
B	4	22	40666118	41070487	39		0 DEL	404370			(40666118-41070487)
B	4	22	41414557	41452664	11		0 DEL	38108			(41414557-41452664)
B	4	22	41953966	42320777	86		0 DEL	366812			(41953966-42320777)
B	4	22	42546306	42629590	26		0 DEL	83285			(42546306-42629590)
B	4	22	42912379	42998225	24		0 DEL	85847			(42912379-42998225)
B	4	22	43390425	43463948	17		0 DEL	73524			(43390425-43463948)
B	4	22	43559218	43589330	11		0 DEL	30113			(43559218-43589330)
B	4	22	44854129	44931972	17		0 DEL	77844			(44854129-44931972)
B	4	22	45025652	45142335	13		0 DEL	116684			(45025652-45142335)
B	4	22	45815366	45941661	30		0 DEL	126296			(45815366-45941661)
B	4	22	47137593	47227761	27		0 DEL	90169			(47137593-47227761)
B	4	22	47522291	47541323	7		0 DEL	19033			(47522291-47541323)
B	4	22	47785419	47877580	24		0 DEL	92162			(47785419-47877580)
B	4	22	48458759	48706947	28		0 DEL	248189			(48458759-48706947)
B	4	22	48777607	48799168	4		0 DEL	21562			(48777607-48799168)
B	4	22	48805358	49039645	41		0 DEL	234288			(48805358-49039645)
B	4	22	49276447	49419027	35		0 DEL	142581			(49276447-49419027)
B	5	1	27721887	27804285	11		0 DEL	82399	0.992257188 (27722525-27804285)		(27721887-27804285)
B	5	1	31834438	31951076	21		0 DEL	116639	0.198407051 (31914941-31938082)		(31834438-31951076)
B	5	1	17155012	17190652	8		0 DEL	35641			(17155012-17190652)
B	5	1	111054060	111132054	13		0 DEL	77995			(111054060-111132054)
B	5	1	226139432	226154894	3		0 DEL	15463			(226139432-226154894)
B	5	2	110243431	110292012	12		0 AMP	48582	0.436025689 (110243431-110264613)		(110243431-110292012)
B	5	3	14434627	14661140	43		0 DEL	226514			(14434627-14661140)
B	5	3	49627152	50307701	40		0 DEL	680550			(49627152-50307701)
B	5	5	45948724	46322869	18		0 AMP	374146			(45948724-46322869)
B	5	7	61075979	61990710	12		0 AMP	914732			(61075979-61990710)
B	5	7	69831960	69861129	14		0 DEL	29170	0.622077477 (69842984-69861129)		(69831960-69861129)
B	5	8	142512205	142636925	36		0 DEL	124721			(142512205-142636925)
B	5	9	131951926	131970164	5	-0.556023	DEL	18239	(131951926-131970164)		
B	5	9	27441960	27448939	5		0 DEL	6980			(27441960-27448939)
B	5	9	36490359	36841358	41		0 DEL	351000			(36490359-36841358)
B	5	9	38214411	38288279	17		0 DEL	73869			(38214411-38288279)
B	5	9	133886708	134045512	19		0 DEL	158805			(133886708-134045512)
B	5	10	88339518	88520461	21		0 DEL	180944			(88339518-88520461)
B	5	11	38208761	38354482	24		0 AMP	145722			(38208761-38354482)
B	5	11	46642836	46729930	8		0 DEL	87095			(46642836-46729930)
B	5	11	70595291	70631298	7		0 DEL	36008			(70595291-70631298)
B	5	12	48590194	48640704	18		0 DEL	50511	0.290629764 (48621353-48640704)		(48590194-48640704)
B	5	12	120500	180595	22		0 DEL	60096			(120500-180595)
B	5	12	130421943	130487226	8		0 DEL	65284			(130421943-130487226)
B	5	16	28447349	28790742	11		0 DEL	343394			(28447349-28790742)
B	5	17	7029647	7431901	60		0 DEL	402255			(7029647-7431901)
B	5	17	7912365	7968318	15		0 DEL	55954			(7912365-7968318)
B	5	18	53877085	53927525	10		0 DEL	50441			(53877085-53927525)
B	5	19	19073298	19117870	6		0 DEL	44573			(19073298-19117870)
B	5	20	551								