



Université de Montréal

**Étude clinique et génétique d'une nouvelle forme d'ataxie spinocérébelleuse  
pure associée à l'Érythrokratodermie**

par

Maude Turcotte Gauthier, B.Sc.

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en sciences biomédicales (option générale)

Avril, 2010

© Maude Turcotte Gauthier, 2010

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

**Étude clinique et génétique d'une nouvelle forme d'ataxie spinocérébelleuse  
pure associée à l'Érythrokratodermie**

présenté par :  
Maude Turcotte Gauthier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Sinnett  
président-rapporteur

Patrick Cossette,  
directeur de recherche

Manuela M. Santos  
membre du jury

## Résumé

Nous présentons ici la description clinique et génétique d'un syndrome neurocutané unique. Le laboratoire du Dr Cossette a entrepris la caractérisation clinique et génétique d'une famille canadienne-française qui a été identifiée par les Drs Giroux et Barbeau en 1972 et qui comprend plus de 100 personnes sur six générations. Les membres atteints de cette famille présentent des lésions typiques d'érythrokratodermie (EK) (OMIM 133190, EKV1 et EKV2), associées à une ataxie spinocérébelleuse pure. Dans cette famille, l'ataxie est caractérisée par des troubles de la coordination et de la démarche causés par une dégénérescence du cervelet et de la moelle épinière. Cette ataxie est transmise selon un mode autosomique dominant. Une étude antérieure de cette variante d'EK avec ataxie avait suggéré une liaison sur le chromosome 1p34-p35, soit la même région que les formes EKV de type 1 et 2, causées respectivement par des mutations dans les gènes connexin-31 (GJB3; OMIM 603324) et connexin-30.3 (GJB4; OMIM 605425). Cependant, aucune mutation n'a été retrouvée dans ces gènes pour la famille canadienne-française. Nous avons récemment recontacté la famille et effectué des examens détaillés, incluant une imagerie par résonance magnétique (IRM) et un électromyogramme (EMG). Les manifestations neurologiques des individus atteints sont compatibles avec une nouvelle forme d'ataxie cérébelleuse pure à transmission autosomique dominante (ADCA de type III dans la classification de Harding) que nous avons appelée SCA34. Une cartographie complète du génome nous a permis de localiser le gène SCA34 sur le chromosome 6p12.3-q16.2. Également, en collaboration avec les Drs Alexis Brice (Hôpital Pitié-La Salpêtrière, Paris) et Alfredo Brusco (Hôpital San Giovanni Battista di Torino, Italie), nous avons confirmé que trois autres familles européennes avec SCA inexplicée étaient également liées au locus SCA34. Notre laboratoire a récemment entrepris la recherche des mutations responsables de SCA34. Les résultats de ce criblage de gènes candidats sont présentés dans le chapitre 3 de cette thèse.

**Mots-clés** : ataxie cérébelleuse autosomique dominante, Érythrokratodermie, étude de liaison, ataxie spinocérébelleuse, SCA34, génétique.

## Abstract

We present here the clinical and genetic description of a unique neuro-cutaneous syndrome. Dr. Cossette's laboratory began the clinical and genetic characterization of a French-Canadian family who was identified by Drs. Giroux and Barbeau in 1972 and includes more than 100 people over six generations. The affected members of this family have typical lesions of erythrokeratoderma (EK) (OMIM 133190, and EKV1 EKV2), associated with pure spinocerebellar ataxia. In this family, the clinical phenotype is characterized by gait ataxia caused by degeneration of the cerebellum and spinal cord and the pattern of inheritance is compatible with an autosomal dominant trait. In a previous study of this variant of ataxia with EK, putative linkage was found on chromosome 1p34-p35, the same chromosomal region of EKV1 and EKV2 that are respectively caused by mutations in the connexin-31 gene (GJB3, OMIM 603324) and connexin -30.3 (GJB4, OMIM 605425). However, no mutations have been found in these latter genes for the French-Canadian family. We recently contacted the family and carried out detailed examinations, including a magnetic resonance imaging (MRI) and electromyography (EMG). Neurological manifestations of affected individuals are consistent with a new form of pure autosomal dominant cerebellar ataxia, (ADCA type III in the classification of Harding) that we named SCA34. A whole genome scan allowed us to map the gene on chromosome 6p12.3-q16.2. Interestingly, in collaboration with Dr. Alexis Brice (Hôpital Pitié-La Salpêtrière, Paris), and Alfredo Brusco (San Giovanni Battista Hospital, Turin, Italy), we found that three additional European families with unexplained SCA were also linked to the SCA34 locus. Our laboratory has recently begun the search for mutations causing SCA34. The results of this screening of candidate genes are presented in Chapter 3 of this thesis.

**Keywords:** autosomal dominant cerebellar ataxia, Erythrokeratoderma, linkage analysis, spinocerebellar ataxia, SCA34, genetics

## Table des matières

Résumé.....	iv
Abstract.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Remerciements.....	xv
Avant-propos.....	xvi
Chapitre 1 - Introduction.....	1
1.1 État des connaissances sur les ataxies.....	1
1.2 Importance du cervelet dans la maladie.....	2
1.2.1 Morphologie du cervelet.....	2
1.2.2 Organisation cellulaire.....	5
1.2.3 Les maladies causées par une anomalie du cervelet.....	6
1.3 Présentation clinique des ataxies dominantes.....	7
1.3.1 Ataxie dominante de type I (ACDA type I).....	11
1.3.2 Ataxie dominante de type II (ACDA type II).....	11
1.3.3 Ataxie dominante de type III (ACDA type III).....	11
1.4 Mécanismes moléculaires responsables des ataxies dominantes.....	12
1.4.1 Expansion causée par une anomalie des polyglutamines.....	18
1.4.2 Régulation de l'expression du gène par une expansion dans une région non codante.....	21
1.4.3 Mutations ponctuelles.....	22
1.4.4 Délétions/duplications.....	24
1.4.5 Insertion.....	24
1.5 État des connaissances sur les Érythrokratodermies.....	25
1.7 Génétique et mécanismes moléculaires responsables des Érythrokratodermies variabilis et autres syndromes similaires.....	27
1.7.1 Importance des communications cellulaires.....	29
1.7.2 Maladies associées à des mutations dans les connexines.....	31
1.7.3 Maladies apparentées à l'érythrokratodermie associées à une atteinte neurologique.....	32

1.8 Les études génétiques .....	34
1.8.1 Recombinaison génétique .....	37
1.8.2 Notions de polymorphismes .....	37
1.8.3 Études de liaison génétique.....	38
1.8.4 Analyse de liaison .....	39
1.9 Projet de recherche .....	40
1.9.1 Hypothèse.....	40
1.9.2 But et objectifs .....	40
1.9.3 Approche pour identifier les gènes causant SCA34 .....	40
1.9.4 Impact de ce travail de recherche.....	41
Chapitre 2 : .....	42
Un nouveau locus pour une forme d'ataxie spinocérébelleuse pure associée à de l'Érythrokatodermie localisé sur le chromosome 6q13-16.1. ....	42
A novel locus for pure Spinocerebellar Ataxia and Erythrokeratoderma maps to chromosome 6q13-16.1 .....	43
2.1 Apport des coauteurs .....	44
2.2 Résumé .....	45
2.3 Abstract .....	46
2.4 Introduction .....	47
2.5 Materials and Methods.....	48
2.5.1 Ascertainment and diagnosis of patient and DNA collection.....	48
2.5.2 Genotyping and linkage analysis .....	48
2.5.3 Sequencing of candidate genes.....	49
2.5.4 CAG expansion detection .....	49
2.5.5 Copy number variation .....	50
2.6 Results.....	50
2.6.1 Phenotype of ataxia associated with Erythrokeratoderma in the French-Canadian family .....	50
2.6.2 Phenotype of other SCA families .....	51
2.6.3 SCA34 maps to chromosome 6q13-q16.1 .....	52
2.6.4 Screening for candidate genes in the French-Canadian family .....	53

2.7 Discussion.....	53
2.7.1 SCA34 maps to chromosome 6q13-q16.1 .....	53
2.7.2 The Giroux-Barbeau family exhibits a unique neurocutaneous syndrome .....	54
2.7.3 Towards the identification of SCA34 gene .....	54
2.8 Acknowledgements. ....	55
Chapitre 3 .....	67
3.1 Gènes candidats .....	67
3.1.1 Séquençage des gènes candidats pour le locus de la famille canadienne-française sur le chromosome 6p12.3-q16.2.....	68
3.1.2 Séquençage des gènes candidats pour le locus SCA34 sur le chromosome 6q13-16.1 .....	73
Chapitre 4 - Discussion et perspectives d'avenir .....	80
4.1 Identification d'un nouveau locus pour une ataxie spinocérébelleuse SCA34 sur le chromosome 6q13-q16.1.....	80
4.2 Le syndrome Giroux-Barbeau : un syndrome neurocutané unique.....	81
4.3 Vers l'identification du gène responsable de SCA34 .....	84
4.3.1 Outils de priorisation .....	85
4.3.2 L'ataxie-ome .....	88
4.3.3 Prioriser la région du chromosome 6q15.....	89
4.4 Conclusion .....	90
5.0 Bibliographie.....	91
ANNEXE 1 : Amorces utilisées pour amplifier les exons des gènes candidats . I	
ANNEXE 2 : Amorces utilisées pour amplifier les séquences répétées de CAG .....	VIII
ANNEXE 3 : Article de la première description de la famille canadienne- française par les Dr Giroux et Barbeau .....	IX



## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b>	Description clinique et neuropathologique des différentes formes d'ataxies dominantes.....	8
<b>Tableau II</b>	Localisation chromosomique et gènes impliqués dans les ataxies spinocérébelleuses.....	13
<b>Tableau III</b>	Localisation chromosomique et gènes impliqués dans les polyglutaminopathies.....	18
<b>Tableau IV</b>	Localisation chromosomique et tissu d'expression de tous les membres de la famille des connexines chez l'humain.....	30
<b>Tableau V</b>	Maladies chez l'humain causées par des mutations dans les différentes connexines.....	31
<b>Table VI</b>	Clinical features of affected members of the French-Canadian and European families.....	56
<b>Table VII</b>	List of the candidate genes at the SCA34 locus.....	66
<b>Tableau VIII</b>	Bilan des variants des gènes candidats la famille canadienne-française pour le locus sur le chromosome 6p12.3-q16.2.....	71
<b>Tableau IX</b>	Bilan des variants des gènes candidats pour le locus sur le chromosome 6q13-q16.2.....	78
<b>Tableau X</b>	Liste des 15 meilleurs gènes candidats prédits par le programme SUSPECTS pour les différents phénotypes.....	87
<b>Tableau XI</b>	Listes de gènes présents dans l'ataxie-ome localisés au locus 6q13-q16.2.....	88

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	L'organisation générale du cervelet.....	3
<b>Figure 2</b>	Les cartes somatotopique de la surface du corps dans le cervelet.....	4
<b>Figure 3</b>	Types de neurones présents dans le cortex cérébelleux.....	5
<b>Figure 4</b>	Classification des ataxies spinocérébelleuses en fonction de leur mécanisme moléculaire....	17
<b>Figure 5</b>	Schéma des différentes conséquences au niveau de la cellule lors d'une expansion à polyglutamine.....	19
<b>Figure 6</b>	Taches érythémateuses.....	26
<b>Figure 7</b>	Plaque d'hyperkératose au niveau du genou.....	26
<b>Figure 8</b>	Représentation de la localisation chromosomique du «cluster» de connexines sur le chromosome 1 responsable des formes EKV1 et EKV2.....	27
<b>Figure 9</b>	Structure des communications cellulaires.....	29
<b>Figure 10</b>	Différentes stratégies d'identification de gène causant une maladie.....	36
<b>Figure 11</b>	Les différentes étapes du clonage positionnel.....	37
<b>Figure 12</b>	The large French-Canadian family with ataxia and erythrokeratoderma maps to chromosome 6p12.3-q16.1.....	60
<b>Figure 13</b>	Clinical phenotype of the French-Canadian family.....	61
<b>Figure 14</b>	The BRE-01 family of Italian origin maps to chromosome 6q13-q16.1.....	62
<b>Figure 15</b>	Additional European families map to the SCA34 locus.....	63
<b>Figure 16</b>	Combined multipoint LOD score analyses of the SCA34 locus.....	64

<b>Figure 17</b>	Genome-wide linkage analysis of the French-Canadian family reveals three chromosomal regions with LOD score superior to 1.5.....	65
<b>Figure 18</b>	Gènes se trouvant dans l'intervalle 6q15.....	74

## Liste de sigles et d'abréviations

ADCA : autosomal dominant cerebellar ataxia

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

CEDNIK : Cerebral Dysgenesis Neuroathy Ichthyosis Palmoplantar Keratodermia

CF : canadienne-française

CHUM : Centre hospitalier de l'Université de Montréal

CNV : copie number variation

CRCHUM : Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal

cM : centimorgan

DRPLA : Dentatorubral-pallidoluysian atrophy

EK: Érythrokeratodermie

EKV: Érythrokérotodermie variabilis

EMG: électromyogramme – electromyography

FISH : fluorescent in situ hybridization

GJIC : communications cellulaires dans la communication intercellulaire

HD: Maladie d'Huntington

IRM : imagerie par résonance magnétique

LOD-score : logarithm of the odds

Mb: mégabase

MEDNIK : Mental retardation, enteropathy, deafness, peripheral neuroathy, ichthyosis and keratodermia

MRI : magnetic resonance imaging

NCBI : National Center for Biotechnology Information

Pb: paire de bases

PCR : polymerase chain reaction ou réaction en chaîne de la polymérase

RE : réticulum endoplasmique

SCA : Spinocerebellar ataxia

SBMA : Spinal Bulbar Muscular Atrophy

SNC : système nerveux central

UCSC : University of California Santa Cru

UPS : système protéasome ubiquitine-dépendant

VNC : variation du nombre de copies du gène

*À tous ceux qui ont cru en moi...*

## Remerciements

Je veux remercier mon directeur de recherche, le Dr Patrick Cossette de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir donné la chance de découvrir l'univers de la génétique humaine et de m'avoir fait confiance dans la réalisation de mon projet.

Je veux aussi spécialement dire merci à tous les membres de mon laboratoire, pour leur support scientifique et moral et les beaux moments partagés avec eux tout au long de ma maîtrise.

L'infirmière clinique, Michelin Gravel et le neurologue, le Dr Dang Nguyen, pour leur constante disponibilité à répondre à mes questions d'aspect clinique sur les patients.

Ce projet a été rendu possible grâce à la participation des familles, que je remercie infiniment. Je tiens à saluer les collaborateurs européens pour leurs conseils tout au long de la rédaction de mon article.

Un merci tout spécial à Simon Girard, Isabelle Bachand, Martine Tétrault et Maria Lisa Putorti de leurs appuis dans les moments difficiles et leur présence lors des bons. Isabelle Thiffault pour tout l'aide au cours de la rédaction de mon mémoire.

Je veux remercier mes grands-parents pour leur support tout au long de mes études, malgré mon parcours sinueux. Mon père pour m'avoir appris à toujours persévérer peu importe la situation. Ma mère, pour croire en moi, pour m'encourager et pour être tout simplement la meilleure source de motivation qu'une fille peut avoir.

Mes amis pour leur admiration envers moi d'avoir choisi ce domaine d'étude et leur manière de me faire réaliser que je ne faisais pas ces études pour rien lorsque je doutais de mes compétences.

Je ne pourrais terminer ces remerciements sans mentionner mon conjoint Alexandre Dallaire sans qui je n'aurais pas pu surmonter aussi bien cette période de ma vie. Merci mon amour d'avoir été si patient, si approuvant, si aimable et si présent. Je t'aime.

## Avant-propos

Le Dr André Barbeau a été neurologue à l'Hôtel-Dieu de Montréal et chercheur à l'Institut de recherche clinique de Montréal. Il a non seulement été un pionnier dans les études sur l'interaction entre la génétique et l'environnement, mais aussi dans l'étude des ataxies héréditaires chez les Canadiens Français. En 1972, il fit la première description d'une famille canadienne-française atteinte d'une ataxie spinocérébelleuse dominante associée à un trouble cutané. Avec la collaboration du dermatologue Jean-Mario Giroux, ils désignèrent ce nouveau désordre neurocutané par l'Érythrokratodermie avec ataxie (OMIM133190).

Le présent mémoire contient le manuscrit qui rapporte les résultats d'une recherche visant à identifier le gène responsable de cette forme d'ataxie, entrepris dans le cadre de mon projet de maîtrise. L'étude s'est déroulée dans le laboratoire du Dr Patrick Cossette au Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM). Le caractère unique de la grande famille canadienne-française a nécessité l'étude de familles européennes avec ataxie spinocérébelleuse inexplicée afin de maximiser la puissance de notre étude de liaison génétique. Le projet a été produit en collaboration avec des groupes de recherches européens impliquant les Drs Alexis Brice et Dr Alfredo Brusco. Le projet a nécessité l'implication de cliniciens neurologues ayant contribué à l'évaluation des patients, soit le Docteur Dang Nguyen pour la grande famille canadienne-française. Le projet a aussi nécessité l'implication d'infirmières cliniques dont Micheline Gravel et d'un dermatologue pour l'évaluation cutanée des patients à l'étude, soit le Docteur Christian Allen Drouin. Ce mémoire comprend un article qui a été soumis dans la revue *American Journal of Medical Genetics*. L'écriture de cet article, dont je suis la première auteure, constitue le fruit d'un travail accompli grâce à l'implication d'équipes de recherche multidisciplinaires afin d'identifier la cause de ce syndrome unique. La réalisation de cette étude m'a permis de compléter toutes les étapes impliquant la génétique soit l'extraction de l'ADN au laboratoire, la cartographie fin des familles à l'étude, le séquençage des gènes candidats, l'analyse des séquences, autres analyses connexes pertinentes en vue de l'identification de la mutation causale et enfin, l'écriture de cet article scientifique. Toutes ces étapes ont été faites sous la supervision de mon directeur de recherche, le Dr Patrick Cossette. Les analyses génétiques ont été réalisées en majeure partie par moi-même, avec la



contribution des assistantes de recherche du laboratoire du Dr Cossette, Josée Poirier et Caroline Meloche.

Le premier chapitre de ce mémoire est composé de l'état des connaissances concernant les différentes formes d'ataxies spinocérébelleuses dominantes, les troubles d'érythrokratodermies et autres maladies similaires ayant une composante neurologique, ainsi que les mécanismes moléculaires associés à ces deux groupes de maladies dont le gène a été identifié.

Le deuxième chapitre est composé de l'article qui a été soumis le 19 mars 2010 à la revue *American Journal of Medical Genetics (part A)*. Il relate l'identification du locus SCA34 chez quatre familles de descendance européenne, incluant la famille canadienne-française décrite par les Drs Giroux et Barbeau.

Le troisième chapitre est composé des résultats supplémentaires non inclus dans l'article et décrivant plus en détail le criblage des gènes candidats de la région SCA34. Le quatrième chapitre est composé d'une discussion sur les éléments apportés ultérieurement et les éventuelles perspectives d'avenir pour cette étude.

# Chapitre 1 - Introduction

## 1.1 État des connaissances sur les ataxies

Le mot ataxie provient du Grec *ataxiā*, ce qui signifie « désordre ». La maladie est caractérisée par un manque de coordination des mouvements volontaires en conséquence à une atteinte du système nerveux <sup>1</sup>.

La maladie peut se présenter de manière sporadique ou héréditaire par différents modes de transmission soit autosomique dominante, autosomique récessive, liée au chromosome X ou mitochondriale <sup>2</sup>. Afin d'en alléger le contenu, ce mémoire abordera plus précisément les formes à transmission autosomique dominante. Les ataxies héréditaires forment un groupe de maladies neurologiques caractérisées par une perte progressive de la coordination des mains, de la parole et des mouvements oculaires, accompagné par des troubles de la démarche, résultants d'une dégénérescence du cervelet. Dans certains cas, il est aussi possible d'observer une dégénérescence de la moelle épinière. De manière générale, l'ataxie cérébelleuse demeure jusqu'à ce jour, la forme la plus fréquente des ataxies <sup>1</sup>.

L'ataxie spinocérébelleuse autosomique dominante (SCA) est un groupe complexe de maladies neurodégénératives caractérisées par une ataxie cérébelleuse progressive de la démarche et des membres qui peut parfois être associée à une combinaison variable de troubles neurologiques incluant une ophtalmoplégie, des signes pyramidaux et extrapyramidaux, des signes d'atteinte corticale (convulsions, troubles cognitifs, démence), une rétinopathie pigmentaire et une neuropathie périphérique <sup>2,3</sup>. Actuellement, 28 loci sont reconnus pour les SCA et la cause génétique de 18 d'entre eux a été identifiée <sup>1,3-5</sup> (<http://neuromuscular.wustl.edu>). Il existe une certaine controverse à propos des loci situés sur le même chromosome à savoir s'il ne s'agit pas en fait d'un seul et même locus ou plutôt d'un variant allélique de la même maladie. C'est le cas de SCA16 et possiblement SCA29 qui s'avèrent être des variants alléliques de SCA15 situées sur le chromosome 3p24.2; de même que SCA19 et SCA22, situés sur le chromosome 1p21-q21 et qui semblent aussi être des variants alléliques de la même maladie <sup>1,4</sup>. La prévalence des ataxies héréditaires est d'environ 5-7 personnes pour 100 000 dans la

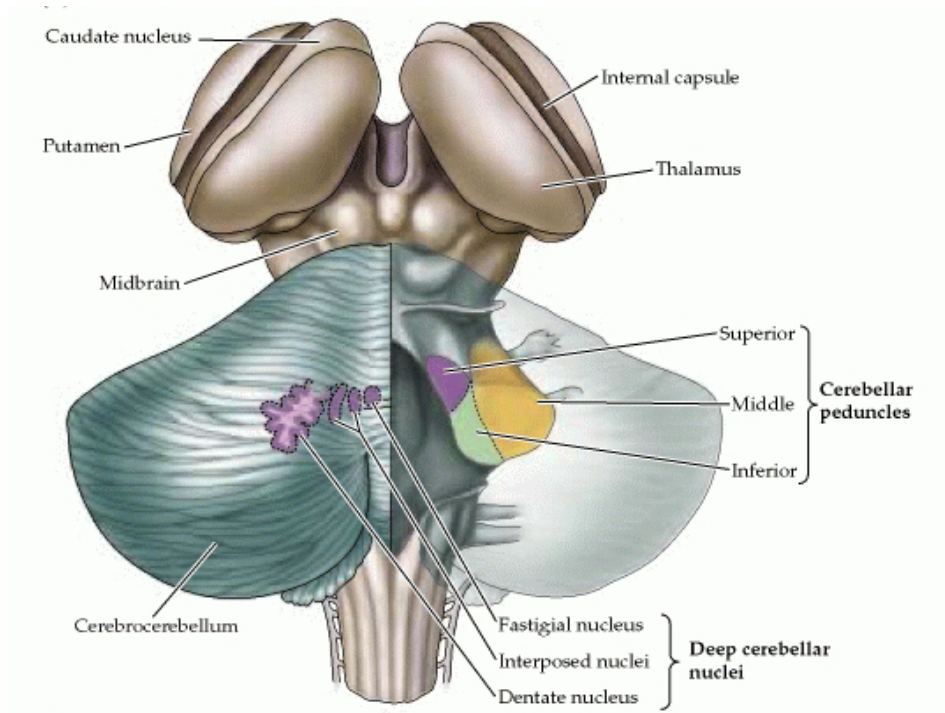
population générale <sup>6</sup>. Par contre, cette prévalence diffère d'une région à l'autre, en raison principalement d'effets fondateurs propres à certaines populations. À l'échelle mondiale les formes SCA1, 2, 3 et 6 sont les plus courantes.

## **1.2 Importance du cervelet dans la maladie**

Au niveau clinique, les manifestations varient d'une forme à l'autre, mais la caractéristique principale consiste en une dégénérescence du cervelet <sup>7</sup>. Le cervelet a pour rôle principal le contrôle de l'activité motrice. Plus précisément, il intervient dans le maintien de l'équilibre, du tonus musculaire et il coordonne les mouvements volontaires précis (e.g. tête et yeux) <sup>8</sup>. Le cervelet serait aussi impliqué dans le langage et d'autres fonctions cognitives <sup>9, 10</sup>. La prochaine section de ce mémoire révisera de façon plus détaillée l'anatomie et la fonction de cette région du cerveau impliquée dans les ataxies.

### **1.2.1 Morphologie du cervelet**

Le cervelet correspond à moins de 10% du volume total du cerveau, mais contient près de la moitié des neurones cérébraux. Le cervelet est composé de trois différentes régions: un manteau de matière grise (le cortex cérébelleux), une zone interne de matière blanche et trois paires de noyaux; le noyau fastigial, les noyaux interposés (globuleux et emboliforme) et le noyau dentelé (Figure 1) <sup>9</sup>.



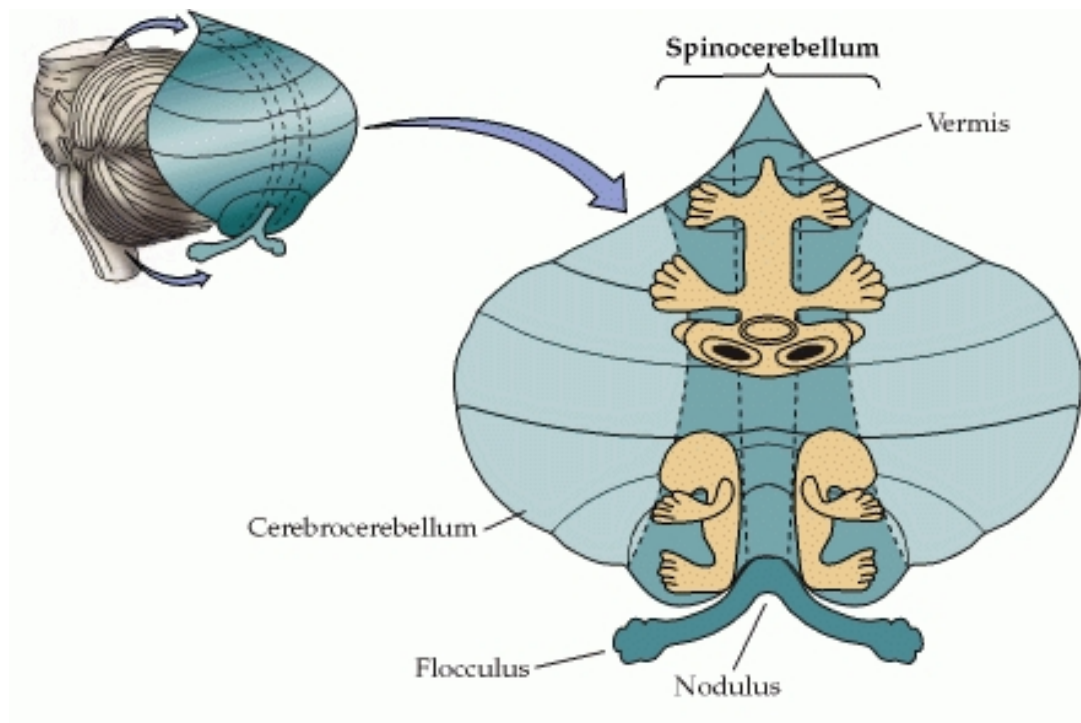
**Figure 1.** L'organisation générale du cervelet  
(Source : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>)

Le cervelet se divise en trois grandes parties, soit le vestibulocervelet (archécervelet), le spinocerevet et le cérébrocervet (néocervelet). L'atteinte à chacune de ces trois régions résulte en des syndromes cliniques spécifiques, mais la plupart des maladies du cervelet impliquent plus d'une région du cervelet, provoquant en fin de compte, un dysfonctionnement cérébelleux général <sup>11</sup>.

Le vestibulocervelet est la partie la plus ancienne au niveau de l'évolution et se compose du lobe flocculonodulaire qui reçoit des afférences vestibulaires et qui projette vers les noyaux vestibulaires latéraux. Il a pour rôle le contrôle de l'équilibre et du mouvement des yeux. Une atteinte au niveau de cette structure provoque entre autres des pertes d'équilibre et du contrôle axial ainsi qu'une diminution des réflexes vestibulaires avec oscillations involontaires et saccadées du globe oculaire (nyctagmus) <sup>11</sup>.

Les cas d'ataxies spinocérébelleuses sont généralement causés par une dysfonction du spinocerevet, la partie du cortex cérébelleux qui reçoit l'entrée somatosensorielle de la moelle épinière <sup>1</sup>. Le spinocerevet est composé du vermis et de la partie intermédiaire des deux hémisphères cérébelleux (Figure 2). Le vermis reçoit les informations visuelles,

auditives et vestibulaires ainsi que des informations somatosensorielles de la tête et des parties proximales du corps, afin de contrôler la posture, la démarche et le regard. Il projette en passant par le noyau fastigial à des régions corticales et du tronc cérébral qui donnent naissance aux systèmes médiaux descendants qui contrôlent les muscles axiaux et proximaux des membres<sup>9</sup>.

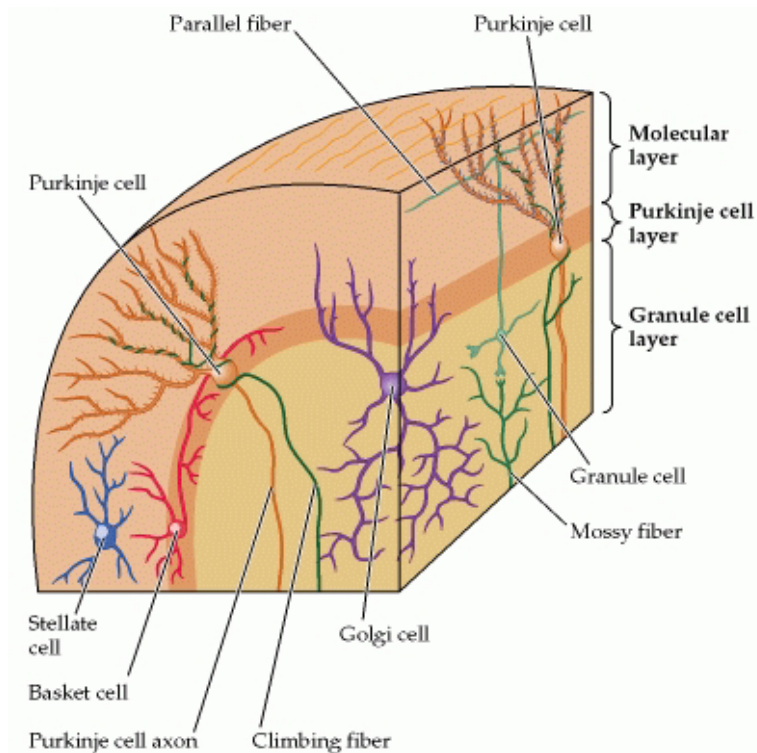


**Figure 2.** Les cartes somatotopiques de la surface du corps dans le cervelet.  
(Source : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>)

Le cérébrocervelet est formé des portions latérales des hémisphères et reçoit ses afférences du cortex cérébral (Figure 2). Partant du noyau dentelé, ses projections projettent vers le cortex moteur, prémoteur et préfrontal. Il est impliqué dans la planification du mouvement et l'évaluation des informations sensorielles au cours d'une action. Il serait tout aussi également impliqué au niveau cognitif dans le traitement de l'information sensitive lors de tâches motrices complexes<sup>9</sup>.

## 1.2.2 Organisation cellulaire

Le cervelet ou cortex cérébelleux est une structure à trois couches composées de cinq types de neurones (Figure 3). En partant de l'intérieur vers l'extérieur, la couche interne est la couche granulaire où on y retrouve les cellules excitatrices granulaires et quelques inter neurones de Golgi. La couche intermédiaire contient les corps des cellules de Purkinje inhibitrices GABAnergiques. La couche la plus externe est la couche moléculaire où l'on retrouve les corps cellulaires de deux types d'inter neurones inhibiteurs: les cellules en panier (*baskets*) et les cellules en étoile (*stellates*). On observe aussi dans cette couche les fibres parallèles qui correspondent aux axones excitateurs des cellules granulaires et les dendrites inhibitrices des cellules de Purkinje.



**Figure 3.** Types de neurones présents dans le cortex cérébelleux  
(Source : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>)

Le cervelet reçoit deux types d'afférences : les fibres moussues et les fibres grimpantes. Les fibres moussues proviennent des noyaux de la moelle épinière et du tronc cérébral et transportent l'information sensorielle de la périphérie et du cortex cérébral. Leurs terminaisons synaptiques excitent les dendrites des cellules granulaires. À leur tour, les

cellules granulaires projettent sur de longues distances pour aller exciter les cellules de Purkinje. Les fibres grimpantes proviennent du noyau de l'olive inférieur et transportent l'information visuelle, somatosensorielle et corticale. Alors que les cellules de Purkinje reçoivent des entrées de plus d'un million de cellules granulaires, elles ne reçoivent qu'une seule synapse des fibres grimpantes. L'activité des cellules de Purkinje peut être inhibée par les cellules en étoile, les cellules en panier et les inter neurones Golgi<sup>9</sup>.

### **1.2.3 Les maladies causées par une anomalie du cervelet.**

Les signes neurologiques causés par une lésion du cervelet sont divisés en trois catégories : 1) une *hypotonie* qui se décrit par une diminution de la résistance pour les mouvements passifs associés à des réflexes pendulaires ; 2) une anomalie dans l'exécution des mouvements volontaires caractérisée par une soit par une perte de coordination des membres (ataxie appendiculaire) et/ou des troubles d'équilibre qui se manifeste à la marche ou la posture debout (ataxie tronculaire)<sup>9</sup>; 3) un tremblement intentionnel qui est plus marqué vers la fin d'un mouvement, lorsque l'individu tente d'arrêter celui-ci en utilisant des muscles antagonistes. L'ataxie résulte d'une dégénérescence variable des neurones dans le cortex cérébelleux, le tronc cérébral, les voies spinocérébelleuses et leurs connexions afférentes/efférentes<sup>6</sup>. La localisation des dommages au niveau du cervelet peut être identifiée grâce à une connaissance de l'organisation somatotopique du spinocerevet. Par exemple, les lésions du vermis et des noyaux fastigiaux produisent principalement des difficultés dans le contrôle des muscles axiaux et du tronc (Figure 2)<sup>9</sup>, alors qu'une atteinte des hémisphères cérébelleux est plutôt associée à une incoordination des membres.

## 1.3 Présentation clinique des ataxies dominantes

Les ataxies héréditaires à transmission autosomique dominante sont caractérisées par une dégénérescence variable du cervelet, du tronc cérébral, de la moelle épinière, et plus rarement des noyaux gris centraux et du cortex cérébral <sup>12</sup>. La dégénérescence du cervelet et autres structures cérébrales donnent lieu à des manifestations cliniques très variées. Le tableau suivant expose l'hétérogénéité clinique et neuropathologique propre à chaque SCA <sup>6, 13</sup>.



**Tableau I.** Description clinique et neuropathologique des différentes formes d'ataxies dominantes.

<b>MALADIE</b>	<b>ÂGE D'APPARITION MOYEN</b>	<b>CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES</b>	<b>NEUROPATHOLOGIE / MRI</b>
<b>SCA1</b>	4e décennie (<10 à > 60)	Ataxie, signes pyramidaux, neuropathie, dysphagie, syndrome des jambes sans repos	Perte de cellules de Purkinje, les neurones du noyau dentelé, gliose de Bergma, perte variable de cellules granulaires, atrophie des pédoncules cérébelleux moyens, perte de neurones du mésencéphale en 3e et 4e nerfs crâniens. Inclusions intranucléaires
<b>SCA2</b>	4e décennie (<10 à > 60)	Ataxie, saccades lentes, neuropathie périphérique, démence, syndrome des jambes sans repos, dysphagie	Atrophie du cervelet, protubérance, lobe frontal, bulbe rachidien, des nerfs crâniens, la substance noire. Perte de cellules de Purkinje et cellules granulaires. Inclusions cytoplasmiques
<b>SCA3 (MJD)</b>	4e décennie (10-70)	Ataxie, signes pyramidaux et extrapyramidaux, ophtalmoplégie, nystagmus, neuropathie, dystonie, syndrome des jambes sans repos	Le cervelet est relativement épargné, la moelle épinière montre une perte des fibres myélinisées dans les voies spinocérébelleuse et du funicule postérieur. La perte des neurones et gliose de la substance noire ainsi que les noyaux des nerfs crâniens et vestibulaires, la colonne de Clarke et de la corne antérieure. Inclusions intranucléaires.
<b>SCA4</b>	4 à 7 décennie (19-72)	Ataxie, une neuropathie sensorielle, surdité	Atrophie cérébelleuse
<b>SCA5</b>	3e - 4 <sup>e</sup> décennie	Ataxie cérébelleuse pure	Atrophie du vermis et des hémisphères cérébelleux
<b>SCA6</b>	5e - 6e décennie	Ataxie cérébelleuse pure progressive, dysarthrie, nystagmus.	Perte de cellules de Purkinje et des neurones de l'olive inférieure
<b>SCA7</b>	3e - 4e décennie	Ataxie, ophtalmoplégie, baisse d'acuité visuelle, rétinopathie	Atrophie olivopontocérébelleuse et amincissement de la moelle épinière. Dégénérescence rétinienne. Inclusions intranucléaires
<b>SCA8</b>	39 ans	Ataxie, neuropathie sensorielle, spasticité, symptômes neuropsychiatriques (troubles de l'exécutif, la dépression), myoclonie, migraine	Atrophie cérébelleuse et pontique

<b>MALADIE</b>	<b>ÂGE D'APPARITION MOYEN</b>	<b>CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES</b>	<b>NEUROPATHOLOGIE / MRI</b>
<b>SCA9</b>	Adulte	Ataxie, symptômes pyramidaux et extrapyramidaux	Atrophie cérébelleuse
<b>SCA10</b>	36 ans	Ataxie, épilepsie, troubles cognitifs	Atrophie cérébelleuse
<b>SCA11</b>	30 ans (15-70)	Ataxie cérébelleuse pure	Atrophie cérébelleuse. Protéine tau hyperphosphorylée
<b>SCA12</b>	4e décennie	Ataxie, tremblements parkinsoniens, troubles cognitifs ou psychiatriques, démence	Atrophie du cortex cérébral, dilatation des ventricules, perte des cellules de Purkinje, atrophie cérébelleuse et pontique. Inclusions intranucléaires
<b>SCA13</b>	Enfance	Ataxie, retard mental	Atrophie du cervelet et protubérance
<b>SCA14</b>	28 ans (12-42)	Ataxie, myoclonie, dystonie, perte sensorielle	Atrophie cérébelleuse
<b>SCA16-15</b>	39 ans (20-66)	Ataxie cérébelleuse pure	Atrophie du vermis cérébelleux
<b>SCA17</b>	6-34 ans	Ataxie, dystonie, chorée, démence, troubles psychiatriques, myoclonies, épilepsie	Perte neuronale du cortex cérébral, des neurones du striatum et des cellules de Purkinje
<b>SCA18</b>	2e- 3e décennies	Ataxie, une neuropathie sensorielle, une atrophie musculaire neurogène; neuropathie sensori-motrice avec ataxie (SMNA).	
<b>SCA19-22</b>	34 ans (20-45)	Ataxie, myoclonies, troubles cognitifs	
<b>SCA20</b>	46 ans (19-64)	Ataxie, dysphonie, dysarthrie, bradykinésie	Atrophie pancérébelleuse avec calcification dentée, pseudo hypertrophie olivaire
<b>SCA21</b>	6-30 ans	Ataxie, parkinsonisme	Atrophie cérébelleuse isolée

<b>MALADIE</b>	<b>ÂGE D'APPARITION MOYEN</b>	<b>CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES</b>	<b>NEUROPATHOLOGIE / MRI</b>
<b>SCA23</b>	5e - 6es décennies	Ataxie, neuropathie sensorielle, signes pyramidaux, dysarthrie	Atrophie, du vermis cérébelleux, protubérance, de la moelle épinière et frontotemporale. Perte neuronale dans le vermis cérébelleux, noyaux dentelés et olives inférieures. Amincissement des voies ponto-cérébelleux et démyélinisation des cordons postérieurs et latéraux de la moelle épinière. Inclusions intranucléaires dans les neurones nigraux
<b>SCA25</b>	1.5-39 ans	Ataxie, neuropathie sensorielle	Atrophie cérébelleuse
<b>SCA26</b>	26-60 ans	Ataxie cérébelleuse pure, dysarthrie	Atrophie cérébelleuse
<b>SCA27</b>	11 ans (7-20)	Ataxie, tremblements, retard mental	Atrophie cérébelleuse modérée
<b>SCA28</b>	19.5 ans (12-36)	Ataxie, signes pyramidaux, nystagmus	Atrophie cérébelleuse
<b>DRPLA</b>	4e-6 <sup>e</sup> décennies	Chorée, convulsions, démence, myoclonies	Atrophie et perte des neurones dans le globus pallidus, le noyau dentelé, le tronc cérébral, le cervelet et la substance blanche cérébrale. Dépôts de lipofuscine
<b>SCA30</b>	Milieu à la fin de vie	Syndrome cérébelleux pur	Atrophie cérébelleuse
<b>SCA31</b>	6e décennie (45 – 72)	Ataxie à la marche, dysarthrie cérébelleuse, ataxie des membres, une diminution du tonus musculaire et nystagmus horizontal	Atrophie cérébelleuse, dégénérescence des cellules de Purkinje, dendrites anormales. Inclusions intranucléaires

Adapté de <sup>6, 13</sup>

Cette grande hétérogénéité clinique a nécessité l'implantation d'une classification afin de mieux classifier les différents types d'ataxie. Une classification en trois groupes a été proposée en 1984 par A. Harding en fonction des signes cliniques associés à l'ataxie cérébelleuse <sup>14</sup>.

### **1.3.1 Ataxie dominante de type I (ACDA type I)**

Outre le syndrome cérébelleux principal, les patients présentent des troubles supplémentaires qui deviennent plus proéminents avec la progression de la maladie, incluant l'ophtalmoplégie supranucléaire, des saccades oculaires lentes, une atrophie optique, des signes extrapyramidaux, une augmentation ou diminution des réflexes tendineux, ainsi qu'une perte sensorielle, des troubles cognitifs, de la démence et de l'amyotrophie (<http://neuromuscular.wustl.edu>)<sup>15</sup>. Le groupe des ataxies cérébelleuses autosomiques dominantes (ADCA) de type I est le plus hétérogène, comprenant SCA1, SCA2, SCA3, SCA4, SCA8, SCA12, SCA13, SCA18-25, SCA27-29, et l'atrophie dentatorubral-pallidoluysienne (DRPLA) <sup>16</sup>.

### **1.3.2 Ataxie dominante de type II (ACDA type II)**

En plus du syndrome cérébelleux, les principaux signes cliniques se manifestent par une dégénérescence maculaire progressive qui conduit à la cécité, une dégénérescence pigmentaire de la rétine, de l'ophtalmoplégie et/ou syndrome extrapyramidal. Il existe un seul locus pour ce type d'ataxie, soit SCA7, dont la présentation génétiquement semble homogène.

### **1.3.3 Ataxie dominante de type III (ACDA type III)**

Dans ce type d'ataxie, les manifestations cliniques sont relativement bénignes particulièrement avec une atteinte du cervelet et parfois des signes pyramidaux, mais sans démence, trouble oculaire, ou syndromes extrapyramidaux <sup>15</sup>. Il comprend neuf loci soit SCA5; SCA6; SCA10; SCA11; SCA14; SCA15; SCA22; SCA26; SCA30.

## **1.4 Mécanismes moléculaires responsables des ataxies dominantes**

Il y a 28 loci déjà connus pour les SCA et des mutations dans 18 gènes ont été associées à la maladie. Les mutations trouvées sont diverses : expansion de répétitions de type trinuécléotide (SCA1-3, 6-8, 12, 17, DRPLA) ou de pentanucléotide (SCA10), de délétions/ duplications génomiques (SCA15, SCA20), de mutations ponctuelles (SCA5, 11, 13, 14, 27, et 28) ou, d'une insertion d'un pentanucléotide (TGGAA; SCA31). La fréquence des mutations dans les gènes SCA varie dans les différentes populations, toutefois, environ 50% des familles SCA restent à ce jour inexplicées. Le tableau suivant récapitule l'ensemble des loci et gènes découverts pour les ataxies familiales dominantes.

**Tableau II.** Localisation chromosomique et gènes impliqués dans les ataxies spinocérébelleuses

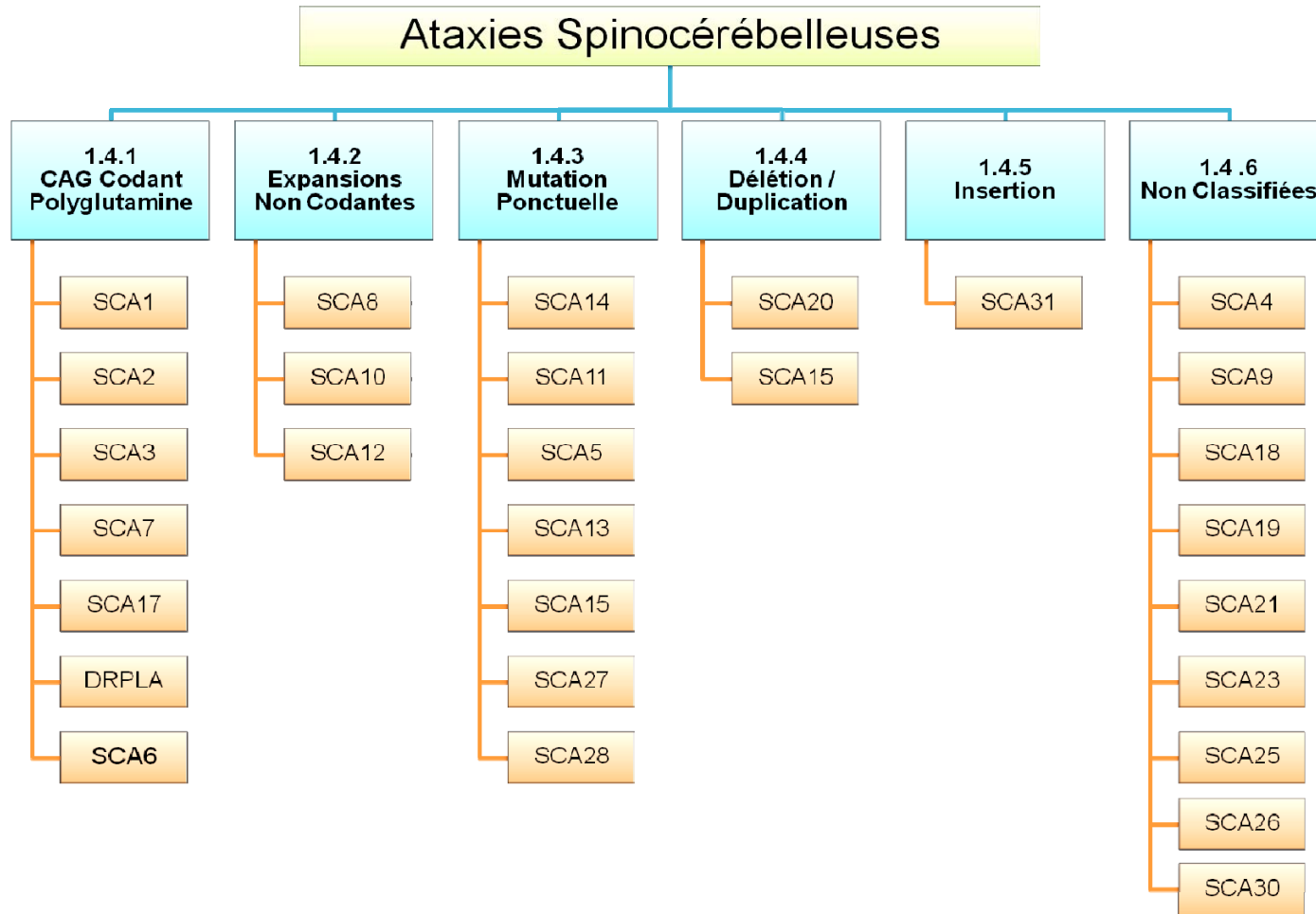
<i>Type de SCA</i>	<i>Localisation génomique</i>	<i>#OMIM</i>	<i>Gène/Locus</i>	<i>Protéine</i>	<i>Fonction du gène</i>	<i>Mutation</i>	<i>Références</i>
SCA1	6p22.3	164400	ATXN1	Ataxin 1	Régulation de la transcription	Répétition de CAG	17
SCA2	12q24.13	183090	ATXN2	Ataxin 2		Répétition de CAG	18-20
SCA3	14q32.12	109150	ATXN3	Ataxin 3	De-ubiquitination, régulation de la transcription	Répétition de CAG	21
SCA4	16q24-qter	600223	SCA4	---		---	22
SCA5	11q13.2	600224	SPTBN2	Beta-III spectrin	Squelette membrane neuronale	Mutation ponctuelle	23, 24
SCA6	19p13.13	183086	CACNA1A	CACNA1A	Ca <sup>2+</sup> + signalisation/homéostasie	Répétition de CAG	25
SCA7	3p14.1	164500	ATXN7	Ataxin 7	Régulation de la transcription	Répétition de CAG	26
SCA8	13q21	608768	KLHL1AS	Kelch-like 1		Répétition de CTG 3'UTR	27
SCA9	Réservé	612876	---	---		---	
SCA10	22q13.31	603516	ATXN10	Ataxin 10	Neuritogénèse	Répétition d'un ATTCT	28
SCA11	15q14-q21.3	604432	TTBK2	Tau tubulin kinase-2	Tau phosphorylation	Mutation ponctuelle	29, 30
SCA12	5q32	604326	PPP2R2B	PPP2R2B	Régulation de l'activité PP2 5'-UTR (CAG) n, régulation de la transcription	Répétition de CAG 5'UTR	31
SCA13	19q13.33	605259	KCNC3	KCNC3	K + signalisation	Mutation ponctuelle	32

<b>Type de SCA</b>	<b>Localisation génomique</b>	<b>#OMIM</b>	<b>Gène/Locus</b>	<b>Protéine</b>	<b>Fonction du gène</b>	<b>Mutation</b>	<b>Références</b>
SCA14	19q13.42	605361	PRKCG	PRKCG	Phosphorylation	Mutation ponctuelle	33
SCA15, 16	3p24.2-pter	606658	ITPR1	ITPR1		Délétion hétérozygote 200–340 kb; Mutation ponctuelle	34, 35
SCA17	6p27	607136	TBP	TBP	Complexe transcriptionnel (TFIID)	Répétition de CAG	36
SCA18	7q31-q32	607458	---	---		---	37, 38
SCA19, 22	1p21-q21	607346	---	---		---	39, 40
SCA20	11q12.2-11q12.3	608687	SCA20			260-kb duplication	41, 42
SCA21	7p21.3-p15.1	607454	---	---		---	43
SCA23	20p13-p12.1	610245	---	---		---	44
SCA25	2p21-q15	608703	---	---		---	45, 46
SCA26	19q13.3	609306	---	---		---	47
SCA27	13q34	609307	FGF14	FGF14	Transduction du signal, le règlement des canaux de navigation, l'excitabilité des cellules de Purkinje	Mutation ponctuelle	48
SCA28	18p11.22-q11.2	610246	AFG3L2	AFG3 ATPase family	ATPase	Mutation ponctuelle	49-51
SCA30	4q34.3-q35.1	---	---	---		---	4

<i>Type de SCA</i>	<i>Localisation génomique</i>	<i>#OMIM</i>	<i>Gène/Locus</i>	<i>Protéine</i>	<i>Fonction du gène</i>	<i>Mutation</i>	<i>Références</i>
DRPLA	12p13.31	125370	ATN1	Atrophin 1	Co-répresseur récepteur nucléaire	Répétition de CAG	52-54
SCA31	16q22.1	117210	SCA31	---		Insertion (TGGAA) <sub>n</sub>	54
SCA34	6q13-q16.1	---	SCA34	---	---	---	



En 2003, une nouvelle classification a vu le jour. Elle se base plus précisément sur le gène et la nature des mutations responsables de la maladie. Cette classification, basée sur les aspects moléculaires, pourrait avoir des implications pour les tests de diagnostic, d'analyse de la pathogenèse voire même des implications en vue de stratégies thérapeutiques <sup>55</sup>. Bien que cette classification remplace désormais celle de Harding, cette dernière demeure utile à des fins cliniques <sup>13</sup>. Cette classification distingue l'ensemble des ataxies cérébelleuses à transmission autosomique dominante en cinq groupes distincts soit : 1) les ataxies spinocérébelleuses dues à une anomalie par les polyglutamines; 2) les ataxies spinocérébelleuses dues à des expansions non codantes pour la polyglutamine; 3) les ataxies dues à une canalopathie; 4) les ataxies spinocérébelleuses dues à une mutation ponctuelle et 5) les ataxies spinocérébelleuses non classifiées. Depuis les sept dernières années, davantage de loci et de mutations associées à des loci déjà connus ont été identifiés. Parmi les nouvelles mutations, certaines ne font pas partie des groupes précédemment identifiés. La figure suivante propose donc une mise à jour de la classification moléculaire des SCAs.



**Figure 4.** Classification des ataxies spinocérébelleuses en fonction de leur mécanisme moléculaire.

### 1.4.1 Expansion causée par une anomalie des polyglutamines

Ce groupe fait partie des maladies à expansion de séquences répétées dans le génome. Une expansion dans des séquences répétées de polyglutamines (polyQ) dans des gènes spécifiques semble être le mécanisme le plus commun à la base de SCAs. Jusqu'ici, huit SCAs (1, 2, 3, 6, 7, 17, et DRPLA) sont causées par des régions répétées de polyQ anormalement longues dans les protéines<sup>17, 18, 21, 25, 26, 36, 52</sup>. Ces SCAs font partie d'un groupe de neuf maladies associées à une expansion de trinuécléotides CAG ou polyglutaminopathies comprenant aussi la maladie d'Huntington (HD) (Tableau III). La caractéristique commune des polyglutaminopathies est la neurodégénérescence progressive des sous-ensembles de neurones dans des zones distinctes du cerveau et la formation d'agrégats de protéines contenant le fragment polyQ, qui se manifestent par la présence d'inclusions nucléaires ou cytoplasmiques (Tableau 2)<sup>6</sup>.

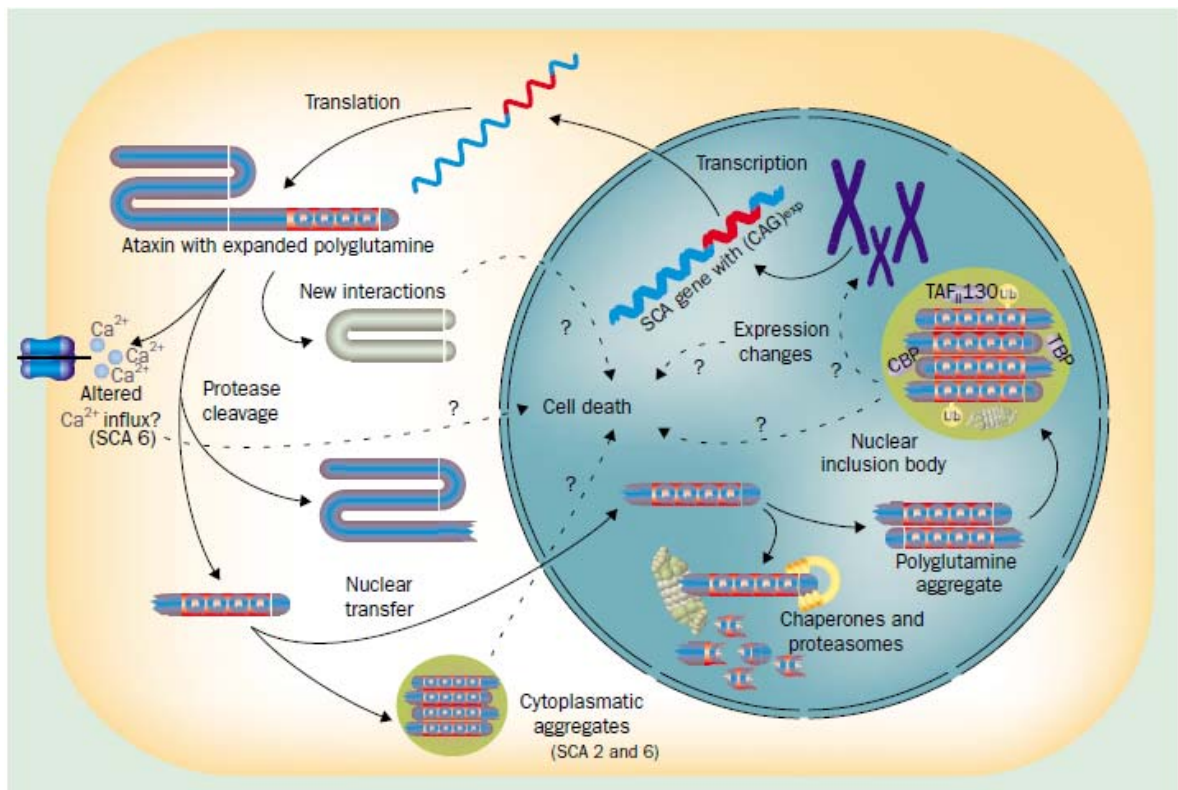
**Tableau III.** Localisation chromosomique et gènes impliqués dans les polyglutaminopathie

Maladie	Locus	Protéine	Taille de l'expansion polyQ	
			Normal	Pathologique
<b>SBMA</b>	Xq11-q12	Récepteur androgène	6–36	38–62
<b>DRPLA</b>	12p13	Atrophin-1	3–38	49–88
<b>HD</b>	4p16.3	Huntingtin	6–35	36–121
<b>SCA1</b>	6p23	Ataxin-1	6–39	41–83
<b>SCA2</b>	12q24	Ataxin-2	14–32	34–77
<b>SCA3</b>	14q24-q31	Ataxin-3	12–40	62–86
<b>SCA6</b>	19p13	CACNA1A	4–18	21–30
<b>SCA7</b>	3p21-p12	Ataxin-7	7–18	38–200
<b>SCA17</b>	6q27	TATA-binding protein	25–43	45–63

Adapté de Bauer et Nukina 2009<sup>56</sup>

Comme la majorité des maladies à expansion de polyglutamine, l'âge d'apparition et la sévérité de la maladie sont inversement proportionnel avec le nombre d'expansions, phénomène que l'on nomme anticipation. La présence de ces séquences répétées de CAG se retrouve dans le génome humain sans pour autant être pathogène. Dans la

population normale, la longueur de la répétition est polymorphe et c'est seulement lorsqu'un certain seuil est dépassé que la pathologie se manifeste. Dans le gène normal, le nombre de répétitions de CAG s'étend en moyenne de 6 à 35 fois, tandis que les gènes mutés ont des expansions bien au-delà de leur taille normale, allant de 40 à plus de 100 répétitions de triplet CAG <sup>6</sup>. Il existe une corrélation entre le nombre de répétitions de CAG, l'âge d'apparition et la gravité des symptômes, mais en raison d'une variation interindividuelle qui est aussi présente, il est impossible de prédire de manière exacte l'âge de début de la maladie <sup>7</sup>. Au niveau moléculaire, il a été présumé que les mécanismes toxiques communs de ces gènes seraient le résultat d'un gain de fonction de la protéine polyglutamine. Le lien entre les agrégats et la neurotoxicité n'est cependant pas encore clairement défini. Des études sur des modèles cellulaires et de souris pour SCA1 et HD ont démontré que les agrégats ne sont pas en soi nécessaires pour la toxicité cellulaire <sup>55</sup>. La figure suivante illustre les possibles conséquences moléculaires de cette protéine contenant une expansion anormale de polyglutamine.



**Figure 5.** Schéma des différentes conséquences au niveau cellulaire lors d'une expansion à polyglutamine. (Tiré de Schöls *et al.* 2004 <sup>12</sup>)

Toute cette cascade d'évènements débute lorsque la séquence répétée de CAG dans la région codante est transcrite et traduite en longue chaîne de polyglutamine (PolyQ) hors du noyau. La présence d'une longue chaîne de PolyQ induit une conformation anormale de la protéine, qui peut être en partie minimisée par l'action des chaperonnes moléculaires. De telles protéines mal conformées risquent de subir un clivage protéolytique par les caspases et les fragments polyQ qui en découlent seront ubiquitinés (Ub) et dégradés via le système protéasome ubiquitine-dépendant (UPS)<sup>6, 57, 58</sup>. Les fragments polyQ non-ubiquitinés pourraient former des agrégats dans le cytoplasme et ainsi déclencher une chaîne de médiateurs mitochondriaux pro-apoptotiques comme il est observé pour les formes SCA2 et SCA6. L'échec du système d'UPS pourrait mener à l'accumulation anormale d'une série de protéines toxiques, menant finalement au dysfonctionnement et/ou à la mort neuronale. De plus, l'expansion pourrait provoquer un changement d'homéostasie de calcium comme il est observé pour SCA6 qui résulte d'une expansion de CAG dans le gène *CACNA1A*<sup>25, 59</sup>. Finalement, l'expansion pourrait causer un déséquilibre de la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie<sup>60</sup> et une activation directe des voies apoptotiques<sup>61</sup>.

#### **1.4.1.1 Mutations dans les canaux ioniques**

L'ataxie spinocérébelleuse de type 6 (SCA6) est aussi incluse dans la grande catégorie des canalopathies. Les canalopathies sont des maladies causées par des mutations dans des canaux ioniques. Plusieurs mutations ont été identifiées dans la plupart des types de canaux ioniques et elles peuvent représenter soit un gain anormal de fonction (e.g. épilepsie, myokymie, et myotonie) ou une perte de fonction (e.g. faiblesse des membres)<sup>62</sup> de la protéine. Plus précisément, les canalopathies impliquant les neurones causent notamment la migraine hémiplégique familiale, les ataxies épisodiques 1 et 2, l'ataxie spinocérébelleuse de type 6, une épilepsie du lobe frontal ou des convulsions bénignes néonatales familiales<sup>55, 62</sup>.

## 1.4.2 Régulation de l'expression du gène par une expansion dans une région non codante

Cette section comprend les gènes dont la mutation résulte de l'expansion d'une séquence répétée dans une région non codante d'un gène. Outre SCA8, SCA10 et SCA12, ce groupe renferme la dystrophie myotonique de type 1 et 2 (DM1 et DM2) et la maladie de Huntington-like de type 2 (HDL2)<sup>3, 27, 28, 31, 63</sup>. Il semblerait qu'il ne s'agit plus d'un changement au niveau de la protéine, mais au niveau de l'expression et c'est la neurotoxicité de l'ARN qui serait impliqué dans la pathologie de ces SCAs<sup>3, 64</sup>.

La forme SCA8 résulte d'une expansion de répétitions CTG dans la région 3'UTR du gène *Ataxin-8*. L'expansion de l'allèle mutant n'est pas traduite en polyglutamine en raison de sa localisation, mais la répétition CTG dans le brin complémentaire fait partie du transcrit non traduit de l'ARNm. Cependant, il y a chevauchement entre la région 3'UTR du gène *Ataxin-8* et l'extrémité 5'UTR du gène *KLHL1* (Kelch-like 1), codant pour une protéine de liaison à l'actine. L'expansion de la répétition CTG semble perturber la régulation de la transcription de ce gène qui est transcrite dans la direction opposée de l'*Ataxin-8*<sup>65, 66</sup>. Il s'agirait ainsi d'un phénomène de gain de fonction.

La forme SCA12 est associée à une expansion d'une répétition de CAG dans la région 5'UTR du gène *PPP2R2B*, qui code pour une sous-unité spécifique du cerveau régulateur de la protéine phosphatase PP2A<sup>31</sup>. PP2A est une protéine sérine / thréonine phosphatase qui est impliquée dans la régulation de plusieurs processus cellulaires incluant la phosphorylation des protéines, particulièrement la croissance et la différenciation cellulaire. PP2A est aussi impliquée dans la réplication de l'ADN, la morphogénèse cellulaire et la cytokinèse. Enfin, elle joue le rôle de canal ionique et a pour fonctions, la libération des neurotransmetteurs, l'assemblage des microtubules et l'apoptose. Il s'agit d'une protéine essentielle dans le fonctionnement cellulaire et elle est une des plus hautement conservées au point de vue de l'évolution<sup>67</sup>. Au niveau de l'expression, *PPP2R2B* est spécifiquement exprimé dans le cerveau, dans les neurones et les cellules de Purkinje du cortex cérébelleux. L'expansion de CAG dans le gène *PPP2R2B* chez les patients atteints de SCA12 semble perturber la région promotrice du gène ce qui provoquerait un effet toxique au niveau de l'ARN<sup>67</sup>.

Jusqu'à maintenant, les SCAs abordées sont causées par des répétitions de trinuécléotides. Il en est autrement pour SCA10 qui demeure la seule maladie de l'homme connu pour être causée par une expansion intronique d'une répétition d'un pentanucléotide (ATTCT) dans le gène *ATXN10*. La fonction de la protéine produite et le mécanisme pathogène qui cause SCA10 sont encore inconnus à ce jour<sup>66</sup>.

### 1.4.3 Mutations ponctuelles

Le gène  $\beta$ -III spectrine (*SPTBN2*) muté cause la forme SCA5<sup>24</sup>. Trois différentes mutations ont été découvertes à ce jour. Deux d'entre elles sont des délétions dans un domaine spectrine, soit une délétion de 39 pb dans l'exon 12 qui provoque une suppression de 13 acides aminés, retrouvés dans une famille américaine et une courte délétion de 15pb de l'exon 14 dans une famille française<sup>24</sup>. Une mutation ponctuelle a aussi été retrouvée dans une famille allemande, soit une transition d'un T pour un C dans l'exon 7 qui provoque un changement d'acide aminé (L253P) qui correspond au domaine d'homologie à la calponine contenant site de liaison à l'actine/ARP1. Il a été découvert que ce gène code pour une protéine qui s'associe à l'appareil de Golgi, aux vésicules membranaires<sup>68</sup> et se lie à la sous-unité de dynactine d'ARP1<sup>69</sup>, suggérant un rôle possible dans le transport et la stabilisation des protéines membranaires. Particulièrement,  $\beta$ -III spectrine est fortement exprimé dans les cellules de Purkinje et stabilise le transporteur du glutamate EAAT4 à la surface de la membrane plasmique<sup>24</sup>.

Deux mutations hétérozygotes ont été identifiées dans le gène *KCNC3* chez les membres d'une famille des Philippines (R420H) et une famille française (F448L) causant SCA13<sup>32</sup>. Ce gène fait partie de la famille des canaux potassium voltage-dépendant, des canaux transmembranaires spécifiques pour le potassium qui sont sensibles aux variations de tension du potentiel de membrane de la cellule. Ils jouent un rôle crucial lors de potentiel d'action dans la cellule dépolarisée pour un retour à un état de repos. Le gène *KCNC3* est exprimé dans les cellules granulaires du cervelet, les cellules de Purkinje et les neurones des noyaux cérébelleux profonds<sup>32</sup>.

Plusieurs mutations correspondantes à des changements d'acide aminé ont été identifiées dans un même gène pour SCA14<sup>33</sup>. Les mutations pathogènes ont été

identifiées dans le gène *PRKCG* (sous-unité gamma de la protéine kinase C) qui code pour la protéine kinase CG (PKC $\gamma$ ). Cette protéine est un des principaux isoformes des PKC s'exprimant dans les cellules de Purkinje. Elle semble avoir des fonctions dans l'apprentissage moteur et dans la morphologie cellulaire<sup>70</sup>.

La forme SCA11 est causée par deux mutations dans le gène *TTBK2* qui code pour une sérine-thréonine kinase qui phosphoryle les protéines tau et la tubuline et appartient à la superfamille des caséines kinases. Un autre membre de cette famille de gène, *TTBK1*, a été impliqué dans la maladie d'Alzheimer<sup>71</sup>. La première mutation du gène *TTBK2* est une insertion d'une base d'adénosine dans l'exon 13. Cette mutation crée un codon-stop prématuré (TGA) de l'ARNm au niveau du codon 450, résultat en une protéine tronquée. Une deuxième mutation a été identifiée chez une famille avec ataxie pure soit une délétion de deux paires de bases (GA) dans l'exon 13 de *TTBK2* provoquant un changement du cadre de lecture et ainsi un qu'codon-stop prématuré (TGA)<sup>30</sup>. Des tests d'hybridation *in situ* ont montré que *TTBK2* est exprimé dans toutes les régions du cerveau plus particulièrement dans les cellules de Purkinje, les cellules de la couche granuleuse, l'hippocampe, le mésencéphale et la substance noire.

Une mutation nonsense ainsi qu'un changement d'acide aminé (F145S) dans le gène *FGF14* ont été liés à SCA27. Le gène *FGF14* appartient à une sous-classe de facteurs de croissance des fibroblastes qui sont exprimés dans le système central nerveux en développement et les adultes<sup>72</sup>. Tout récemment, SCA27 a aussi été identifiée chez une fille et sa mère portant une translocation entre les chromosomes 5 et 13, ce qui perturbe le gène codant pour le facteur de croissance des fibroblastes 14 b isoforme (*FGF14-1b*)<sup>73</sup>.

Des mutations dans le gène *AFG3L2* (ATPase gene family 3-like 2) ont été associées à l'ataxie spinocérébelleuse type 28<sup>49</sup>. Ce gène code pour une protéine localisée dans les mitochondries et étroitement liée aux parapléines. Il s'agit de la première forme d'ataxie spinocérébelleuse dominante à être causée par une mutation dans un gène mitochondrial<sup>51</sup>.



### 1.4.4 Délétions/duplications

L'ataxie spinocérébelleuse de type 15-16 est causée par trois mutations soit une délétion du gène *ITPR1* (inositol 1,4,5-triphosphate récepteur de type 1) et des trois premiers exons du gène *SUMF1* (sulfatase facteur de modification 1); une délétion partielle de *ITPR1*; et un changement d'acide aminé du gène *ITPR1* (P1059L) situé dans le domaine de modulation et de transduction<sup>74, 75</sup>. Le gène *ITPR1* assure la médiation de la sortie de  $Ca^{2+}$  du réticulum endoplasmique (RE) dans différents types de neurones, y compris l'hippocampe (CA1), les noyaux gris centraux, et les neurones thalamiques, en particulier les neurones de Purkinje. L'homéostasie du  $Ca^{2+}$  intracellulaire est importante pour maintenir le fonctionnement des neurones particulièrement les cellules de Purkinje. Ainsi, un dérèglement de l'homéostasie intracellulaire de  $Ca^{2+}$  causé par haplo-insuffisance ou une mutation faux-sens du gène *ITPR1* peut provoquer un dysfonctionnement des cellules de Purkinje, et pourrait finalement conduire à une dégénérescence des cellules de Purkinje chez les humains résultant du phénotype cérébelleux<sup>75</sup>.

### 1.4.5 Insertion

Jusqu'à présent, une seule forme d'ataxie dominante est associée à une insertion intronique, soit SCA31. Cette forme était jadis connue sur le nom de chr16q22-lié. Un changement d'un nucléotide (16C> T) dans le gène *PLEKHG4* (puratrophin-1) avait déjà été signalé comme étant la cause potentielle de cette forme d'ataxie. Cependant, deux patients n'abordant pas cette modification ont ensuite été identifiés, indiquant ainsi que ce changement n'est qu'en fait un marqueur génétiquement lié à un fort déséquilibre de liaison, mais n'est pas la cause de SCA31. Une large insertion de 2.5- 3.8 kb, constituée de répétitions de pentanucléotides complexes contenant des répétitions (TGGAA)<sub>n</sub> a été récemment identifiée<sup>54</sup>. L'insertion de séquences répétées se situe dans un intron de *TK2* et *BEAN* (brain expressed, associated with Nedd4). L'ARNm contenant cette insertion est fortement exprimé dans le cerveau et forme des foyers d'ARN dans les noyaux des cellules de Purkinje des patients. Cette découverte a de l'importance puisqu'elle illustre que des maladies humaines héréditaires peuvent être associées à des insertions de séquences répétées.

## 1.5 État des connaissances sur les Érythrokératodermies

Les Érythrokératodermies (EK) sont des troubles cutanés de kératinisation de la peau, se transmettant généralement par un mode de transmission autosomique dominante <sup>76</sup>. De Buy Wenninger a reconnu et décrit les premiers cas d'EKV aux Pays-Bas en 1907. Ce fut 18 ans plus tard, soit en 1925, que Mendes da Costa S fit la première description clinique détaillée de la maladie chez une mère et sa fille <sup>77</sup>. (<http://emedicine.medscape.com/article/1110820-overview>). La caractéristique principale de ce groupe de maladies est la présence de taches érythémateuses et de l'hyperkératose <sup>78, 79</sup>. Il existe deux sous-types de ce groupe de maladies, soit l'érythrokératodermie variabilis (EKV, OMIM 133200) et l'érythrokératodermie symétrique et progressive (PSEK OMIM 602036). PSEK diffère d'EKV par l'absence de lésions érythémateuses et une plus grande propension à la présence de kératose palmoplantaire. Les manifestations cliniques d'EKV sont habituellement présentes à la naissance ou au cours de l'enfance <sup>79, 80</sup>. Au stade de la puberté, l'hyperkératose tend à se stabiliser et les taches érythémateuses disparaissent lentement dans certains cas <sup>80</sup>. Au niveau clinique, lorsque présentes, les taches érythémateuses persistent habituellement de plusieurs heures à plusieurs jours et varient remarquablement dans leur nombre, taille, forme et leur emplacement <sup>79</sup>.



**Figure 6.** Taches érythémateuses

En revanche, l'hyperkératose est caractérisée par l'épaississement jaune-brun-gris, résultant d'un excès de kératinisation de la peau. Ces plaques sont habituellement symétriquement distribuées et ont une prédilection pour les extrémités distales, les fesses, et le tronc, souvent même au niveau des extenseurs, du visage et du cuir chevelu. Dans environ la moitié des cas familiaux d'EK, l'hyperkératose implique aussi les paumes de mains et les plantes de pieds (palmoplantar keratoderma).

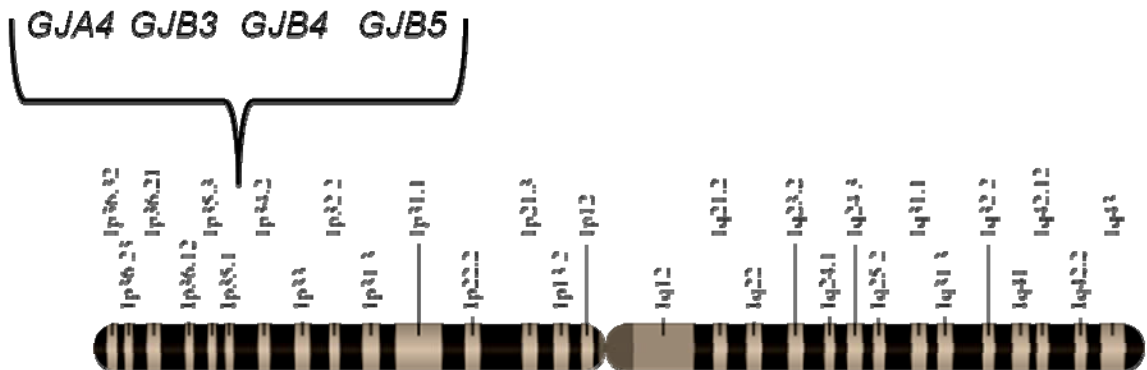


**Figure 7.** Plaque d'hyperkératose au niveau du genou

Autant l'hyperkératose que l'érythème peuvent être déclenchés par le stress, un changement brusque de température, une friction mécanique ou par une exposition au soleil<sup>76, 80</sup>. Il existe une importante variabilité tant intra- et interfamiliale dans la gravité des symptômes, ce qui justifie l'existence du terme variabilis.

## 1.7 Génétique et mécanismes moléculaires responsables des Érythrokratodermies variabilis et autres syndromes similaires

Un locus pour l'érythrokratodermie variabilis a d'abord été retrouvé chez plusieurs familles d'origines ethniques diverses sur le chromosome 1p34-p35.1. Cette région couvrant 2,6 cM contient un groupe de gènes («cluster») codant pour des protéines de communications cellulaires soit *GJB4* (Cx30.3), *GJB3* (Cx31), *GJB5* (Cx31.1) et *GJA4* (Cx37) (Figure 8)<sup>81</sup>.



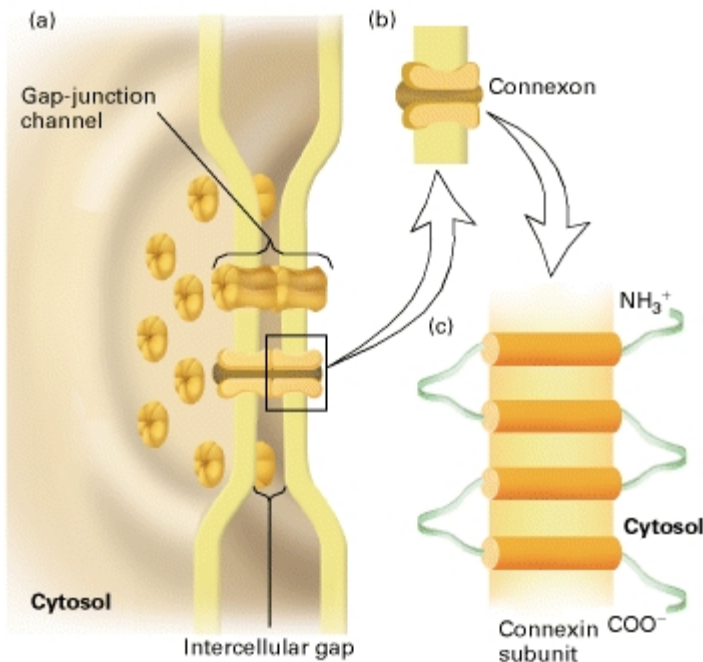
**Figure 8.** Représentation de la localisation chromosomique du «cluster» de connexines sur le chromosome 1 responsable des formes EKV1 et EKV2

Des mutations dans les gènes *GJB3* et *GJB4*, codant respectivement pour les connexines (Cx31) et (Cx30.3), ont été associées à la maladie<sup>82, 83</sup>. Les protéines Cx31 et Cx30.3 appartiennent au groupe des connexines de type  $\beta$  et sont davantage exprimées dans la partie supérieure de l'épiderme, plus précisément au niveau des kératinocytes. Cela explique pourquoi une mutation dans l'un de ces gènes affecte de manière cruciale la différenciation épidermique provoquant un trouble de kératinisation de

la peau <sup>81</sup>. À ce jour, sept mutations ont été trouvées dans le gène *GJB3* et cinq dans le gène *GJB4* dans un total de 18 familles indépendantes <sup>79, 80, 84</sup>. Il y a par contre une proportion significative de familles atteintes d'EKV qui ne comportent pas de mutation dans un ou l'autre de ces gènes, suggérant qu'il existe davantage de gènes responsables des EKV <sup>78</sup>. De façon intéressante, des mutations dans le gène *GJB3* ont également été associées à une perte de l'audition et à une neuropathie périphérique, et ce, en l'absence de lésions d'EKV <sup>85</sup>. Cela met en évidence que des mutations dans des gènes causant de l'hyperkératose chez certaines personnes peuvent aussi causer des troubles neurologiques divers, y compris de la surdité et une neuropathie périphérique. Cette pléiotropie se retrouve aussi dans d'autres connexines. Ceci illustre le rôle important des connexines dans le transport intercellulaire au niveau de plusieurs organes chez les organismes pluricellulaires.

### 1.7.1 Importance des communications cellulaires

Afin de répondre aux stimuli internes ainsi qu'à l'environnement qui les entoure, les organismes pluricellulaires ont besoin de divers moyens de communication. L'un d'entre eux est l'utilisation de communications cellulaires servant entre autres à l'échange d'ions, de métabolites, mais aussi de petits éléments nutritifs <sup>86</sup>. Les communications cellulaires (gap junction) sont composées d'oligomères, les connexons, qui sont eux formées de six connexines. Chaque protéine connexine comprend quatre domaines transmembranaires (M1-M4), deux extracellulaires (E1-E1) et trois domaines cytoplasmiques, soit le domaine N-terminus ( $\text{NH}_3^+$ ), la boucle cytoplasmique, et le domaine C-terminal ( $\text{COO}^-$ ) (Figure 9) <sup>87</sup>.



**Figure 9.** Structure des communications cellulaires  
(source : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>)

Les connexines sont des protéines de la membrane plasmique et sont présentes, mis à part quelques cellules, dans l'ensemble des types cellulaires des vertébrés <sup>88</sup>. Les connexines forment chez l'humain, un groupe de 21 gènes (Tableau IV) qui codent pour les jonctions des canaux permettant la communication intercellulaire <sup>89</sup>. Elles sont classées en trois sous-types,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , en fonction de la similarité de leur séquence. Au cours de l'évolution, les connexines ont eu tendance à former des «clusters» sur un

même chromosome. La structure est similaire pour la plupart de ces gènes. En général, l'exon 1 non traduit est séparé de l'exon 2 contenant la région codante de manière ininterrompue par un intron de taille variable et la région 3'UTR non traduite<sup>90, 91</sup>.

**Tableau IV.** Localisation chromosomique et tissu d'expression de tous les membres de la famille des connexines chez l'humain.

<b>Gène</b>	<b>Protéine</b>	<b>Localisation chromosomique</b>	<b>Expression</b>
<b>GJC3</b>	Cx23	6q24.1	-
<b>GJB7</b>	Cx25	6q15	Placenta
<b>GJB2</b>	Cx26	13q11–q12	Sein, peau, cochlée, foie, placenta
<b>GJC3</b>	Cx30.2	7q22.1	Cerveau, moelle épinière, nerf sciatique
<b>GJB6</b>	Cx30	13q11–q12	Peau, cerveau, cochlée
<b>GJD3</b>	Cx31.9	17q21.1	Cortex cérébral, cœur, foie, poumons, reins, rate et testicules
<b>GJB4</b>	Cx30.3	1p35.1	Peau
<b>GJB3</b>	Cx31	1p35.1	Peau, placenta
<b>GJB5</b>	Cx31.1	1p35.1	Peau
<b>GJB1</b>	Cx32	Xq13.1	Foie, cellules de Schwann, oligodendrocytes
<b>GJD2</b>	Cx36	15q14	Neurones
<b>GJA4</b>	Cx37	1p35.1	Endothélium, cœur, utérus, ovaire
<b>GJD4</b>	Cx40.1	10p11.21	Pancréas, reins, muscles squelettiques, foie, placenta et cœur
<b>GJA5</b>	Cx40	1q21.1	Cœur, endothélium
<b>GJA1</b>	Cx43	6q21–q23.2	Ubiquitaire
<b>GJC1</b>	Cx45	17q21.31	Muscles lisses, cœur, neurones
<b>GJA3</b>	Cx46	13q11	Cristallin de l'œil
<b>GJC2</b>	Cx47	1q41–q42	Cerveau, moelle épinière, muscle squelettique
<b>GJA8</b>	Cx50	1q21.1	Cristallin de l'œil
<b>GJA9</b>	Cx59	1p34.3	Muscle squelettique, testicule
<b>GJA10</b>	Cx62	6q15	Muscle squelettique et cœur

Source NCBI

## 1.7.2 Maladies associées à des mutations dans les connexines

Étant donnée la spécificité tissulaire de certaines connexines, une mutation dans l'une ou l'autre de ces protéines résulte en une multitude de maladies héréditaires chez l'humain. Le nombre croissant de maladies humaines causées par des défauts de fonctionnement des connexines illustre l'importance du rôle des communications cellulaires (GJIC). Outre, l'Érythrokratodermie variabilis (OMIM 133200), il existe plusieurs maladies distinctes liées à des mutations germinales dans la famille des connexines, dont les caractéristiques cliniques impliquent une combinaison variable de surdité, neuropathie périphérique, atteinte cutanée, cataracte (Tableau V)<sup>89, 92</sup>.

**Tableau V.** Maladies chez l'humain causées par des mutations dans les différentes connexines.

<b>Gène</b>	<b>Protéine</b>	<b>Maladies</b>
<b>GJB2</b>	Cx26	Surdité avec phénotype de Clouston Surdité avec hyperkératose et érosion buccale Syndrome de Vohwinkel* Kératodermie palmo-plantaire avec surdité
<b>GJB6</b>	Cx30	Syndrome de Clouston Surdité non syndromique Dysplasie ectodermique hydrotique
<b>GJB4</b>	Cx30.3	Érythrokratodermie variabilis (EKV)
<b>GJB3</b>	Cx31	Érythrokratodermie variabilis (EKV) Surdité non syndromique Surdité et neuropathie périphérique
<b>GJB1</b>	Cx32	Charcot-Marie-Tooth (CMTX)
<b>GJA1</b>	Cx43	Dysplasie Oculo-dento-digital et Kératodermie palmoplantaire Surdité non syndromique
<b>GJA3</b>	Cx46	Cataracte congénitale
<b>GJC2</b>	Cx47	Leucodystrophie hypomyélinisation
<b>GJA8</b>	Cx50	Cataracte pulvérulente



\*Ce syndrome est également causé par des mutations dans le gène codant pour la loricrine.

### 1.7.2.1 Le syndrome de Vohwinkel

Syndrome de Vohwinkel (OMIM 124500) est caractérisé par une kératodermie palmoplantaire, de l'ichtyose et une surdité congénitale. Des mutations dans le gène *GJB2* (Cx26) ont été trouvées dans des familles atteintes du syndrome de Vohwinkel<sup>93, 94</sup>. Une variante de ce syndrome a été associée à une mutation identifiée dans le gène de la loricrine, gène qui cause également PSEK. La mutation consiste en une insertion d'une paire de bases, soit 21 paires de base plus loin que la mutation retrouvée dans le syndrome PSEK. La loricrine (LOR) code pour la composante majeure de l'enveloppe cellulaire de l'épiderme<sup>95, 96</sup>. Il s'agit d'une petite protéine distribuée dans la couche granuleuse de l'épiderme. Elle est essentielle à la composition des enveloppes des cellules cornées qui remplacent la membrane plasmique des kératinocytes au cours de leur stade final de différenciation<sup>97</sup>.

### 1.7.3 Maladies apparentées à l'érythrokatodermie associées à une atteinte neurologique

#### 1.7.3.1 Le syndrome de CEDNIK

Le syndrome CEDNIK, un syndrome neurocutané dont les manifestations cliniques incluent kératodermie, ichtyosis, neuropathie périphérique, retard psychomoteur et dysplasie corticale (Cerebral Dysgenèse Neuropathy Ichthyosis Palmoplantar Keratodermia) qui sont causées par une mutation dans le gène *SNAP29*<sup>98</sup>. Une délétion (220delG) a été retrouvée dans le gène chez tous les individus atteints, causant un changement du cadre de lecture résultant par un codon-stop prématuré. Le gène *SNAP29* (soluble n-ethylmaleimide sensitive factor attachement protein) code pour une protéine qui est impliquée dans la fusion de la membrane des vésicules de transport avec la membrane d'un compartiment cellulaire cible<sup>99</sup>.

### 1.7.3.4 Le syndrome de MEDNIK

Une variante atypique d'érythrokratodermie variabilis (EKV3) a été retrouvée chez quatre familles originaires de la population du Québec, plus précisément de la région de Kamouraska. Ces familles partagent un nombre limité d'ancêtres communs, suggérant un effet fondateur pour cette maladie rare <sup>100, 101</sup>. Chez les individus atteints de ces familles, des lésions d'EK ont été retrouvées, en association avec une surdité congénitale, un retard psychomoteur, une neuropathie périphérique, des diarrhées sévères pouvant être fatales en bas âge, ainsi qu'une élévation des acides gras à longues chaînes (VLCFAs). Des familles avec un phénotype similaire soit de l'érythrokratodermie, une surdité, un retard de développement et une neuropathie périphérique avaient été antérieurement décrits dans une autre population <sup>102</sup>. Pour la variante du Québec, la maladie se transmet selon un mode de transmission autosomique récessif et le locus a été identifié sur le chromosome 7q22 <sup>100</sup>. Étant donné les manifestations très similaires à celles du syndrome CEDNIK décrit précédemment, ce syndrome pour le moment unique à la population du Québec a été renommé selon un nouvel acronyme soit MEDNIK (mental retardation, enteropathy, deafness, peripheral neuropathy, ichthyosis and keratoderma). Ce syndrome est causé par une mutation au site d'épissage de l'exon 2 du gène *AP1S1* <sup>101</sup>. Cette mutation prédit l'excision de l'exon 3, générant un codon-stop prématuré au début de l'exon 4. Le gène *AP1S1* code pour une petite sous-unité située au cœur d'un complexe protéique tétramérique, l'adaptine 1 (AP-1) <sup>103, 104</sup>. Les adaptines constituent les pièces importantes dans la formation de vésicules de transport. Elles recrutent les clathrines, mais recrutent également les protéines qui doivent être transportées dans les vésicules.

### 1.7.3.5 Le syndrome de Giroux-Barbeau

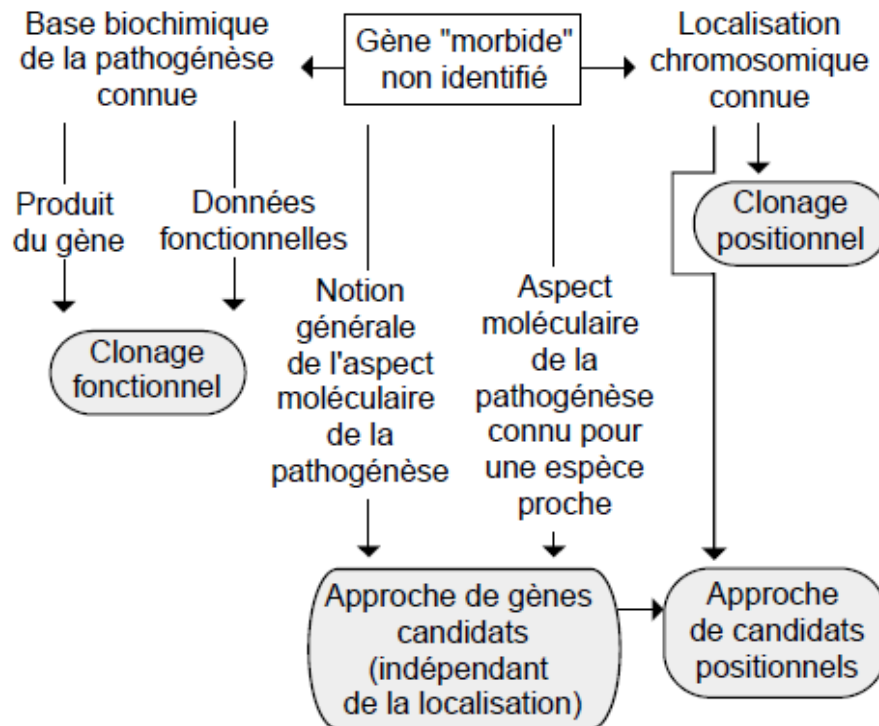
En 1972, les Drs Giroux et Barbeau ont identifié une grande famille canadienne-française avec des lésions d'EK, ainsi qu'un syndrome neurologique à progression lente, soit une ataxie sévère, une diminution des réflexes tendineux, une dysarthrie et un nystagmus <sup>105</sup>. Cette famille de plus de 100 personnes s'étend maintenant sur plus de six générations. La maladie se transmet selon un mode de transmission autosomique dominant. Les individus atteints de cette famille présentent des manifestations cutanées durant l'enfance, qui s'atténuent habituellement au début de l'âge adulte. Après l'âge de 40 ans, ces patients présentent des troubles progressifs de l'équilibre menant à une ataxie

cérébelleuse. Il y a plus de dix ans, la famille a été partiellement collectée par le Dr Barbeau et potentiellement lié sur le chromosome 1p35, soit le même locus que les autres variantes d'EKV <sup>76</sup> (voir section 1.7). Cependant, la mutation causale de ce syndrome neurocutané n'a pas été identifiée. Le laboratoire du Dr Cossette a réévalué les familles avec des examens approfondis, des études IRM et EMG. À notre connaissance, il n'existe aucune autre famille comportant cette combinaison d'un trouble cutané et d'un syndrome neurologique dégénératif. Cependant, cette combinaison de symptômes neurologiques et cutanés est compatible avec les données de la littérature qui suggèrent que des mutations dans les gènes causant de l'hyperkératose ou autres troubles cutanés chez certains patients peuvent être accompagnées de troubles neurologiques divers.

## 1.8 Les études génétiques

L'épidémiologie génétique est l'étude des facteurs génétiques qui déterminent la répartition et la dynamique des maladies dans les populations <sup>106</sup>. En d'autres mots, il s'agit de mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés à la maladie et, éventuellement, de prévenir et/ou mieux traiter celle-ci. La génétique humaine porte sur l'étude d'individus atteints de la même maladie et souvent de la même mutation en cherchant grâce aux analyses de liaison, des régions chromosomiques entourant cette mutation qui sont partagées entre les individus <sup>107</sup>.

Il existe trois stratégies différentes pour identifier les gènes responsables de maladies soit (i) le clonage fonctionnel, (ii) le clonage d'un gène candidat, et (iii) le clonage positionnel.

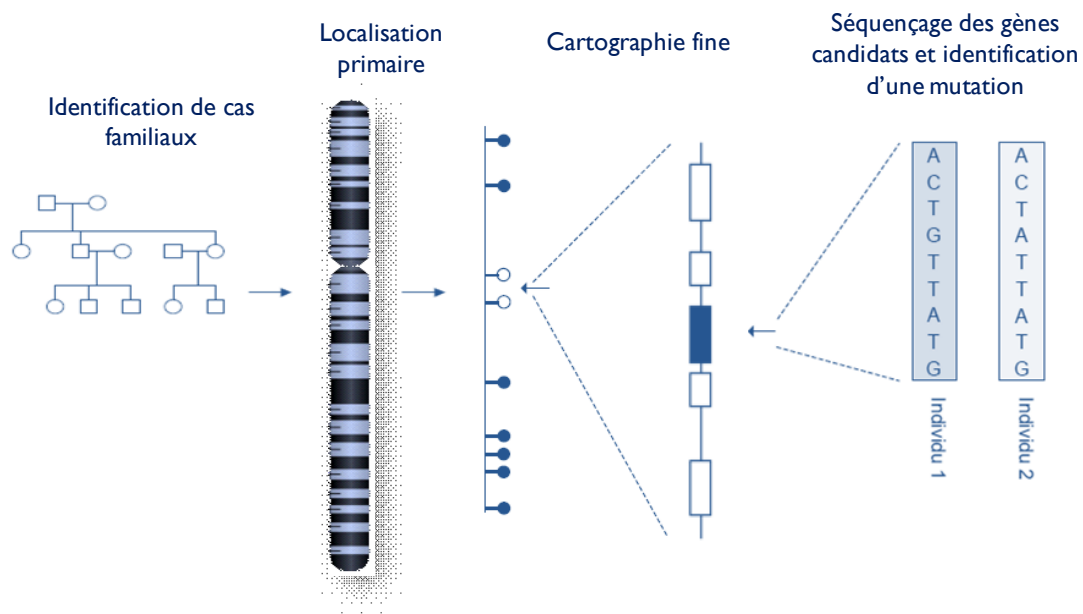


**Figure 10.** Différentes stratégies d'identification de gène causant une maladie (Tirée de <sup>108</sup>)

Le clonage fonctionnel se base sur la pathophysiologie d'une maladie afin d'identifier le défaut biochimique de base qui engendre la maladie en question (Figure 10) <sup>109</sup>. Il nécessite la connaissance préalable de la fonction du gène qui est parfois inconnue limitant ainsi cette approche dans certains cas. Le clonage d'un gène candidat se base sur des informations indépendantes. Si un gène possède une fonction appropriée à une certaine maladie connue et localisée, les mutations de ce gène peuvent être recherchées chez les patients. Si les mutations sont présentes chez ces patients, alors il sera susceptible d'être directement liées à la maladie.

Le clonage positionnel n'utilise pas d'informations fonctionnelles, mais s'appuie plutôt sur la position des gènes dans le génome (Figure 10). Cette approche est également appelée «génétique inverse» puisqu'elle s'oppose à l'approche par la génétique moléculaire classique qui identifie au préalable le défaut biochimique <sup>110</sup>. Il a pour but de trouver une région d'ADN située entre deux marqueurs génétiques qui sont liés à un phénotype précis pour ensuite séquencer les gènes présents dans cette région afin de trouver la mutation

causant la maladie et éventuellement étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires des mutations découvertes<sup>109, 111, 112</sup>.



**Figure 11.** Les différentes étapes du clonage positionnel (Adaptée de<sup>108</sup>)

Pour ce faire, il faut d'abord faire étudier des individus d'une ou plusieurs familles et réaliser une évaluation clinique précise afin de déterminer le phénotype de chaque individu. Après avoir obtenu un échantillon d'ADN, habituellement par une prise de sang, il faut ensuite génotyper les individus en utilisant des marqueurs génétiques. Il faut donc mener une étude au niveau génomique en utilisant des marqueurs connus, que ce soit des microsatellites ou des polymorphismes à nucléotide simple (SNP). La puissance du génotypage augmente en fonction de la densité des marqueurs et de leur polymorphisme<sup>109, 113</sup>. Il est important que la densité des marqueurs choisis soit suffisante afin de bien couvrir le génome. Il faut également tenir compte de la nature de ces marqueurs. Comme il sera abordé plus en profondeur dans les sections suivantes, les microsatellites ont pour avantages d'être multi-alléliques et très hétérogènes, en comparaison aux SNPs qui sont bi-allélique. Les microsatellites sont ainsi nécessaires en plus faible quantité en raison de leur polymorphisme.

Lorsque le chromosome responsable de la maladie est identifié, une cartographie fine de la région d'intérêt, en ajoutant davantage de marqueurs, permettra habituellement de réduire progressivement l'intervalle critique contenant le gène causal, s'il y a eu

suffisamment de recombinaisons. Les analyses de liaison reposent donc sur la ségrégation des chromosomes de génération en génération et sont facilitées par les recombinaisons entre des paires de chromosomes homologues lors de la méiose<sup>106, 107, 114</sup>.

### 1.8.1 Recombinaison génétique

La recombinaison génétique est un échange d'information entre deux chromosomes différents. C'est un phénomène spontané chez les vivants et par le fait même un des facteurs essentiels au maintien de la diversité génétique dans une population. Dans une cellule, les deux chromosomes d'une même paire portent des allèles différents sur un certain nombre de locus. Au cours de la méiose, les chromosomes homologues s'apparient et s'enchevêtrent au niveau des chiasmas. Il se produit des échanges de segments entre ces chromosomes, phénomène que l'on nomme enjambement. Il en résulte donc des différences entre les individus, qui font partie de la variation génétique.

### 1.8.2 Notions de polymorphismes

La variation génétique, sous la forme de plusieurs allèles de nombreux gènes, existe dans la plupart des populations. Ces variations dans la séquence d'ADN n'ont pas toujours des conséquences pathologiques et il existe différents types de polymorphisme dans l'ADN. En génétique humaine, les deux types de marqueurs génétiques les plus couramment utilisés sont les marqueurs microsatellites «short tandem repeat» (STR) et les marqueurs «single nucleotide polymorphism» (SNP)<sup>107, 113, 115</sup>. Les marqueurs STR consistent en des séquences d'ADN constituées de motifs répétés avec 2, 3 ou 4 nucléotides<sup>107, 113, 115</sup>. Il est connu dans la littérature qu'il existe près de 10 000 microsatellites à travers le génome (<http://www.cephb.fr/cephdb>). Ils sont habituellement distribués avec un espacement de 5 à 10 cM. Les microsatellites sont des marqueurs multi-alléliques, donc très informatifs lors des études de liaison. Le pourcentage d'hétérozygoté dans la population générale avec des marqueurs multi-alléliques est plus important que celui des marqueurs bi-alléliques comme les SNPs. De plus, les microsatellites, par leur composante de séquences répétées, sont plus

susceptibles à muter versus les polymorphismes de type SNP. Les marqueurs SNPs désignent des variations simples d'une seule base, par exemple, une cystéine (c) pour une guanine (g). Ces variations nucléotidiques sont très fréquentes dans le génome (près de 1/1000 paire de bases). Un changement de nucléotide est usuellement considéré comme un SNP si la fréquence de l'allèle mineur atteint 1% dans une population. Comparativement aux marqueurs microsatellites, un SNP a pour avantage d'être plus abondant, plus stable et permet une meilleure résolution du profil de recombinaison. Ainsi, les marqueurs microsatellites sont de moins en moins utilisés pour les études à grande échelle. Par contre, les SNPs se trouvent à être moins informatifs puisqu'ils sont bi-alléliques, nécessitant ainsi l'utilisation d'un plus grand nombre d'entre eux.

### 1.8.3 Études de liaison génétique

Les études de liaison génétique sont des analyses basées sur les rapports de recombinaisons génétiques et leur ségrégation dans la famille de génération en génération <sup>106, 107, 114</sup>. Cette ségrégation est le fruit de l'échange du matériel génétique entre une paire de chromosomes homologues par le phénomène de la recombinaison durant la méiose <sup>106, 107, 114</sup>. Plus les sites sur le génome sont rapprochés, moins la recombinaison sera susceptible de se produire <sup>113</sup>. Dans le cas d'une famille atteinte d'une maladie quelconque, une liaison génétique est possible lorsque le gène muté est à proximité des marqueurs génétiques, empêchant habituellement toute recombinaison possible. On parle alors de co-ségrégation. Si une liaison positive est établie, il est alors envisageable de déterminer les recombinants clés de chaque individu afin d'établir l'étendu génétique du locus identifié. L'échelle utilisée comme mesure de distance génétique est le centimorgan (cM). Lorsque deux marqueurs sont suffisamment proches pour n'être séparés qu'une fois sur 100, on fixe la distance génétique qui les sépare à 1 centimorgan (1 cM), ce qui représente une probabilité de 1% que les deux allèles observés soient séparés par une recombinaison.

Afin de déterminer la présence significative d'une liaison génétique entre un phénotype défini et une région chromosomique, on utilise un score appelé LOD-score (Logarithme des probabilités). Le LOD score correspond au ratio de la probabilité que le modèle se

produise en situation de liaison génétique sur la probabilité que ce modèle ne se produise pas en situation de liaison génétique et soit plutôt le fruit du hasard<sup>106, 113</sup>. Un LOD score inférieur à - 2 est automatiquement rejeté. Il est généralement accepté qu'un LOD-score au-dessus de 3 (c'est-à-dire que la liaison est 1000 fois plus probable que la non-liaison) est suffisant tandis qu'un LOD-score au-dessus de 5 est généralement un indice concluant pour une liaison génétique<sup>116</sup>. Dans le cas d'une étude où l'on connaît le mode de transmission comme notre étude, il s'agit d'une analyse de liaison paramétrique<sup>106, 107, 113</sup>.

#### **1.8.4 Analyse de liaison**

Il est possible de faire une analyse de liaison en deux points (TWO POINTS) ou en multipoints (MULTIPOINTS). Les analyses de liaison en deux points considèrent chaque marqueur génétique individuellement<sup>106</sup>. C'est une approche qui est sensible à l'information disponible pour chaque marqueur (fréquences alléliques, nombre d'allèles présents, présence d'un recombinant familial important). Les analyses de liaison en multipoints considèrent la statistique de liaison pour tous les marqueurs simultanément<sup>106</sup>. L'approche par multipoints se base sur la carte génétique des marqueurs, les marqueurs plus informatifs permettant d'inférer la phase des autres marqueurs. Elle permet un meilleur positionnement du gène causant la maladie. Par contre, elle nécessite des calculs plus intensifs et peut être sensible aux erreurs de positionnement des marqueurs, surtout pour la cartographie fine<sup>106</sup>. Il existe plusieurs algorithmes qui permettent d'effectuer des analyses en two points et en multipoint, par exemple Genehunter, Allegro, Simwalk, Linkage (Fastlink), Vitesse, SLINK, Merlin et Mega2.



## **1.9 Projet de recherche**

### **1.9.1 Hypothèse**

Étant donné qu'il existe dans la littérature des exemples où des mutations différentes dans un gène peuvent causer un trouble cutané dans un cas et un trouble neurologique dans l'autre, nous avons basé notre hypothèse sur cette observation. Notre hypothèse de travail est donc que le gène responsable des lésions EK et de l'ataxie spinocérébelleuse dans la grande famille canadienne-française est le même que celui causant l'ataxie spinocérébelleuse chez les familles européennes.

### **1.9.2 But et objectifs**

Le but de ce projet de maîtrise est d'identifier les mutations génétiques et les mécanismes moléculaires causant l'Érythrokratodermie variabilis associée à une ataxie spinocérébelleuse dans la famille canadienne-française et de valider ce locus dans une cohorte de familles européennes avec SCA inexplicé. Les objectifs spécifiques étaient de caractériser cliniquement la maladie, d'identifier le locus lié à SCA34 et d'identifier la ou les mutations causales.

### **1.9.3 Approche pour identifier les gènes causant SCA34**

La méthodologie appliquée ici sera celle qui a été montrée efficace en génétique humaine, à savoir :

1. Identification des cas familiaux d'ataxie dans nos familles avec un accent sur les familles liées au locus SCA34
2. Caractérisation clinique détaillée des individus atteints tant au niveau neurologique que dermatologique
3. Prélèvements sanguins en vue d'extraction d'ADN et établissement de lignées cellulaires pour tous les individus atteints

4. Criblage complet du génome, cartographie fine de la région candidate et analyse de liaison des familles à l'étude
5. Séquençage des gènes candidats au locus identifié
6. Recherche d'expansion de séquences répétées de CAG afin d'exclure la possibilité d'une maladie à polyglutamine par Southern blot (immunobuvardage)
7. Recherche de délétion/duplication (Variation du nombre de copies d'un gène ou VNC)
8. Caractérisation fonctionnelle des gènes mutés

#### **1.9.4 Impact de ce travail de recherche**

Nous croyons que l'identification des gènes et des mécanismes moléculaires causant cette nouvelle forme d'ataxie spinocérébelleuse avec kératodermie sera utile afin de mieux comprendre la pathogenèse des maladies associées au développement anormal de la peau comme les érythrokatodermies, mais aussi des diverses formes d'ataxies. À notre connaissance, cette association de lésions EK avec une ataxie spinocérébelleuse pure est unique au syndrome Giroux-Barbeau, mais peut avoir été sous-estimée dans la pratique clinique. Il sera donc utile dans un avenir rapproché de revisiter le phénotype cutané des patients atteints d'autres formes d'ataxies héréditaires.

## **Chapitre 2 :**

**Un nouveau locus pour une forme d'ataxie spinocérébelleuse pure associée à  
de l'Éythrokérodémie localisé sur le chromosome 6q13-16.1.**

**A novel locus for pure Spinocerebellar Ataxia and Erythrokeratoderma maps to  
chromosome 6q13-16.1**

M. Turcotte Gauthier<sup>1\*</sup>, E. Di Gregorio<sup>4\*</sup>, G. Stevanin<sup>2\*</sup>, DK. Nguyen<sup>1</sup>, S. Forlani<sup>2</sup>, B. Borroni<sup>5</sup>, C. Costanzi<sup>5</sup>, A. Padovani<sup>5</sup>, C. Meloche<sup>1</sup>, J. Poirier<sup>1</sup>, SL. Girard<sup>1</sup>, G. De Michele<sup>6</sup>, A. Filla<sup>6</sup>, D. Zelenika<sup>7</sup>, CA. Drouin<sup>3</sup>, A. Durr<sup>2</sup>, A. Brice<sup>2</sup>, A. Brusco<sup>4</sup> and P. Cossette<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Research center of the CHUM, Hôpital Notre-Dame, Centre of Excellence in Neuromics of Université de Montréal (CENUM), Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup> INSERM/UPMC U975, Centre de Recherche Institut du Cerveau et de la Moelle Épineuse, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France

<sup>3</sup> Department of Dermatology, Centre Hospitalier Régional Grand-Portage, Rivière-du-Loup, Québec, Canada.

<sup>4</sup> Department of Genetics, Biology and Biochemistry, University of Torino, and S.C.D.U. Medical Genetics, A.O.U. San Giovanni Battista, Torino Italy

<sup>5</sup> Department of Neurology, University of Brescia, Italy

<sup>6</sup> Federico II University, Naples, Italy

<sup>7</sup> Centre National de Génotypage, Evry, France.

\*These authors contributed equally to this work.

Corresponding author:

Patrick Cossette MD, PhD, FRCPC  
CHUM-Hôpital Notre-Dame  
1560 Sherbrooke est  
Montréal, Québec  
H2L 4M1

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

## 2.1 Apport des coauteurs

### Les contributions du groupe de EUROSCA:

**Sylvie Forlani** : Gestion de l'ADN, l'extraction, l'échantillonnage.

**Giuseppe De Michele et Alessandro Filla** : Cliniciens de la famille NAP01

**Alexandra Durr et Alexis Brice** : Coordonateurs des études génétiques chez EUROSCA

**Giovanni Stevanin**: Analyse du génome et validation dans les familles EUROSCA.

Écriture partielle de la partie sur les familles EUROSCA du manuscrit.

**E. Di Gregorio** : Interprétation et validation du criblage du génome et analyse de CNV de la faille BRE-01

**D. Zelenika** : Centre National de Génotypage pour le criblage du génome

**B. Borroni, C. Costanzi et A. Padovani** : Cliniciens

### Contributions du groupe du laboratoire de Dr Cossette :

**Dang Nguyen**: Clinicien neurologue de la famille canadienne-française

**Caroline Meloche**: Analyse de CNV par «GCH Array», analyse du criblage du génome, séquençage des certains gènes candidats

**Josée Poirier**: la gestion de l'ADN, l'extraction, l'échantillonnage

**Simon Girard**: L'analyse de liaison en multipoint

**Maude Turcotte Gauthier**: Écriture du manuscrit. Détection d'expansions de CAG / CTG, analyse de CNV par Illumina, analyse de la cartographie fine de toutes les familles, séquençage de gènes candidats, extraction d'ADN de certains patients.

**Christian A. Drouin** : Clinicien dermatologue de la famille canadienne-française

## 2.2 Résumé

**Rationalisation.** Les ataxies spinocérébelleuses (SCA) à transmission autosomique sont un groupe complexe de maladies neurodégénératives. Environ 50% des cas familiaux de SCA restent encore inconnus. En 1972, Giroux & Barbeau ont décrit une famille canadienne-française présentant une combinaison phénotypique d'ataxie et de lésions cutanées compatibles avec l'érythrokratodermie, co-transmis de façon autosomique dominante. Cette famille a été potentiellement liée au chromosome 1p35, mais l'identification du gène muté est en instance. L'objectif de cette étude est de revisiter le phénotype clinique et refaire la cartographie génétique de cette famille atteinte d'un syndrome unique.

**Méthodes.** Nous avons évalué les patients de la famille par des examens neurologiques et dermatologiques détaillés, l'IRM cérébrale et EMG. Nous avons effectué un criblage du génome entier en utilisant des marqueurs microsatellites. Nous avons également analysé trois autres familles de descendance européenne avec SCA à transmission autosomique dominante, pour laquelle un LOD score positif a été identifié sur la même région chromosomique.

**Résultats.** Nous avons cartographié le locus de la maladie sur le chromosome 6p12.3-q16.1 avec un LOD score maximal de 5,33 à  $\theta = 0.00$  au marqueur D6S452 dans la famille canadienne-française. Nous avons obtenu un score LOD en multipoints de 3,4 au même locus pour une famille italienne. L'analyse des haplotypes de ces deux familles nous a permis de définir une région candidate de 21,7 Mb. Nous avons confirmé ce locus SCA34 dans deux autres familles européennes.

**Conclusion.** En conclusion, nous avons identifié un nouveau locus pour une ataxie cérébelleuse autosomique dominante pure (SCA34) sur le chromosome 6q13-q16.1 dans un total de quatre familles de descendance européenne. Ces familles comprennent une grande famille canadienne-française qui combine une SCA et de l'érythrokratodermie.

**Mots-clés:** ataxie cérébelleuse autosomique dominante, Érythrokratodermie Variabilis, analyse de liaison, ataxie spinocérébelleuse, SCA34.

## 2.3 Abstract

**Background.** Autosomal dominant spinocerebellar ataxias (SCA) are a complex group of neurodegenerative disorders. Approximately 50% of familial SCA remain so far unexplained. In 1972, Giroux & Barbeau described a French-Canadian family segregating a combination of ataxia and skin lesions compatible with erythrokeratoderma, co-transmitted in an autosomal dominant fashion. This family has been potentially linked to chromosome 1p35, but the identification of the mutated gene is pending. The objective of this study is to revisit the clinical phenotype and genetic mapping of this unique family.

**Methods.** We assessed the Giroux-Barbeau family with detailed examination, brain MRI and EMG studies. We performed a whole genome scan analysis by using microsatellites markers. We have also analyzed three additional families from European ancestry with autosomal dominant SCA, for which a genome scan have shown positive LOD score to the same chromosomal region.

**Results.** We mapped the locus for the disease on chromosome 6p12.3-q16.1 with a maximum LOD score of 5.33 at  $\theta = 0.00$  at marker *D6S452* in the French-Canadian family. We obtained a maximum multipoint LOD score of 3.4 at the same locus for in an Italian family. Haplotype analysis of these two families allowed us to define a candidate region of 21.7 Mb. We confirmed this SCA34 locus in two additional European families.

**Conclusion.** In conclusion, we have mapped a new locus for a pure autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA34) on chromosome 6q13-q16.1 in a total of four families from European ancestry. These families include a large French-Canadian kindred which combines SCA and erythrokeratoderma.

**Keywords:** Autosomal dominant cerebellar ataxia, erythrokeratoderma variabilis, linkage analysis spinocerebellar ataxia, SCA34.

## 2.4 Introduction

Autosomal dominant spinocerebellar ataxias is a complex group of neurodegenerative disorders characterized by progressive cerebellar ataxia of gait and limbs variably associated with other neurological signs<sup>3</sup>. The prevalence of inherited ataxias is approximately 3-6 individuals per 100,000 in the general population<sup>5, 12, 50, 117</sup>. At least 31 distinct loci have been identified for SCAs and of these, 18 specific mutations have been so far uncovered<sup>2-5, 54</sup> (<http://neuromuscular.wustl.edu/>). Expansion of a nucleotide repeats (SCA1-3, 6-8, 10, 12, 17, 31, DRPLA), genomic deletions/duplication (SCA15, SCA20) and point mutations (SCA5, 11, 13, 14, 27, and 28) have been associated with the disease. The frequency of mutation in these SCA genes varies among the different populations. It is estimated that between 30-60% of all SCA families remain unexplained, indicating significant heterogeneity<sup>118</sup>.

In 1972, a unique French-Canadian family segregating a combination of ataxia and skin lesions in an autosomal dominant fashion (EKA, OMIM133190) was described<sup>105</sup>. The skin lesions were found to be typical of erythrokeratoderma variabilis (EK; OMIM 1332190), a heterogeneous group of diseases characterized by erythematous lesions and hyperkeratosis<sup>76, 78-81</sup>. The pure form of EKV (OMIM 133200, EKV) has been associated with mutations in two connexin genes, both on chromosome 1p35.1, *GJB3* and *GJB4*<sup>78, 82</sup> but additional genes causing EKV remain to be identified<sup>91</sup>. There is growing evidence that mutations in genes causing keratodermias also predispose to various neurological disorders, including deafness, peripheral neuropathy and mental retardation<sup>85, 93-96, 100, 101</sup>. However, to our knowledge, except for FC family<sup>76, 105</sup>, neither skin lesions nor keratoderma have been reported in families with SCA. Preliminary studies with several affected individuals of this latter family have suggested linkage at the EKV1/EKV2 locus<sup>76</sup>, but no mutation has been so far identified. We report the clinical and genetic studies on a French-Canadian family with ataxia and EK as well as three European families with pure cerebellar ataxia and provide evidence for a genetically novel SCA and erythrokeratoderma locus.



## 2.5 Materials and Methods

### 2.5.1 Ascertainment and diagnosis of patient and DNA collection

We first studied two large families segregating autosomal dominant spinocerebellar ataxia. The French-Canadian (FC) family consists in a six-generation family of more than a hundred people including 29 affected individuals with a combination of erythrokeratoderma with or without spinocerebellar ataxia. The description of clinical phenotypes of the early generations has been previously described<sup>105</sup>. We collected genomic DNA from 15 affected patients, one healthy individual and 13 relatives of this family. We also investigated 3 additional families from European descent, collected by the EUROSCA consortium, a European network studying the clinical and genetic aspects of spinocerebellar ataxias (<http://www.eurosc.org/>). Among these three kindred, the four-generation Italian family included 12 individuals with a pure form of SCA. Genomic DNA was collected for eight of these affected patients, one spouse, and four healthy individuals. After informed consent, genomic DNA was extracted from blood samples by using standard protocols. All collected individuals underwent a complete neurological and dermatological examination.

### 2.5.2 Genotyping and linkage analysis

The genome-wide scan in the French-Canadian family was performed at deCODE genetics (Reykjavik, Iceland) by using 524 evenly distributed microsatellites markers covering the whole genome at intervals of approximately 8 cM. Genome-wide scan in European families BRE-01, NAP01 and FRE-394 was performed by using 6000 SNPs covering the human genome in an ILLUMINA Linkage 12 microarray at the Centre National de Génotypage (Evry, France). Microsatellite markers used to refine the disease locus were genotyped by polymerase chain reactions (PCRs) incorporating primers with fluorescently labelled M13mp18 sequence tail (primer and PCR details available upon request), as described elsewhere<sup>119</sup>. Our observations, together with those of Giroux & Barbeau<sup>105</sup> shows that all but one of the 26 individuals with spinocerebellar ataxia from the French-Canadian family exhibited EK lesions during childhood. These individuals eventually developed late-onset ataxia, usually in the fifth decade (Supplementary Table I). Conversely, all the individuals with EK lesions who lived beyond 50 years of age

eventually developed cerebellar ataxia (n=26). Therefore, for the purpose of the linkage analysis, we considered individuals VI-01 and VI-02, as affected (typical EK lesions only), although they do not exhibit ataxia at the age of 30 and 32 year old respectively. In the case of family BRE-01 genome-wide linkage analysis was performed using seven affected subjects, one apparently healthy case and two individuals with an unknown status (III-7 and III-8). Individual IV-3 was not used for the genome scan but was used as affected in further analysis since he presented mild initial symptoms (nystagmus). We calculated pairwise LOD scores (logarithm of odds) by using MLINK program (LINKAGE package, version 5.1) <sup>120</sup>, under the assumption of autosomal dominant mode of inheritance, a disease frequency of 1:10,000, 90% penetrance, 1/10,000 of phenocopy, and allele iso-frequency. We also performed a multipoint linkage analysis for all the families using the same parameters by using SIMWALK2 program (version 2.91) <sup>121</sup>.

### **2.5.3 Sequencing of candidate genes**

Initial screening of point mutations was performed on 12 candidate genes within the largest disease locus defined by the FC pedigree. The genomic organization of candidate genes was obtained from the UCSC website ([www.ucsc.genome.com](http://www.ucsc.genome.com)). The coding exons and at least 50 bp flanking intron boundaries were directly sequenced using an ABI3730 automatic sequencer (AppliedBiosystems). Primers were designated with either PRIMER3 or PRIMER SELECT from the DNASTAR software (version 5.07). Primer sequences and details of PCR conditions are available upon request (Annexe 1). The sequences were analyzed either with SEQMAN II (version 5.07) of the DNASTAR software or the DNA variant analysis software MUTATION SURVEYOR (version 3.0).

### **2.5.4 CAG expansion detection**

Within the candidate locus, we searched CAG/CTG stretches of at least eight pure and interrupted repeats by using the UCSC website. Five CAG/CTG repeat containing regions were amplified in four individuals from the French-Canadian family (IV-5, IV-18, V-27 and VI-2) by using a fluorescent labelled primer and analyzed using an ABI 3730 capillary sequencer and GeneMapper program (Annexe 2). To further exclude large expansions, we performed a PCR-Southern Blot analysis (data not shown).

## 2.5.5 Copy number variation

A fine-tiling Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) covering the entire chromosome 6 was performed on one affected individual from the large French-Canadian family (subject IV-22). We used three different arrays with a probe density of 1/4,000 bp, 1/8,000 bp and 1/20,000 bp (NimbleGen)<sup>122</sup>. We also performed a whole-genome genotyping and CNV analysis by using human 610-quad beadchip (Illumina®)<sup>123, 124</sup>. One or affected individuals from each of the other three families (Family BRE-01, subjects III-10 and III-6, family NAP-01, subject III-2, and family FRE-394, subject II-2) were analyzed by a custom array CGH spanning the region *D6S272* and *D6S434* with a mean probe density of 1/5,000 bp (Agilent).

## 2.6 Results

### 2.6.1 Phenotype of ataxia associated with Erythrokeratodermia in the French-Canadian family

The summary of the detailed clinical examination performed in 15 living affected individuals of the French-Canadian family (Figure 12) is shown in Supplementary Table I. As previously reported, the skin lesions consisted in patches of erythemas and hyperkeratosis<sup>105</sup>. These lesions varied in severity according to season and use of skin lotion but were generally mild in the majority of cases. The most important lesions were on the back of the hands and feet, the elbows and ankles, the knees and the external ears. Occasionally, the entire lower extremities and buttocks were affected (Figure 13). In all patients, hair, nails and scalp were normal. No hearing impairment was detected. The onset of ataxia usually occurred in the fourth or fifth decade, except for four individuals where the disease manifested in the third decade (mean of  $55.3 \pm 17.9$  years). There was no anticipation. The progression of gait disturbance is very slow, with only three individuals severely affected necessitating walking devices. All but one individual with ataxia (V-10, 60 years old) exhibit skin lesions. MRIs obtained in individuals with mild or moderate ataxia ( $n = 7$ ) showed cerebellar and pontine atrophy (Figure 13). In these affected individuals, the atrophy was more severe in the vermis than in the cerebellar hemispheres. In turn, individuals with EK lesions without ataxia had normal MRI ( $n = 3$ ). Individual V- 29 with EK lesions and very mild ataxia also exhibited cerebellar hypometabolism on FDG-Positron

Emission Tomography scan (Figure 13). EMG obtained in eight affected members disclosed a mild axonal peripheral neuropathy in half ( $n = 4$ ), including one individual with EK lesions only. Individual V-23 who bears the disease haplotype does not exhibit any neurological disturbance, nor skin lesions (Figure 12) suggesting incomplete penetrance of the gene.

### 2.6.2 Phenotype of other SCA families

In all the affected cases of the BRE-01 pedigree (Figure 14), the initial symptoms were truncal ataxia and gait disturbances. Nystagmus was always present (8/8, 100%). As in the French-Canadian family, the onset of symptoms was above 30 years old with very slowly progression of gait disturbance (Tableau VI). During the clinical course, patients were able to walk until 50 years of age. Dysarthria then became evident ( $n = 7/8$ ) as well as limb ataxia ( $n = 5/8$ ), diplopia ( $n = 2/8$ ), mild axonal neuropathy ( $n=1$ ) and mild sensory ( $n=1$ ). In contrast to the French-Canadian family, skin lesions were not detected. Brain MRI, in the moderate and severe stages, has revealed cerebellar atrophy without brainstem involvement (Tableau VI). In mild disease stages, MRI was within the normal range but brain FDG-Positron Emission Tomography reported cerebellar hypometabolism (IV-1). Compared to the FC and BRE-01 families, the affected individuals of the FRE-394 pedigree exhibited more severe impairment of gait disturbance, earlier onset of symptoms (below 40 years old) and more complex phenotype with pyramidal involvement, slow saccades and/or gaze limitation in all cases (Figure 15A and Tableau VI). Two patients were bedridden after 38 and 39 years of disease duration and two others were wheelchair bound after 10 and 15 years of disease duration respectively. Nystagmus, mild axonal neuropathy were occasionally detected. In three cases, dystonic postures were also observed. In contrast to the French-Canadian family, skin lesions were not detected. Brain MRI in one case revealed cerebellar atrophy (Tableau VI). Affected individuals of the NAP-01 family (Figure 15B) also exhibited early onset of gait disturbance (below 30 years old), with mild to moderate progression of gait disturbance (Tableau VI). Pyramidal signs were found in all patients with spasticity in four affected individuals ( $n = 4/5$ ). Again, skin lesions were not detected. Brain MRI revealed cerebellar atrophy ( $n= 3/5$ ) and cortical atrophy (III-3) (Tableau VI).

### 2.6.3 SCA34 maps to chromosome 6q13-q16.1

We first excluded the French-Canadian family with ataxia and EK for linkage at the EKV1/EKV2 and MEDNIK loci (data not shown). Genome-wide linkage analysis in the French-Canadian family revealed three positive chromosomal regions with LOD score superior to 1.5, respectively on chromosomes 1, 6 and 7 (Figure 17). Further analysis with additional markers including additional affected individuals confirmed linkage to chromosome 6 with a maximum LOD score of  $Z = 5.33$  at  $\theta = 0$  found for marker *D6S452* (Figure 12). Haplotype analysis allowed defining a candidate locus of 46.8 Mb between markers *D6S459* and *D6S417* at chromosome 6p12.3-q16.1 (Figure 16A). Among 20 families from the EUROSCA consortium subjected to a genome scan, the BRE-01 family showed multipoint LOD score reaching the maximal expected value of  $Z = 2.1$  on chromosome 6 and 10, as well as  $Z = 1.3$  to 1.7 on chromosomes 2 and 18 respectively. Further analysis with microsatellites markers including additional individuals, showed perfect segregation of the disease haplotype on chromosome 6 locus only, with a maximal two-point LOD score of  $Z = 2.05$  at  $\theta = 0$  for marker *D6S458* (Figure 14) and a significant multipoint LOD score of 3.4 to this region. Considering the key recombinants of the French-Canadian and BRE-01 families, the candidate gene interval locus is 21.7 Mb, defined by flanking markers *D6S1557* and *D6S417*. A total of 101 genes maps to this candidate interval common to all the SCA34 families, including 12 good candidates based on the pattern of expression and known function (Tableau VII). Two other EUROSCA families showed positive linkage to the same chromosomal region, although this locus was not unique and LOD score values below the threshold of 3.0. Family FRE-394 showed 11 chromosomal regions with positive multipoint LOD scores ranging from 0.8 to 2.2, ( $Z = 0.9$  overlapping SCA34) whereas family NAP-01 showed five positive regions with LOD score values ranging from 1.1 to 1.8 ( $Z = 1.8$  overlapping SCA34). None of the other 17 EUROSCA families presented with positive LOD scores to the SCA34 locus. Combining the multipoint linkage data of all the potentially linked families, a maximum LOD score of  $Z = 8.5$  was obtained between markers *D6S459* and *D6S1632* and  $Z = 9.0$  between markers *D6S460* and *D6S458* (Figure 16B). Based on key recombinants, the common disease locus would be located between markers *D6S460* and *D6S417* (12.2 Mb; Figure 16A). Overall, our data are compatible with the identification of a novel locus for autosomal dominant spinocerebellar ataxia, that we named SCA34.

## 2.6.4 Screening for candidate genes in the French-Canadian family

Array CGH analysis within the candidate locus in all the linked families, and extended to the entire chromosome 6 did not reveal deletions/duplications. We also screened candidate genes mapping to the 46.9 Mb locus found in the French-Canadian family (Table VII). No mutation was found in these genes. Finally, we did not find disease-associated expansions of CAG/CTG repeats in the French-Canadian family.

## 2.7 Discussion

### 2.7.1 SCA34 maps to chromosome 6q13-q16.1

In this study, we took advantage of two large families to map the SCA34 locus on chromosome 6q13-q16.1. We also validated this novel SCA34 locus in two additional European families with autosomal dominant cerebellar ataxia. Each of these latter families has a LOD score peak in this region, although not significant. The selection of *a priori* linked families to chromosome 6 locus may be associated with an ascertainment bias. However, the perfect segregation of the disease haplotype in these latter families, together with the highly positive multipoint LOD scores obtained by combining all the linked families ( $Z = 9.0$ ) are strongly supportive for the existence of a SCA34 gene. Among the EUROSCA families, if the two small families are truly linked to SCA34, we can estimate a maximal frequency of SCA34 to be less than 15% (3 out of 20 families linked). However, because the small European families could be falsely linked to SCA34 locus, we suggest to consider the candidate region between markers *D6S1557* and *D6S417* (21.7 Mb), based on key recombinants observed in the large FC and BRE-01 families. Notwithstanding the skin lesions, two out of the four SCA34 families (FC and BRE-01) exhibit similar neurological phenotype characterized by slowly progressive limb and gait ataxia, starting generally in the fourth or fifth decade. Except for mild peripheral axonal polyneuropathy found in older individuals, there is no other significant neurological impairment in these latter families. The brain MRI revealed striking age-dependent cerebellar atrophy in many affected individuals. According to Harding's classification, the neurological syndrome found in affected individuals from both significantly linked families

is thus compatible with pure autosomal dominant cerebellar ataxia (ADCA type III) (Tableau VI) <sup>14</sup>.

### **2.7.2 The Giroux-Barbeau family exhibits a unique neurocutaneous syndrome**

In this study, we revisited the clinical phenotype of the large French-Canadian family described by Giroux and Barbeau in 1972. To our knowledge, the association of skin lesions with SCA is unique to this family. On the other hand, keratoderma of various types are frequently associated with neurological disorder including peripheral neuropathy, deafness, and mental retardation <sup>85, 93-96, 100, 101</sup>. Moreover, ichthyosis, a skin lesion closely related but distinct to erythrokeratoderma (EK and EKV) is also frequently associated various neurological impairment, including ataxia <sup>98, 125, 126</sup>. Both ichthyosis and erythrokeratodermas are descriptive terms used for a large clinically and etiologically heterogeneous group sharing either generalized scaling of the skin (ichthyosis) or the co-existence of erythema and hyperkeratosis usually without obvious scaling (erythrokeratoderma). These later disorders are characterized by abnormal keratinisation, differentiation and desquamation of the epidermis.

### **2.7.3 Towards the identification of SCA34 gene**

In this study, we screened 12 candidate genes, excluded trinucleotide expansions, and copy number variations by array CGH. Despite these efforts, we cannot formally exclude that a mutation in the introns, in promoters or in splice site of cryptic exons of one of these genes could be responsible for the disease. Identification of additional families linked to this locus should allow better delineation of the candidate gene region and eventually facilitate the identification of the gene. An intriguing question raised by this study is why the FC family is still the unique family exhibiting the combination of cerebellar ataxia and EK? Because the skin manifestations may vary over time and are sometimes subtle, the cutaneous syndrome may have been overlooked in clinical practice. However, since we did not find EK lesions in the other SCA34 families despite detailed examinations, it is more likely that the skin lesions may be present in some families, and not in others. This could be notably explained by mutations in differentially expressed isoforms of the same gene, as described in the *GJB3* gene <sup>85, 94</sup>. Alternatively, a single or a tandem of mutations implicating two independent genes at the same chromosomal region

may be responsible for this unique combination of diseases. Indeed, although the dermatological and neurological phenotypes so far segregate almost perfectly in the FC family, the linked region remains very large. Finally, despite the negative copy number analysis shown in this study, we cannot exclude that a microdeletion implicating several gene may be responsible for this unique neurocutaneous syndrome.

The hereditary ataxias are a heterogeneous group of neurological diseases whose common characteristic is the progressive degeneration of a portion of the central nervous system, the cerebellum. The cause of many forms of the disease has not yet been determined. Clearly, the identification of additional genes and molecular mechanisms causing hereditary ataxias will provide a better understanding of the disease and could lead to specific treatment. Should SCA34 and EK be caused by a mutation in the same gene, the identification of keratoderma in families with SCA may offer additional clue towards the identification of genetic and molecular mechanisms underlying cerebellar degeneration.

## **2.8 Acknowledgements.**

The authors are grateful to Dr Soraya Medjbeur for clinical examinations, to Micheline Gravel for collection of the French-Canadian family, and to Dr Anne Boland for her help in the genome scan. We received financial support from the European Union (to the EUROSICA consortium, coordinator, Prof Olaf Riess) and the French Association Connaitre les Syndromes Cérébelleux (to the SPATAX network, coordinator, Dr Alexandra Durr). P.C. is a Clinical-Scientist for the Canadian Institutes of Health Research. Alfredo Brusco received telethon grant GGP07110, and Regione Piemonte "Ricerca Sanitaria Finalizzata



**Table VI.** Clinical features of affected members of the French-Canadian and European families

Family	ID	Sex	Age	Clinical manifestations										
				Age of onset	Gait ataxia	Limb ataxia	Dysarthria	Nystagmus	Severity	Skin Lesions	Others	MRI	EMG	
FC	IV-2	M			+					mild	+			
FC	IV-4	F	82	50	+					moderate	+			
FC	IV-5	M	84	72	+	+	+			moderate*	+	SP, DTR, AR	CeA, CoA and PA	mild PAN
FC	IV-12	M	79	65	+	+	+	+		moderate*	+	SP, DTR		mild PAN
FC	IV-18	M	71	60	+	+	+	+		mild	+	SP, DTR	CeA, CoA, PA	mild PAN
FC	IV-20	F	70	65	+	+	+	+		mild	+	SS, mild PT		
FC	IV-22	M	68	48	+	+	+			moderate	+	SP, DTR	CeA and PA	Normal
FC	V-3	M	63	60	+	+		+		mild	+	SP		Normal
FC	V-4	M	52	30	+					mild	+			
FC	V-5	F	60	53	+					mild	+			
FC	V-8	M	40	40	+	+	+	+		mild	+		CeA, CoA, and PA	

Family	ID	Sex	Age	Age of onset	Gait ataxia	Limb ataxia	Dysarthria	Nystagmus	Severity	Skin Lesions	Others	MRI	EMG
FC	V-10	F	60	55	+	+			mild	-	SS, DTR		
FC	V-26	F	47	35	+	+			mild	+	SS, DTR	CeA, CoA and PA	Normal
FC	V-27	M	40		-					+		Normal	
FC	V-28	M	42	37	+			+	mild	+		mild CeA	
FC	V-29	F	44	44	+				Very mild	+	DTR	Normal	mild PAN
FC	VI-1	M	32	32	-			+	mild	+		Normal	Normal
FC	VI-2	F	30		-					+			
BRE-01	II-6	M	80	50	+	+	+	+	moderate	-	SS, Dy		
BRE-01	III-1	F	72	40	+	+	+	+	moderate	-	SP, O, Dy	CeA	
BRE-01	III-2	F	75	34	+	+	+	+	moderate	-	SS, Di, Dy	CeA	
BRE-01	III-6	F	56	45	+	-	+	+	moderate	-	SS, Di	CeA	mild PAN

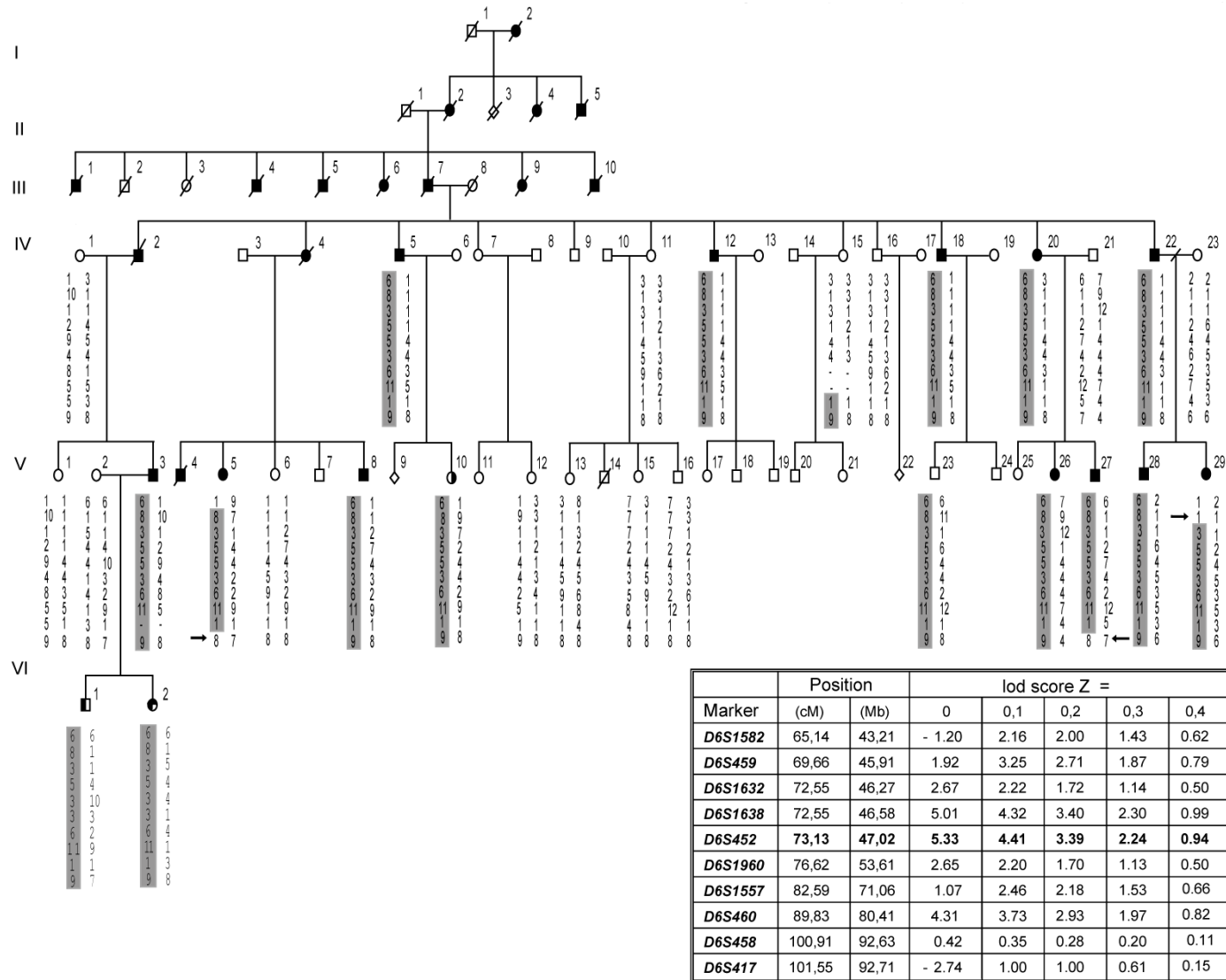
Family	ID	Sex	Age	Age of onset	Gait ataxia	Limb ataxia	Dysarthria	Nystagmus	Severity	Skin Lesions	Others	MRI	EMG
BRE-01	III-10	F	56	38	+	+	+	+	moderate	-	SS, Dy	CeA, CoA	mild PAN
BRE-01	IV-1	F	43	38	+	+	+	+	mild	-	SS	CeA	normal
BRE-01	IV-2	M	41	38	+	-	+	+	mild	-	SS		
BRE-01	IV-3	M	30	30	+	-	-	+	very mild	-	-		
NAP-01	II-3	F	66	26	+	+	+	+	moderate**	-	SS, SP, SPA, BTR, CLO, BA, WEA	Mild CeA	slight PAN
NAP-01	III-1	F	36	30	+	+	+	+	mild	-	SP, BTR, SPA, CLO, BA	Mild CeA	Normal
NAP-01	III-2	F	41	26	+	+	+	+	mild	-	SP, SPA, BTR, BA, WEA	Mild CeA	Normal
NAP-01	III-3	F	34	26	+	+	+	+	mild	-	BTR, CLO, BA	Mild CoA	
NAP-01	IV-2	M	15	13	+	-	-	+	very mild	-	BTR, SPA, BA, CLO		
FRE-394	III-2	F	47	33	+	+	+	+	severe**	-	SS, BTR, D, Weakness LL, BA unilateral	CeA, CoA	Normal

Family	ID	Sex	Age	Age of onset	Gait ataxia	Limb ataxia	Dysarthria	Nystagmus	Severity	Skin Lesions	Others	MRI	EMG
FRE-394	III-1	F	48	37	+	+	+	-	severe**	-	SS, MFH		AN
FRE-394	II-1	M	63	53	+	+	+	-	mild*	-	BA, SS and vertical gaze limitation		
FRE-394	II-4	F	70	32	+	+	severe	-	severe***	-	SS, no voluntary eye gaze, D, BA bilateral, Pes cavus		
FRE-394	II-2	F	76 (died)	37	+	+	no speech	-	severe***	-	SS, vertical and horizontal supranuclear O, D, BA bilateral		

The clinical description of affected individuals of the first three generations of the French-Canadian family has been already described by Giroux & Barbeau<sup>105</sup>.

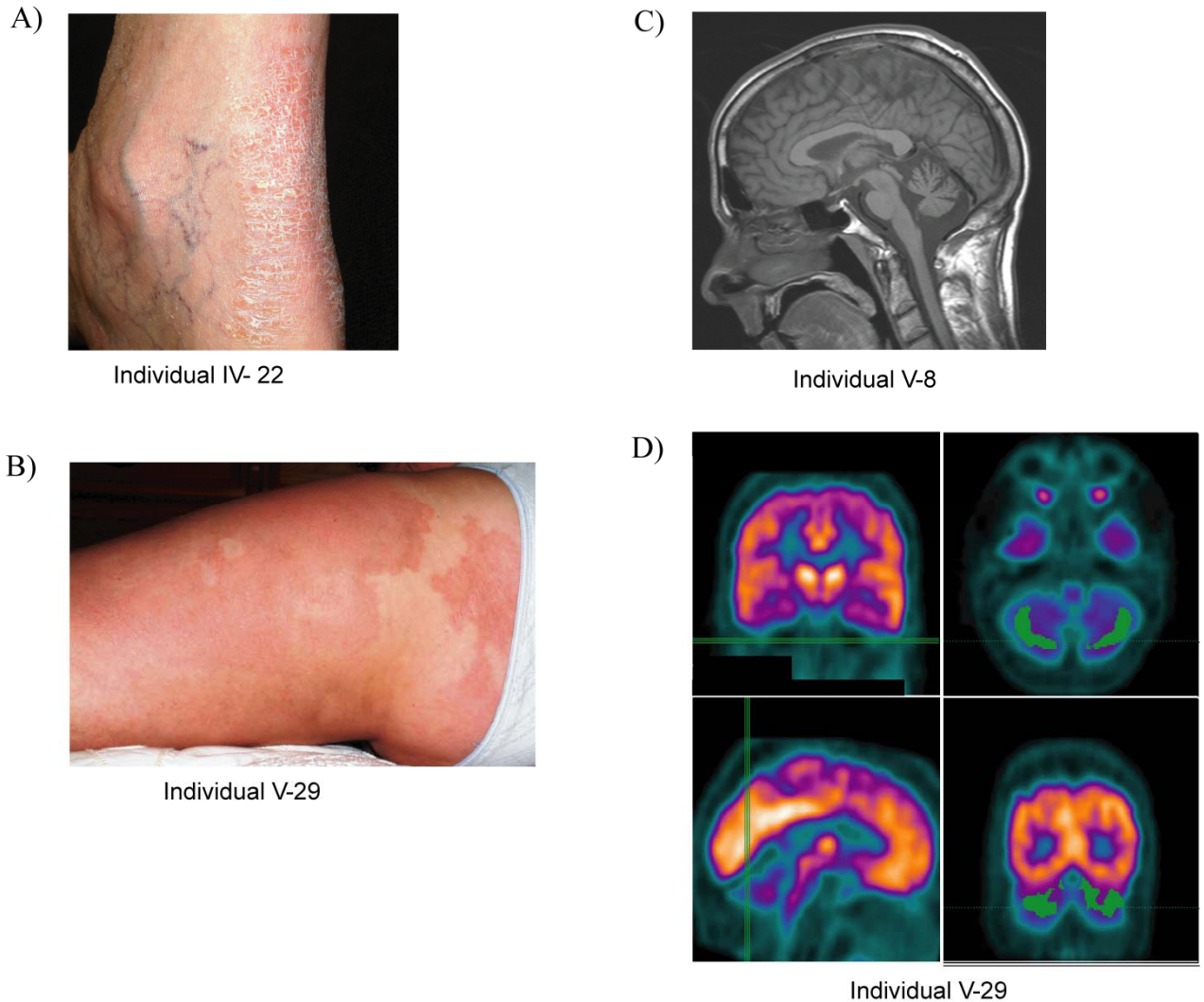
**ID** = individual; **SP** = slow pursuit; **SS** = slow saccade; **Di** = diplopia; **Dy** = dysphagia; **D** = Dystonia; **MFH** = Marked facial hypomimia; **O** = ophthalmoplegia; **DTR** = decreased tendon reflexes; **BTR** = brisk tendon reflexes; **SPA** = spasticity; **WEA** = weakness; **BA** = Babinski; **CLO** = clonus; **CeA** = cerebellar atrophy; **CoA** = cortical atrophy; **PA** = pons atrophy; **AR** = axial rigidity; **PT** = postural tremor; **PAN** = peripheral axonal neuropathy; **AN** = axonal neuropathy

- = absent; + = present; \* = walker or cane; \*\* = wheelchair bound; \*\*\* = bedridden.

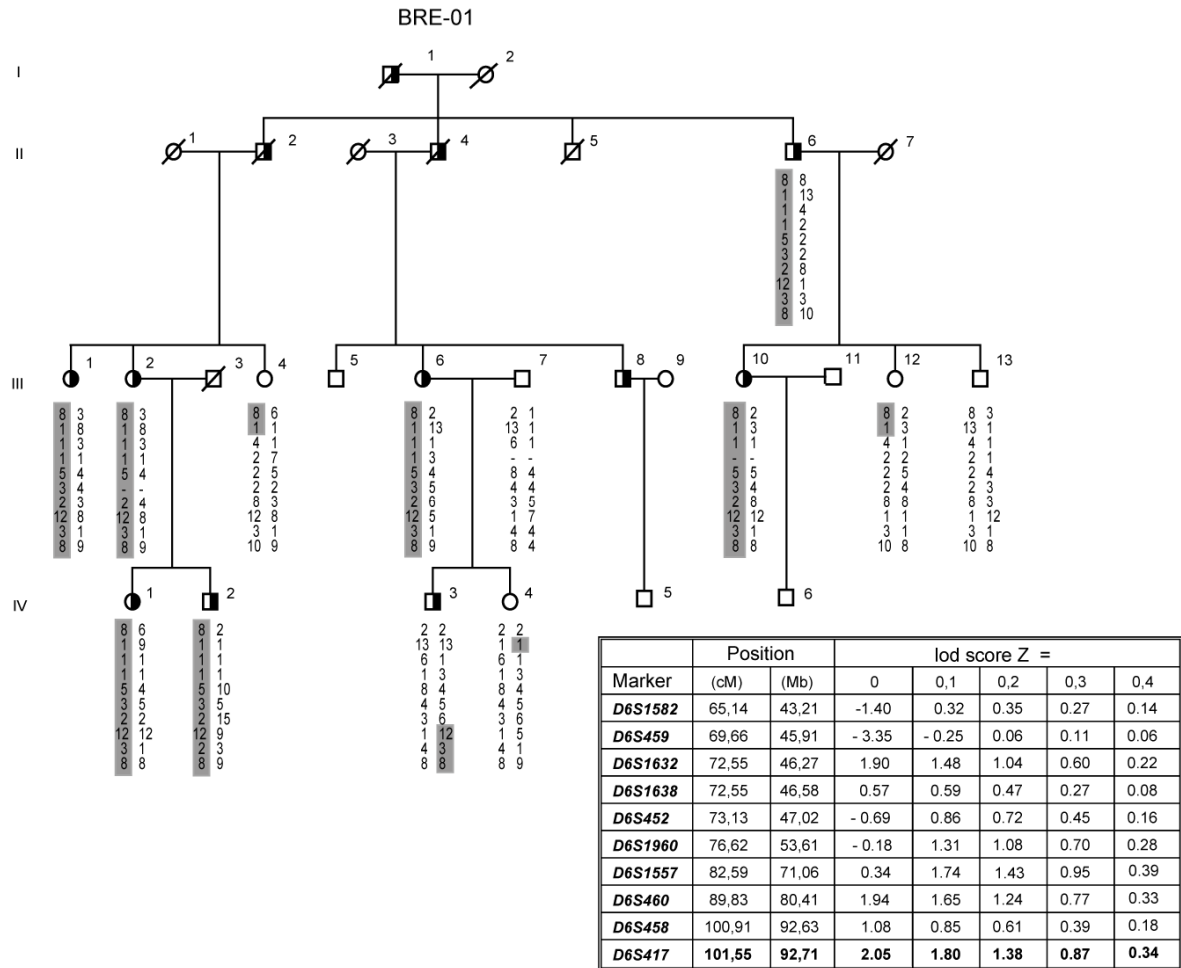


**Figure 12.** The large French-Canadian family with ataxia and erythrokeratoderma maps to chromosome 6p12.3-q16.1. The disease haplotype is reconstructed from 10 microsatellite markers and boxed in grey. Centromeric (individual V-29) and telomeric (individuals V-5 and V-27) key recombination events are indicated with arrows, and define the disease locus between markers *D6S459* and *D6S417*. An asymptomatic individual (V-23, 46yrs) bears the disease haplotype suggesting an incomplete penetrance or later age of onset for the disease. Inset shows position of the markers and two-point LOD scores. Dashes are used for untyped marker.

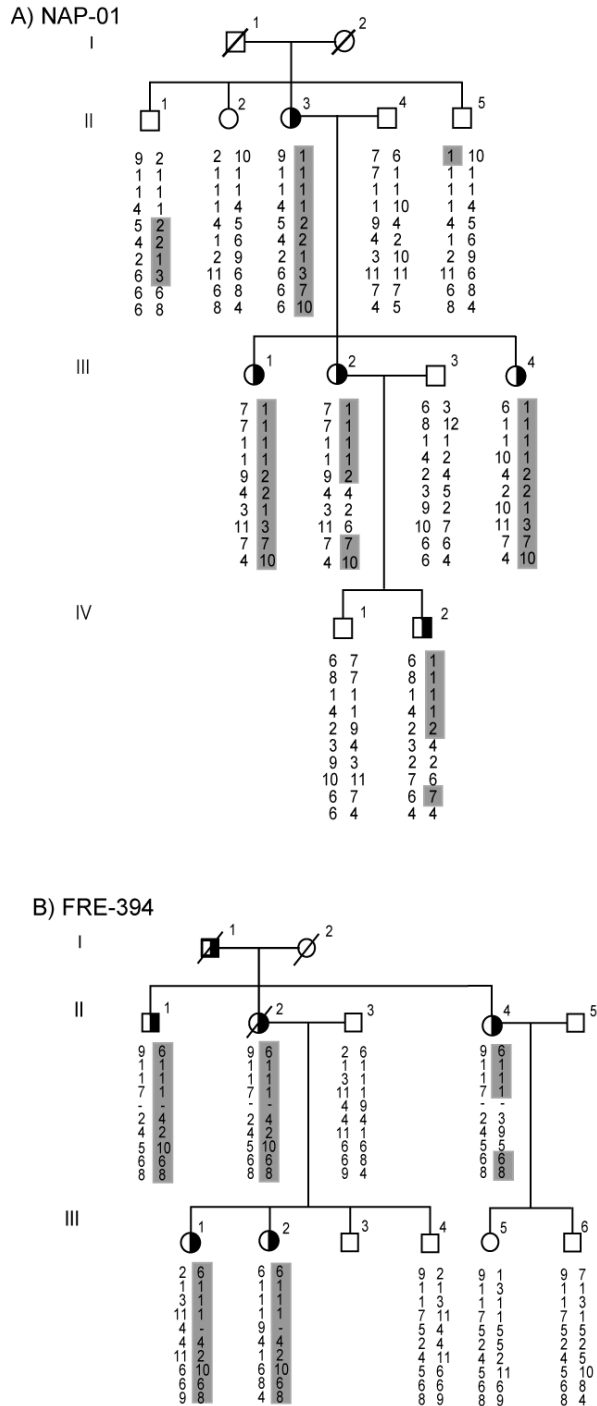
Open figures = unaffected; closed half left figures = erythrokeratoderma only; closed half right figures = ataxia only; closed figures = ataxia and erythrokeratoderma; closed upper right quarter figure = nystagmus only; square = male; circle = female; / = deceased.



**Figure 13. Clinical phenotype of the French-Canadian family.** A) Hyperkeratosis of the heel and ankle; B) Red patches over the thigh. The patches have a characteristic geometric symmetry in general; C) MRI showing severe atrophy of the cerebellum and the pons (V-8); D) Brain FDG- Positron Emission Tomography shows hypometabolism of the cerebellum in an individual (V-29) with very mild ataxia but without cerebellar atrophy, suggesting an earlier stage of the disease.

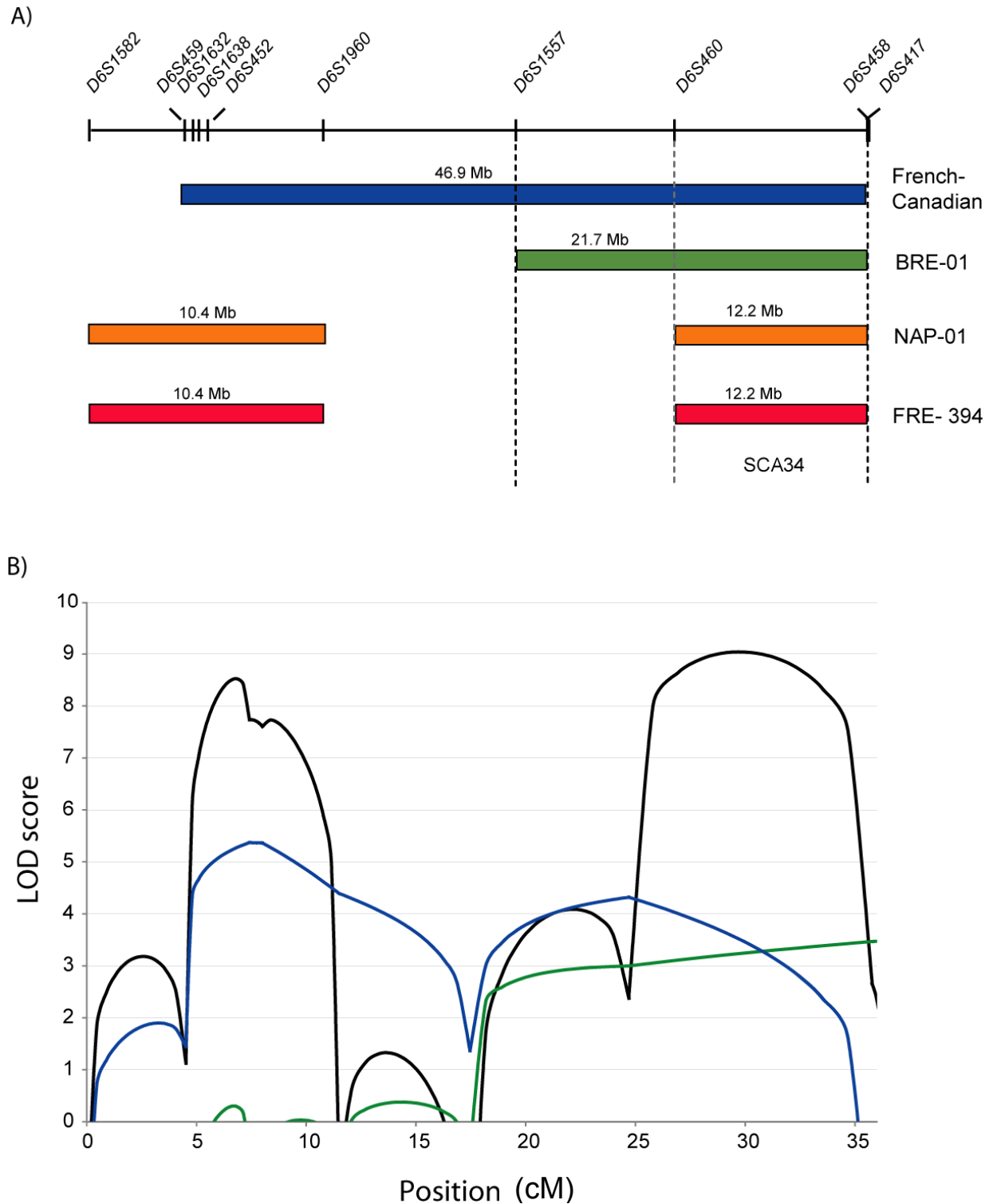


**Figure 14.** The BRE-01 family of Italian origin maps to chromosome 6q13-q16.1. The disease haplotype is reconstructed from 10 microsatellite markers and boxed in grey. A centromeric key recombination event is found in subject IV-3. Inset shows position of the markers and two-point LOD scores. Combined with the French-Canadian family, this key recombinant allows the definition of the disease locus between markers *D6S1557* and *D6S417*. Dashes are used for untyped marker. Open figures = unaffected; closed half right figures = ataxia; square = male; circle = female; / = deceased.

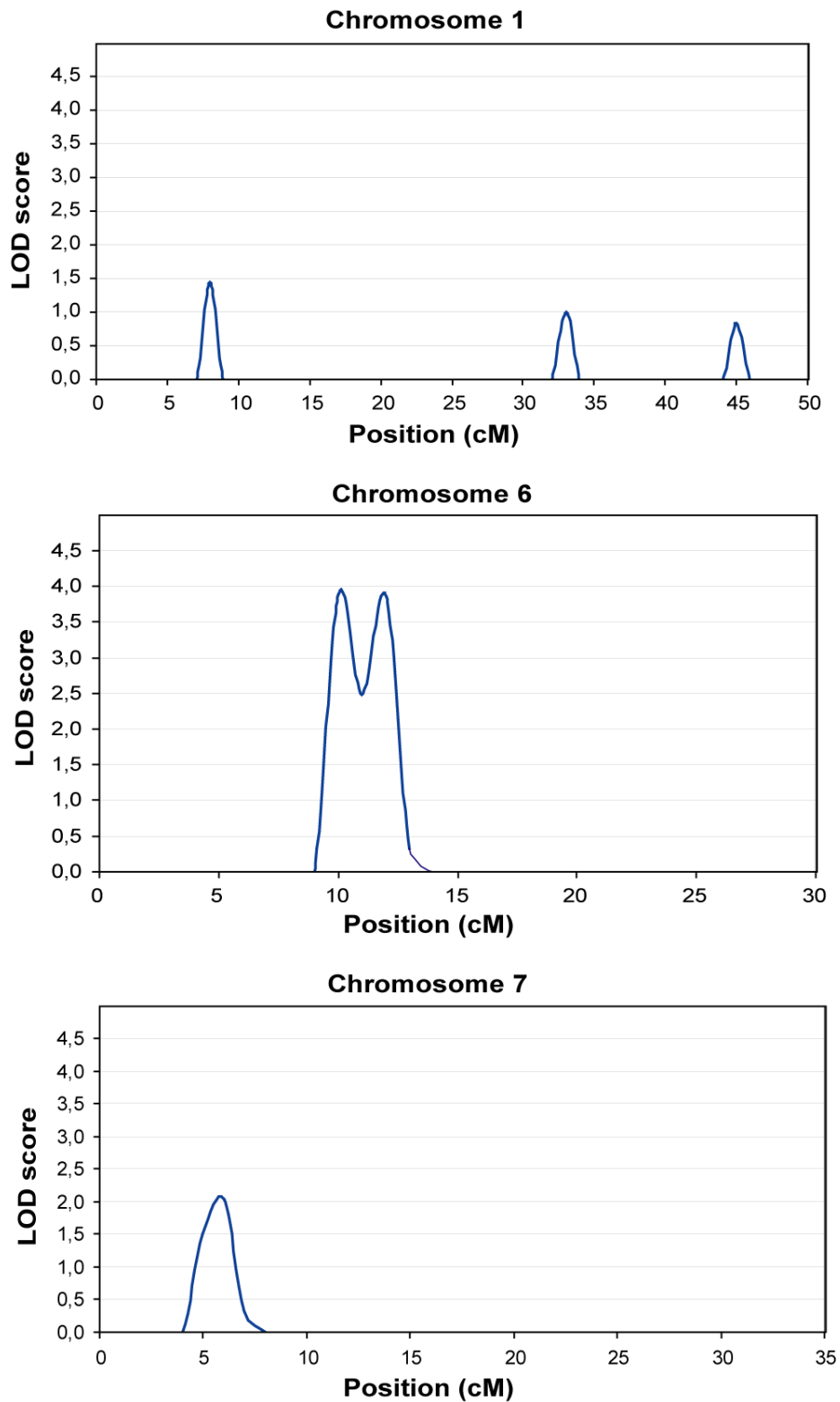


**Figure 15. Additional European families map to the SCA34 locus.** The disease haplotype is reconstructed from the same 10 microsatellite markers and boxed in grey. NAP-01 and FRE-394 are of Italian (Naples) and French origin respectively. Dashes are used for untyped marker. Open figures = unaffected; closed half right figures = ataxia; square = male; circle = female; / = deceased





**Figure 16. Combined multipoint LOD score analyses of the SCA34 locus.** A) The minimal candidate region defined by recombination events is shown with coloured bars for each of the five studied families; B) Multipoint LOD score analyses for markers spanning the candidate gene region. The results are shown for the French-Canadian family (blue) and Italian family (green) alone. The combined analysis of all the families (black) allow us to determine the maximum values of LOD score of 8.5 between markers *D6S459* and *D6S1632* and 9.0 between markers *D6S460* and *D6S417*.



**Figure 17. Genome-wide linkage analysis of the French-Canadian family reveals three chromosomal regions with LOD score superior to 1.5**

**Table VII.** List of the candidate genes at the SCA34 locus

<b>Gene</b>	<b>Position</b>	<b>Skin</b>	<b>Cerebellum</b>	<b>Description</b>
SNAP91	chr6:84,319,332-84,475,831		x	phospholipids binding
GJB7	chr6:88,049,419-88,095,715	x		Connexin
GABRR2	chr6:90,023,958-90,081,686	x	x	gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, rho 2
UBE2J1	chr6:90093063-90119338			ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1
RRAGD	chr6:90134313-90178484		x	Ras-related GTP binding D
ANKRD6	chr6:90199616-90400124			ankyrin repeat domain 6
LYRM2	chr6:90398664-90405195			LYR motif containing 2
MDN1	chr6:90409952-90586163	x	x	nuclear chaperone
CASP8AP2	chr6:90,596,379-90,640,876		x	caspase 8 associated protein 2
GJA10	chr6:90,660,909-90,662,540	x	x	connexin
BACH2	chr6:90692969-91063182			Transcription regulator protein
MAP3K7	chr6:91282074-91353628			mitogen-activated protein kinase

## Chapitre 3

### 3.1 Gènes candidats

Suite à l'identification du locus au chromosome 6, l'approche par séquençage de gènes candidats a été la première étape en vue de l'identification du gène causant SCA34. Notre premier intervalle candidat était défini par la famille canadienne-française atteinte d'ataxie spinocérébelleuse associée aux lésions cutanées, sur le chromosome 6p12.3-q16.2. Suite à la réception de l'ADN des familles européennes atteintes d'ataxie spinocérébelleuse, nous avons été en mesure d'établir un nouvel intervalle candidat au locus 6q13-q16.1. Nous avons priorisé les gènes selon leur expression dans les tissus relatifs aux kératodermies et/ou troubles neurodégénératifs (e.g. la peau, cervelet, et le système nerveux central); selon le potentiel biologique, l'homologie de séquence et/ou fonction similaire à des gènes responsables de d'autres formes d'ataxie et d'érythrodermie autant chez l'humain que dans des modèles animaux. Nous avons identifié des variants dans plusieurs gènes, mais tous avaient déjà été répertoriés dans la littérature comme étant non pathogènes. Cette section expose les gènes candidats choisis pour le séquençage. Pour chaque gène, nous avons séquencé un individu atteint et un individu sain de la famille CF. Lorsqu'un gène possédait plusieurs isoformes, nous les séquencions systématiquement. Si nous détectons une mutation non répertoriée, la ségrégation familiale ainsi que la présence ou absence du variant dans les familles européennes nous permettaient d'exclure ou inclure le potentiel pathogène d'un variant.

### **3.1.1 Séquençage des gènes candidats pour le locus de la famille canadienne-française sur le chromosome 6p12.3-q16.2**

Avant l'identification de la région SCA34 commune aux familles canadiennes et européennes, nous avons commencé l'analyse des séquences des gènes candidats dans la région candidate de 46,9 Mb trouvés pour la famille canadienne-française. Après avoir défini l'intervalle candidat initial au locus 6p12.3-q16.2 contenant plus de 200 gènes. Pour les gènes choisis, nous avons séquencé tous les exons ainsi que 50bp à la frontière intro/exon des gènes candidats à partir de l'ADN génomique. Lorsque les exons dépassaient 700 pb, nous les divisons en plusieurs petits fragments chevauchant afin de faciliter l'amplification et la réaction de séquençage. Nous avons séquencé tous les variants d'épissage de chacun des gènes candidats

#### **3.1.1.1 Séquençage des gènes GJB7 et GJA10**

Cette région contient notamment deux connexines *GJB7* et *GJA10*, codant respectivement pour les protéines CX25 et CX62. Malgré leur mode d'expression respectivement au niveau du placenta, du cœur et muscle squelettique, nous devons éliminer la possibilité d'une mutation dans l'un de ces gènes (section 1.7.1). Nous avons identifié des variants dans ces deux gènes, toutefois, ils avaient été précédemment répertoriés dans les bases de données (Tableau VIII).

#### **3.1.1.2 Séquençage du gène SNAP91**

Le gène *SNAP91* (synaptosomal-associated protein) fait partie de la famille des protéines SNARE impliquées dans la fusion des vésicules. La fonction exacte du gène est peu connue, mais l'intérêt porté pour celui-ci est en raison de *SNAP29* qui est un régulateur de la fusion des vésicules de membrane. Une mutation dans ce gène cause le syndrome CEDNIK pour «dysgénésies cérébelleuses, neuropathie, ichtyose, and kératodermie »<sup>98</sup>. Les gènes impliqués dans le transport vésiculaire semblent être

récurrents dans différents troubles neurocutanés. En effet, le syndrome MEDNIK est aussi causé par une mutation dans un gène ayant un rôle dans le trafic des vésicules, soit *AP1S1* (adaptor-related protein complex 1, sigma 1), une protéine adaptatrice <sup>101</sup>. Nous avons identifié des variants bénins pour ce gène (Tableau VIII).

### 3.1.1.3 Séquençage du gène *DST* (*BPAG1*)

Le gène *DST* (dystonin) code pour un membre de la famille des plakines. Les plakines sont des protéines de structure liant les membranes cellulaires aux filaments intermédiaires du squelette des cellules, aux filaments d'actine et aux microtubules. Le gène *BPAG1*, qui contient plusieurs domaines spectrines, a été considéré comme un bon candidat, en raison du profil d'expression de ses différents isoformes (par exemple, le cerveau, la peau) et l'homologie de séquence avec le gène responsable de SCA5 (Tableau II). En effet, l'isoforme primaire de *BPAG1* est fortement exprimé dans le système nerveux central <sup>127, 128</sup>, alors que des mutations dans *BPAG1* ont été rapportées pour provoquer à la fois la dégénérescence des neurones sensoriels et une fragilité de la peau chez la souris (souris *dt*), phénotype qui se rapproche fortement à SCA34<sup>129</sup>. De plus, un travail sur l'identification des antigènes cibles dans la maladie auto-immune de pemphigoïde bulleuse chez l'homme a conduit à la découverte de la séquence codante pour cette protéine structurale largement exprimée dans les cellules épithéliales, appelée antigène pemphigoïde bulleuse 1 (*BPAG1*). Cette protéine semble participer à l'attachement des filaments intermédiaires sur le site des hémidesmosomes dans les cellules kératinocytes de l'épiderme. Une perturbation dans la fonction de base de *BPAG1* pourrait aboutir à la formation de cloques cutanées observées chez les patients atteints de pemphigoïde bulleuse <sup>130</sup>. L'isoforme principal de dystonin est au niveau du cerveau. Dans les neurones, *DST* semble avoir une importance pour la réticulation des filaments d'actine. Dans une bonne proportion des maladies neurologiques, il est possible d'observer l'agrégation de neurofilaments, l'une des particularités retracées dans les neurones atteints des souris avec une mutation spontanée de la dystonin (*dt*) <sup>129</sup>. Plusieurs variants

ont été identifiés dans les différents isoformes de *DST*, mais tous étaient répertoriés comme non pathogène (Tableau VIII).

#### **3.1.1.4 Séquençage du gène RIMS1 (RAB3A)**

Le gène *RIMS1* (regulating synaptic membrane exocytosis 1) est un membre de la superfamille des gènes RAS, une protéine qui régule l'exocytose des vésicules synaptiques et la plasticité synaptique <sup>131</sup>. L'expression est limitée au cerveau et la rétine. Une mutation a été identifiée dans ce gène causant une rétinite pigmentaire selon un mode de transmission autosomique dominante <sup>132</sup>. Ce gène comporte plusieurs isoformes. Neuf variants ont été identifiés dans ce gène. Un seul de ceux-ci n'était pas répertorié (Tableau VIII), mais lorsque nous avons testé la mutation dans la famille CF, elle ne ségréguait pas avec la maladie.

**Tableau VIII.** Bilan des variants des gènes candidats la famille canadienne-française pour le locus sur le chromosome 6p12.3-q16.2

<i>Gène</i>	<i>Séquence de référence</i>	<i>Exon</i>	<i>Position génomique</i>	<i>Type de variation</i>	<i>Nomenclature</i>	<i>Changement d'acide aminé</i>	<i>SNP</i>
<b>GJB7</b>	NM_198568	Exon 3	g.chr6: 88051291	faux-sense	c.59C>T; C/T	Thr20Ile	rs4707358
		Exon 3	g.chr6: 88050734	faux-sense	c.616T>C ; C/T	Phe206Leu	rs6934603
		3'UTR	g.chr6: 88050480		g.25813932G>A		rs3812130
		3'UTR	g.chr6: 88049809		g.25813261G>A		rs2240461
<b>GJA10</b>	NM_032602.1	3'UTR	g.chr6: 90662557		g.28426009T>A		rs7738845
<b>RIMS1</b>	NM_014989.3	Exon 4	g.chr6: 72866546	intron	g.10629998C>C/T		rs9360527
		Exon 5	g.chr6: 72946193	silencieuse	c.666A>G	Leu222Leu	rs2249021
		Exon 6	g.chr6: 72948978	silencieuse	c.1083A>G	Leu361Leu	rs2463730
		Exon 6	g.chr6:72949104	silencieuse	c.1209G>A	Ala403Ala	
		Exon9	g.chr6: 73004495	intron	g.10767947C>C/T		rs2807525
		Exon14	g.chr6: 73017234	intron	g.10780686C>C/A		rs6918073
		Exon15	g.chr6:73017943	intron	g.10781395G>A		rs3798274
		Exon16	g.chr6: 73019073	intron	g.10782525A>GA		rs9351902
		Exon23	g.chr6:73040844	faux-sense	c.3470C>C/T	Pro1157Leu	rs41265501
		<b>SNAP91</b>	NM_014841.1	5'UTR	g.chr6:84475725		g.22239177C>G
5'UTR	g.chr6: 84475372				g.22238824T>C		rs217282
Exon 1	g.chr6:84475267			intron	g.22238719G>C		rs217283
Exon 4	g.chr6: 84428944			del intronique	g.22192396delT		rs34529044
Exon 7	g.chr6: 84423107			in-del	84423106_84423107insTTC		rs3037027
Exon 17	g.chr6: 84360061			silencieuse	c.1551G>A	Pro517Pro	rs1033655
Exon 21	g.chr6: 84357716			silencieuse	c.1947C>C/T	Ser644Ser	rs2273363



Gène	Séquence de référence	Exon	Position génomique	Type de variation	Nomenclature	Changement d'acide aminé	SNP
DSTiso1	NM_183380.2	Exon 22	g.chr6: 84348858	intron	g.22112310T>A/T		rs1033653
		Exon 12	g.chr6: 56615094	intron	g.56615094A>G/A		rs1024195
		Exon 37	g.chr6: 56571369	faux-sense	c.4901A>G	Gln1634Arg	rs4712138
		Exon 38	g.chr6: 56570799	intron	g.56570799C>T		rs9370541
		Exon 47	g.chr6: 56534890	Site d'épissage	c.7177+5G>A/G; g.56534890G>A/G		rs9367689
		Exon 52	g.chr6: 56525504	faux-sense	c.9154A>G	Thr3052Ala	rs4715631
		Exon 52	g.chr6: 56525241	faux-sense	c.9417G>A	Met3139Ile	rs4715630
		Exon 57	g.chr6: 56502132	intron	g.56502132A>G		rs9357922
		Exon 62	g.chr6: 56489871	intron	g.56489871C>T		rs4715626
		Exon 65	g.chr6: 56482713	intron	g.56482713G>T		rs9296849
		Exon 66	g.chr6: 56481495	faux-sense	c.12139G>A	Asp4047Asn	rs41271862
DSTiso1e	NM_001723.4	Exon 71	g.chr6: 56473773	intron	g.56473773T>C		rs4283892
		Exon 23	g.chr6: 56592717	faux-sense	c.4074G>A	Lys1922Lys	rs2230862
DST iso1eb	NM_020388.3	Exon 23	g.chr6: 56590760	faux-sense	c.6031G>C	Val2011Leu	rs6459166
		Exon 26	g.chr6: 56579954	silencieuse	c.5820G>A	Leu1940Leu	rs16888055
		Exon 26	g.chr6: 56579609	silencieuse	c.6165G>A/G	Thr2055Thr	rs45564536
		Exon 26	g.chr6: 56579361	faux-sense	c.6413C>T	Pro2138Leu	rs9382658
		Exon 26	g.chr6: 56578649	silencieuse	c.7125C>T	Asn2375Asn	rs13209548
		Exon 26	g.chr6: 56578510	faux-sense	c.7264A>T	Thr2422Ser	rs13194995

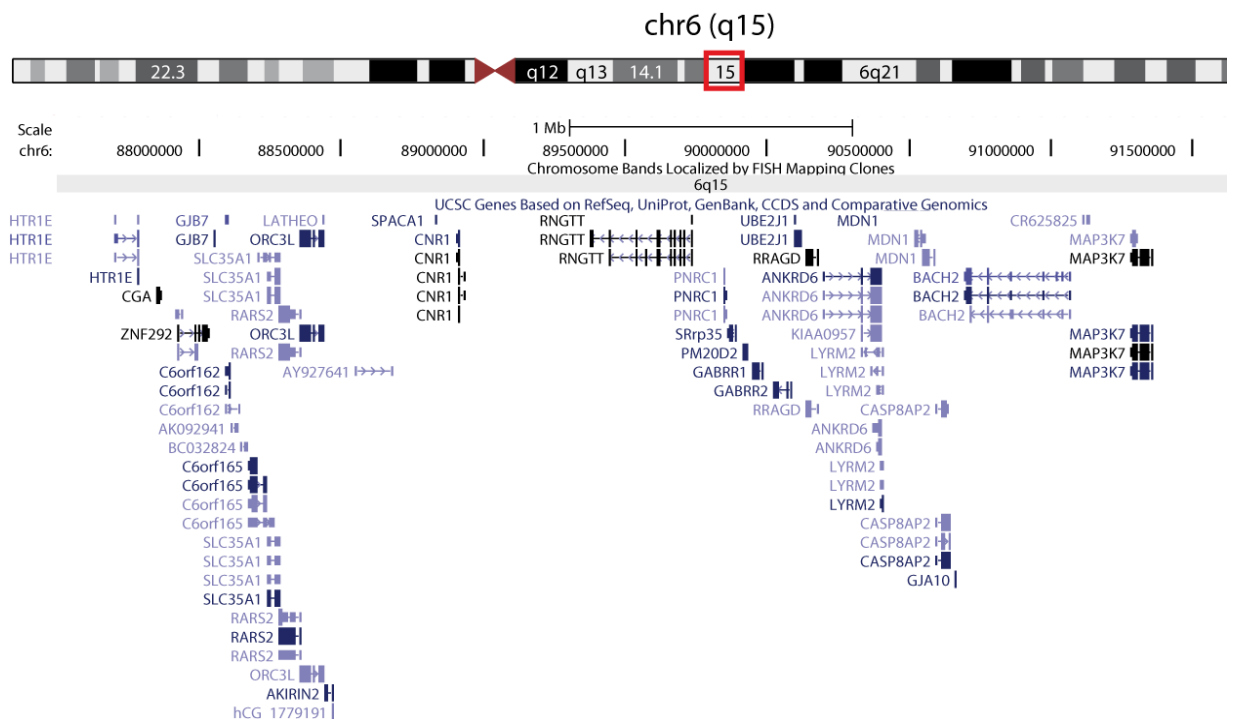
### 3.1.2 Séquençage des gènes candidats pour le locus SCA34 sur le chromosome 6q13-16.1

Avec l'aide du consortium EUROSCA, un réseau européen dédié à l'étude des aspects cliniques, génétiques et physiopathologiques de l'ataxie spinocérébelleuse (<http://www.euroscas.org/>), nous avons également étudié cinq familles supplémentaires de descendance européenne (Fre528, Fre394, NIJ201, Nap01 et Bre01) dont certaines ont été exposées dans l'article. Une étude de liaison faite en simultanée sur ces familles avec ataxie cérébelleuse pure a permis l'identification d'un nouveau locus SCA sur la même région chromosomique que la grande famille canadienne-française. Suite à une réévaluation par les neurologues du groupe européen, un ou plusieurs individus des familles NIJ201 et Fre528 avaient reçu un mauvais diagnostic, ce qui altérait la ségrégation parfaite de l'haplotype dans ces familles, les excluant par le fait même du locus sur le chromosome 6 (résultats non présentés). Ces deux familles seraient donc faussement liées au locus de SCA34, ce qui témoigne de l'importance d'être davantage vigilant lors de l'analyse des recombinants des haplotypes entre les différentes familles à l'étude.

En effectuant une cartographie fine de la région et en déterminant les recombinants clés dans les différentes familles restantes, il nous a été permis de déterminer un intervalle candidat de 21.7 Mb (Figure 14). Cette région contient 101 gènes ce qui diminue environ de moitié le nombre de gènes précédemment déterminé avec la famille CF. Pour les gènes choisis, nous avons séquencé tous les exons ainsi que 50bp à la frontière intro/exon des gènes candidats à partir de l'ADN génomique. Lorsque les exons dépassaient 700 pb, nous les divisons en plusieurs petits fragments qui se chevauchent afin de faciliter l'amplification. Nous avons séquencé tous les variants d'épissage de chacun des gènes candidats. Le choix des gènes candidats s'est fait selon les mêmes critères énoncés ci-haut (section 3.1).

### 3.1.2.1 Séquençage des gènes dans la région 6q15.

En 2008, Legler *et al.*, publiait un cas intéressant d'un garçon de 3 ans avec une anomalie sur le chromosome 6 résultant d'un retard de développement, de convulsions fébriles, de dysmorphologies et d'érythrokratodermie. L'étude du caryotype du garçon a démontré une insertion de matériel chromosomique maternel d'origine inconnue sur le chromosome 6q15 dans toutes les cellules (46, XY, ins (6;?)(q15;?). Des cas de trisomie et de délétion du chromosome 6 comportent des symptômes similaires à ce patient soit un retard de croissance et un retard mental. Malgré le fait qu'il soit difficile de déterminer si l'origine du matériel est une duplication ou une insertion au locus 6q.15, il montre néanmoins que cette région du chromosome 6 peut avoir un lien avec des troubles dermatologiques<sup>133</sup>. Certains gènes de cette région candidate ont systématiquement été séquencés sans accorder d'importance significative à leur fonction en raison de leur localisation au chromosome 6q15 (Figure 18).



**Figure 18.** Gènes se trouvant dans l'intervalle 6q15

Nous avons séquencé près de la moitié des gènes dans cet intervalle soit *GABRR2*, *UBE2J1*, *RRAGD*, *ANKRD6*, *LYRM2*, *MDN1*, *CASP8AP2*, *BACH2* et *MAP3K7*. Cette région contient deux connexines, *GJA10* et *GJB7* qui ont préalablement été séquencés (section 3.1.1.1).

*GABRR2* est membre d'une famille de canaux chloriques ligand-dépendants qui sont les récepteurs de neurotransmetteurs inhibiteurs majeurs dans le système nerveux central. La protéine codée par ce gène est un membre de la famille Rho et fait partie des sous-unités formant le complexe du récepteur GABA. Des tests d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie chez le rat ont révélé une distribution des récepteurs dans le GABA<sub>A</sub> dans les cellules Purkinje et de Golgi tandis que la microscopie électronique a détecté les sous-unités p1 et p2 (*GABRR2*) dans le soma et les arbres dendritiques des cellules de Purkinje. Dans le système nerveux central adulte (CNS), le neurotransmetteur acide gaminobutyrique (GABA) est largement distribué, et joue un rôle dans la médiation de la transmission synaptique inhibitrice régulant ainsi l'activité excitatrice des neurones. L'importance de la neurotransmission inhibitrice dans le cervelet est soulignée par le fait que quatre des cinq types de neurones du cortex cérébelleux sont GABAergiques: les cellules de Purkinje, les cellules en étoile, les cellules en panier et les cellules de Golgi <sup>134</sup> (section 1.2.2). Nous avons identifié trois variants répertoriés pour ce gène (Tableau IX).

L'ubiquitine est une petite protéine dont sa fonction principale est de marquer d'autres protéines en vue qu'ils soient protéolysés. Plusieurs molécules d'ubiquitine sont liées de façon covalente à la protéine cible par un procédé de polyubiquitination, grâce à l'action de trois enzymes, E1 (enzyme d'activation de l'ubiquitine), E2 (enzyme de conjugaison d'ubiquitine) et E3-ligases (ligase ubiquitine-protéine). La protéine ainsi modifiée est ensuite dirigée vers le système de dégradation via le protéasome, une structure en forme de baril dont l'activité est régulée par l'ubiquitine, et dans laquelle la protéolyse des protéines se déroule <sup>135</sup>. Le gène *UBE2J1* (ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1) code pour un membre de la famille des enzymes de conjugaison d'ubiquitine. Cette enzyme est localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Nous avons choisi ce gène puisque le système protéasome ubiquitine-dépendant semble être impliqué dans les

ataxies à polyglutamines. Nous avons identifié un seul variant répertorié pour ce gène (Tableau IX).

Le gène *RRAGD* (Ras-related GTP-binding protein D) est une protéine de la famille des GTPases monomériques aussi nommée protéine G. En se liant au GTP ou au GDP, les petites protéines G agissent comme des commutateurs moléculaires dans de nombreux processus cellulaires et diverses voies de signalisation<sup>136</sup>. Il est fortement exprimé au niveau du cervelet. Aucun variant n'a été identifié pour ce gène.

Le gène *ANKRD6* est un domaine 6 de répétition ankyrine. Il est aussi fortement exprimé au niveau du cervelet. Nous avons identifié trois variants répertoriés pour ce gène (Tableau IX). Nous avons aussi séquencé le gène *LYRM2* puisqu'il chevauche *ANKRD6*, mais est transcrit en sens inverse. Nous avons identifié un seul variant répertorié pour ce gène (Tableau IX).

Le gène *MDN1* code pour une midasin ayant une fonction de chaperonne nucléaire et est impliqué dans l'assemblage/désassemblage des complexes macromoléculaires dans le noyau (<http://www.genecards.org>). Plusieurs variants ont été identifiés pour *MDN1*, mais tous étaient répertoriés comme non pathogène (Tableau IX).

Le gène *CASP8AP2* (caspase 8 associated protein 2) code pour un médiateur clé de l'apoptose et la signalisation des glucocorticoïdes<sup>137</sup>. Il jouerait un rôle similaire à FLASH, une protéine de souris apoptotiques identifiées par son interaction avec le domaine effecteur de mort (DED) de la caspase 8. Cette protéine serait une composante du complexe inducteur de mort induite (death-inducing signaling) qui comprend des récepteurs Fas, FADD et la caspase 8, et jouerait un rôle régulateur dans l'apoptose. Nous avons identifié deux variants répertoriés pour ce gène (Tableau IX).

Le gène *BACH2* (BTB and CNC homology 2) est membre de la petite famille des MAF (basic leucine zipper), des protéines qui peuvent fonctionner comme des activateurs ou de répresseurs de la transcription en fonction des protéines avec lesquelles elles forment des hétérodimères. Plusieurs variants ont été identifiés pour ce gène, mais tous étaient répertoriés comme non pathogène (Tableau IX).

Le gène MAP3K7 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7) code pour une protéine membre de la famille des sérine / thréonine kinases. Cette kinase régule la transduction du signal induit par TGF- $\beta$  et les protéines morphogénétiques (BMP), tout en contrôlant une variété de fonctions cellulaires, y compris régulation de la transcription et l'apoptose. Trois variants ont été retrouvés dans ce gène, mais tous étaient connus comme non pathogènes (Tableau IX).

**Tableau IX.** Bilan des variants des gènes candidats pour le locus sur le chromosome 6q13-q16.2

<b>Gène</b>	<b>Séquence de référence</b>	<b>Exon</b>	<b>Position génomique</b>	<b>Type de variation</b>	<b>Nomenclature</b>	<b>Changement d'acide aminé</b>	<b>Répertoriée</b>
<b>MDN1</b>	NM_014611.1	exon 12	90543046	silencieuse	c.1815A>G/A	Arg605Arg	rs41402447
		exon 18	90525186	intron	g.28288948C>G		rs6937789
		exon 25	90516175	silencieuse	c.3423C>T	Ala1141Ala	rs4053618
		exon 28_29	90511805	silencieuse	c.4086T>C	His1362His	rs9359861
		exon 30	90509969	intron	g.28273421T>C		rs2273245
		exon 32	90506856	intron	g.28270308A>G		rs2180140
		exon 33	90504813	faux-sense	c.4676G>A	Ser1559Asn	rs4140446
		exon 37	90494420	intron	g.28257872G>A		rs7767196
		exon 40	90489383	intron	g.28252835C>T		rs756363
		exon 41_42	90485689	intron	g.28249141G>A		rs6454774
		exon 51	90475052	silencieuse	c.7782T>C	Pro2594Pro	rs55729223
		exon 51	90474983	silencieuse	c.7851A>G	Thr2617Thr	rs2026634
		exon 53	90472485	intron	g.28235937A>G		rs7743484
		exon 61	90462027	intron	g.28225479T>A		rs9294446
		exon 63.1	90459561	silencieuse	c.9909G>C	Leu3303Leu	rs9351212
		exon 63.2	90459203	faux-sense	c.10267C>C/T	His3423Tyr	rs9294445
		exon64	90457013	intron	g.28220465C>T		rs954638
		exon 74	90447164	faux-sense	c.12130G>T	Ala4044Ser	rs9353689
		exon76	90443954	intron	g.28207406C>T		rs6454769
		exon77	90442475	intron	g.28205927A>G		rs9451261
exon 82	90438570	intron	g.28202022A>G		rs7764076		

<b>Gène</b>	<b>Séquence de référence</b>	<b>Exon</b>	<b>Position génomique</b>	<b>Type de variation</b>	<b>Nomenclature</b>	<b>Changement d'acide aminé</b>	<b>SNP</b>
<b>MAP3K7</b>	NM_003188.2	exon 88	90427923	silencieuse	c.14661C>T	Leu4887Leu	rs9444701
		exon 93	90420570	intron	g.28184022G>A		rs59855758
		exon 1a	91353141	intron	g.29116593C>G		rs282070
		exon 9	91316837	intron	g.29080289T>C		rs205343
<b>GABRR2</b>	NM_002043.2	exon 11	91313649	intron	g.29077101A>T		rs2273567
		exon 3	90038132	silencieuse	c.324A>G	Val83Val	rs282117
		exon 6	90031964	intron	g.27795416G>C		rs2273507
<b>CASP8AP2</b>	NM_012115.2	exon 7	90030782	intron	g.27794234T>C		rs723041
		exon 8	90024217	faux-sense	c.1364C>T	Thr455Met	rs282129
		exon 4	90621963	silencieuse	c.279A>G		rs369328
<b>BACH2</b>	NM_021813.1	exon 7	90634323	silencieuse	c.4593C>T	Ala1531Ala	rs60966143
		5'UTR	91038378		g.28801830C>T		rs45553631
		5'UTR	91038374		g.28801826C>T		rs9111
		5'UTR	90973066		g.28736518T>C		rs3734660
<b>ANKRD6</b>	NM_014942.3	5'UTR	90855351		g.28618803A>G		rs2273403
		exon 3	90372508	faux-sense	c.382G>A	Val128Ile	rs3748085
		exon 6	90383192	intron	g.28146644C>T		rs11965767
<b>LYRM2</b>	NM_020466.4	exon 14.1	90396997	silencieuse	c.1722G>A	Ser574Ser	rs3210511
		exon 2	90404232	faux-sense	c.136A>G	Lys46Glu	rs34012596
<b>UBE2J1</b>	NM_016021.2	3'UTR	90096063		g.27859515T>T/G		rs17798549



## Chapitre 4 - Discussion et perspectives d'avenir

### 4.1 Identification d'un nouveau locus pour une ataxie spinocérébelleuse SCA34 sur le chromosome 6q13-q16.1

Mon travail de maîtrise nous a permis d'identifier un nouveau locus SCA34 pour une forme d'ataxie spinocérébelleuse associée à de l'érythrokratodermie sur le chromosome 6q13-q16.1. À cette fin, nous avons complété un criblage complet du génome avec des marqueurs microsatellites STR. Cette analyse nous a d'abord permis d'exclure le locus des EKV précédemment établi sur le chromosome 1p34-p35<sup>76</sup> et nous a permis d'identifier une liaison sur le chromosome 6 avec un LOD score de plus de 3 (Figure 17). Nous avons ensuite effectué une cartographie fine de la région chromosomique en ajoutant davantage de marqueurs microsatellites afin de repérer l'haplotype qui est partagé entre tous les individus atteints. En effectuant une analyse de liaison avec l'hypothèse du mode de transmission autosomique dominant avec une pénétrance de 90% et en identifiant les recombinants clés de l'haplotype commun, il nous a été possible de trouver une liaison au locus 6p12.3-q16.1 pour une région candidate de 46.8 Mb, contenant plus de 200 gènes. Étant donné la grande taille de cet intervalle candidat, qui rend difficile l'identification du gène causal, nous avons dû mettre en place des stratégies afin d'optimiser nos chances d'identifier le gène responsable de SCA34.

En collaboration avec le laboratoire du Dr Brusco, nous avons identifié une grande famille italienne avec ataxie cérébelleuse pure qui est également liée au locus SCA34 avec un LOD score de 3,4. L'analyse des haplotypes de ces deux familles nous a permis de définir une région candidate de 21,7 Mb. Il nous a été possible de potentiellement réduire cette région candidate en validant ce locus SCA34 dans deux autres familles européennes avec ataxie cérébelleuse à transmission autosomique dominante. Il s'agit d'une famille française et napolitaine. Bien que prises indépendamment, ces familles comportaient une liaison au chromosome 6 avec un LOD score inférieur à 3, la ségrégation parfaite de l'haplotype de la maladie, ainsi que les résultats de l'analyse de liaison en multipoint combiné ( $Z = 9,0$ ) suggèrent que ces familles européennes sont également liées au locus

SCA34. Ces nouvelles observations confirment donc l'existence d'un gène SCA34 et aide à réduire la région candidate.

## **4.2 Le syndrome Giroux-Barbeau : un syndrome neurocutané unique**

Au cours de ce projet, nous avons réexaminé le phénotype clinique de la grande famille décrite par les Drs Giroux et Barbeau. Les lésions cutanées sont compatibles avec l'érythrokratodermie, soit l'érythème et de l'hyperkratose. Il existe une variabilité dans la sévérité des symptômes parmi les membres atteints de la famille, et ceux-ci varient selon les saisons. De manière générale, les lésions cutanées sont généralement bénignes et peuvent s'atténuer avec l'utilisation d'une crème hydratante. Les lésions les plus importantes se retrouvent sur le dessus des mains et des pieds, les coudes et les chevilles, les genoux et l'extérieur des oreilles. Contrairement à d'autres kراتodermies (section 1.7.2), aucune déficience auditive n'a été détectée dans la famille. Au niveau neurologique, le syndrome clinique est compatible avec une ataxie cérébelleuse autosomique dominante pure (ADCA de type III)<sup>14</sup>. Les manifestations surviennent dans la plupart des cas vers la fin de la quarantaine, à l'exception de quatre individus atteints où l'ataxie débute vers l'âge de 30 ans. Il ne semble donc pas y avoir d'anticipation dans la famille, un phénomène qui se retrouve dans les ataxies avec expansions de polyglutamines. Comparativement autres formes d'ataxies spinocérébelleuses, la progression des troubles de la marche est très lente, avec seulement trois personnes gravement touchées nécessitant une aide à la marche. La co-ségrégation des phénotypes cutané et neurologique est presque parfaite. Sauf pour un patient, tous les individus de la famille ayant des lésions cutanées durant l'enfance finissent par développer une ataxie. Puisque l'ataxie vient assez tardivement au cours de la vie, cela explique pourquoi certains patients qui ont eu des lésions durant l'enfance ne manifestent pas encore l'ataxie de manière significative. Par contre, le FDG TEP scan montre un hypométabolisme du cervelet chez ces individus même si l'IRM est normale. Il pourrait donc s'agir d'un des premiers signes de manifestation de la maladie qui a déjà été démontré dans d'autres

variantes d'ataxie spinocérébelleuse telle SCA2<sup>138</sup>. La pénétrance des ataxies spinocérébelleuses familiales est généralement élevée, ce qui signifie que les patients qui portent l'haplotype lié avec la maladie devraient éventuellement exprimer le phénotype. Dans la famille canadienne-française, un seul patient (V-23; 46 ans) porteur de l'haplotype maladie ne présente pas de trouble neurologique, ni des lésions cutanées, ce qui suggère une pénétrance incomplète du gène (Figure 12).

À notre connaissance, cette combinaison de lésions cutanées avec une ataxie spinocérébelleuse est unique à cette famille canadienne-française. Il s'agit de la première association d'un trouble cutané à un trouble neurodégénératif. Par contre, les kératodermies de différents types sont fréquemment associées à des troubles neurologiques développementaux, notamment une neuropathie périphérique, la surdité et un retard mental<sup>85, 93-96, 100, 101</sup>. Le caractère unique de cette famille reflète un aspect original, mais il n'en demeure pas moins qu'il pose problème lorsque vient le temps de recruter des familles additionnelles dans le but de réduire la région candidate. Cependant, la littérature montre des exemples où des mutations différentes dans un gène peuvent causer un trouble cutané dans un cas et un trouble neurologique dans l'autre y compris de la surdité et une neuropathie périphérique (section 1.7). Ces observations nous permettent de croire qu'il existe un gène qui peut causer les deux phénotypes distincts.

Nous avons donc profité de ces cas précis pour considérer l'ajout de familles atteintes uniquement d'ataxie cérébelleuse à notre étude. L'analyse des haplotypes et des recombinants clés de la famille canadienne-française et les familles européennes liées au locus SCA34 nous a permis de réduire le grand intervalle candidat en un intervalle plus restreint (21.8Mb) au locus 6q13-q16.2 qui contient néanmoins 101 gènes. Plusieurs de ces meilleurs gènes candidats ont été séquencés à partir de l'ADN génomique, mais aucune mutation n'a été identifiée. Cette région demeure encore grande et il est clair que le recrutement d'autres familles présentant un phénotype similaire pourrait fermement nous aider en raffinant l'intervalle candidat et ainsi permettre d'identifier le gène responsable de ce désordre.

Au départ, parmi les familles du consortium EUROSCA, quatre familles semblaient liées au locus SCA34 (FRE-394; NAP-01; NIJ-201; et FRE-528). Suite à une réévaluation par les neurologues du groupe européen, un ou plusieurs individus des familles NIJ201 et FRE528 avaient reçu un mauvais diagnostic, ce qui altérait la ségrégation parfaite de l'haplotype dans ces familles, les excluant par le fait même du locus sur le chromosome 6 (résultats non présentés). Ces deux familles seraient donc faussement liées au locus de SCA34, ce qui nous confirme l'importance d'être davantage vigilant lors de l'analyse des recombinants des haplotypes entre les différentes familles à l'étude. Considérant cet aspect limitant, nous avons suggéré que le gène SCA34, basée sur recombinants clés observées dans les grandes canadienne-française et BRE-01 familles, se situe entre les marqueurs D6S1557 et D6S417 (21,7 Mb).

Malgré un examen exhaustif, les individus atteints des autres familles européennes avec SCA ne montre pas de lésion cutanée. Il est donc intrigant que la famille canadienne-française demeure l'unique famille avec combinaison d'EK et ataxie spinocérébelleuse. Tel que discuté au chapitre 2 de ce mémoire (Chapitre 2, p. 54-55), il existe trois explications possibles pour cette observation: 1) les phénotypes de SCA et l'EK peuvent être causés par une seule mutation, mais dans un gène avec expression variable, comme pour les mutations dans les connexines associées à une atteinte neurologique ou cutanée variable; 2) une combinaison de mutations impliquant deux gènes indépendants, mais contigus sur la même région chromosomique ; et 3) une mutation étendue (e.g. délétion) qui comprend plusieurs gènes. Cette dernière éventualité nous apparaît moins probable, car nous n'avons pas identifié de délétion ni de duplication chromosomique malgré un criblage complet du génome avec deux méthodologies différentes (voir chapitre 2, p.50). Quant au scénario no 2, on doit mentionner qu'il existe d'autres exemples dans la littérature où une étude de liaison a montré l'apparence d'un même locus pour des familles différentes, alors que deux gènes contigus étaient responsables de deux variantes cliniques de SCA (e.g. SCA31 et SCA4)<sup>54</sup>. Étant donné que la famille CF est liée à une grande région de 46.8 Mb, nous ne pouvons exclure que cette région comprenne des loci distincts, mais contigus pour EK. Par contre, le partage des haplotypes et le fort LOD

score de l'analyse combinée va en faveur d'un seul et même locus. Il faudra cependant identifier la ou les mutations responsables avant de conclure la présence d'un variant allélique.

### **4.3 Vers l'identification du gène responsable de SCA34**

Étant donné la quantité de gènes dans notre intervalle candidat, nous devons prioriser certains d'entre eux selon les mécanismes moléculaires connus pour les formes d'EKV et de SCA. Tout d'abord, nous avons mis l'accent sur les gènes codants pour les connexines, les gènes reliés au transport par les vésicules et au dynamisme d'actine (e.g. MEDNIK et SCA 5), les gènes ayant une homologie de séquence et/ou fonction similaire à des gènes responsables d'autres formes d'ataxie et d'EK et finalement les gènes exprimés au niveau de la peau et du cervelet (Table VII). Pour le moment, aucune mutation n'a été identifiée dans ces gènes candidats.

Près du quart des ataxies à transmission autosomique dominante résultent d'une expansion dans les séquences répétées de CAG/CTG dans une région codante (e.g. SCA 1, 2, 3, 6, 7, 17) ou non-codante (e.g. SCA 8, 12); provoquant ainsi une polyglutaminopathie<sup>17, 18, 21, 25, 26, 36, 52</sup>. Nous avons voulu tester la présence de cette expansion dans notre intervalle de la famille canadienne-française par immunobuvardage (Southern blot). Le Southern blot est une technique qui permet de visualiser et de cartographier un fragment du génome (ADN) dont on possède une sonde d'intérêt, dans ce cas-ci une séquence répétée de trinuécléotides CAG. Nous avons identifié toutes les séquences répétées de trinuécléotides qui dépendamment du cadre de lecture, pouvaient donner des CAG. Aucune expansion n'a été détectée dans la famille canadienne-française (résultats non montrés).

Puisque les formes SCA15 et SCA20 sont causées par une délétion/duplication, nous voulions tester la variabilité du nombre de copies d'un gène (CNV pour Copy Number

Variation). Plus précisément, les CNV regroupent les délétions, insertions, duplications et réarrangements complexes. Elles peuvent être la cause d'un simple polymorphisme ou à l'origine de caractères mendéliens ou sporadiques, ou encore être associées à des maladies complexes<sup>139</sup>. Nous avons testé la présence de CNV par deux méthodes différentes soit avec une puce d'hybridation génomique comparative aussi nommée *Array comparative genomic hybridization* (CGH array) permettant d'analyser les variations du nombre de copies dans l'ADN; et par un génotypage du génome entier et l'analyse CNV en utilisant le service de BeadChip 610-quad (Illumina®). Aucun CNV n'a été identifié.

Suite au séquençage d'une douzaine de gènes candidats, à l'exclusion d'une polyglutaminopathie et de délétion/duplication par détection de Copie Number Variation (CNV), nous pouvons conclure que ce nouveau locus unique ne semble pas être causé par des mécanismes déjà connus pour les autres formes de syndromes neurologiques et cutanés similaires. Nous nous sommes donc attardés sur d'autres outils de priorisation. L'utilisation des interactomes de certaines maladies ainsi que les programmes de priorisation telle PROSPECTR et SUSPECTS feront sans doute partie essentielle de la démarche par approche de gènes candidats dans le futur.

### 4.3.1 Outils de priorisation

L'avancement des connaissances sur les maladies héréditaires et la découverte de nouveaux gènes entraînent une accumulation d'informations. Il peut parfois être laborieux de passer en revue l'ensemble de la littérature concernant une maladie ou un groupe de gènes. Il existe maintenant des outils informatiques qui permettent de rassembler le contenu de plusieurs bases de données et d'en dégager les éléments pertinents afin de faciliter la priorisation de gènes candidats. Par exemple, il existe un système pour automatiser l'approche de gènes candidats qui rassemble les données d'expression et les données phénotypiques de neuf bases de données différentes<sup>140</sup>. Ce programme se nomme SUSPECTS. Il s'agit d'un système d'appariement à partir des termes de Gene Ontology, des domaines d'Interpro et des données d'expression génique construites à

partir du système de priorisation PROSPECTR (Priorization by Sequence & Phylogenetic Extent of Candidate Regions). PROSPECTR utilise des fonctionnalités pour classer les séquences des gènes dans l'ordre de leur probabilité d'être impliqué dans la maladie. Le programme SUSPECTS permet d'affiner la recherche en spécifiant la région candidate soit en utilisant des marqueurs ou des coordonnées chromosomiques afin de classer les gènes impliqués dans des maladies ou traits complexes spécifiques. En résumé, SUSPECTS analyse la région et formule une liste de gènes en leur assignant un score par ordre de probabilité de participation dans la maladie (<http://www.genetics.med.ed.ac.uk/suspects/>).

Nous avons utilisé ce programme afin de faire une liste de gènes candidats pour la suite du projet pour le locus sur le chromosome 6q13-q16.2. Puisque SUSPECTS se limite à inclure une seule maladie à la fois, nous avons fait différentes listes avec différents mots clés afin de cibler le plus convenablement les bons gènes selon la combinaison du phénotype cutané et neurologique. Le tableau suivant expose les 15 meilleurs gènes candidats pour les différentes maladies selon cet outil de priorisation.

**Tableau X.** Liste des 15 meilleurs gènes candidats prédits par le programme SUSPECTS pour les différents phénotypes.

<i>Rang</i>	<i>Gène</i>	<i>Score</i>	<i>Gène</i>	<i>Score</i>	<i>Gène</i>	<i>Score</i>
<i>Maladie</i>	<u>Ataxia</u>		<u>Spinocerebellar ataxia</u>		<u>Erythrokeratodermia</u>	
<b>1</b>	MYO6	19.90	<b>RIMS1</b>	23.44	<b>GJB7</b>	72.13
<b>2</b>	<b>RIMS1</b>	19.15	PHIP	19.15	NP_115991	68.45
<b>3</b>	KCNQ5	18.00	ELOVL4	17.12	MYO6	55.21
<b>4</b>	<b>GABRR2</b>	16.73	<b>GABRR2</b>	16.44	COL9A1	16.25
<b>5</b>	COL9A1	16.25	KCNQ5	16.43	COL12A1	16.25
<b>6</b>	COL12A1	16.25	COL9A1	16.25	<b>MDN1</b>	15.04
<b>7</b>	<b>MDN1</b>	16.07	COL12A1	16.25	CD109	15.02
<b>8</b>	NT5E	15.70	NT5E	15.84	SLC35A1	14.40
<b>9</b>	GABRR1	15.69	IMPG1	15.80	NT5E	14.31
<b>10</b>	PHIP	15.11	NP_065199	15.66	PRSS35	14.31
<b>11</b>	CD109	15.02	<b>MAP3K7</b>	15.53	PHIP	14.15
<b>12</b>	IBTK	14.96	<b>MDN1</b>	15.45	TMEM30A	14.11
<b>13</b>	MTO1	14.89	GABRR1	15.40	<b>RIMS1</b>	14.09
<b>14</b>	B3GAT2	14.71	RNGTT	15.24	IBTK	14.00
<b>15</b>	<b>SNAP91</b>	14.41	MYO6	15.21	<b>GABRR2</b>	13.98



Les gènes en gras ont déjà été séquencés. Cela signifie donc que près de la moitié (n = 6) des gènes que nous avons précédemment choisis comme étant les meilleurs candidats sont aussi prédits selon le programme SUSPECTS. De façon intéressante, certains gènes figurent dans les deux maladies et seront séquencés en priorité.

### 4.3.2 L'ataxie-ome

En 2008 le premier réseau d'interaction protéine-protéine pour les ataxies héréditaires humaines et des troubles de dégénérescence des cellules de Purkinje a été publié. Afin de mieux comprendre la fonction des protéines impliquées dans la dégénérescence des cellules de Purkinje le groupe de Lim *et al.*, a développé un réseau d'interaction protéines-protéines en utilisant 54 protéines dont 23 d'entre elles étant impliquées dans des ataxies héréditaires, en utilisant un scan «yeast two-hybrid». En combinant les bases de données publiques et les réseaux d'interaction protéine-protéine déjà , il leur a été possible d'identifier 770 interactions protéine-protéine dont 83% des interactions ont été vérifiées dans les cellules de mammifères<sup>141, 142</sup>. Nous avons investigué ce réseau afin de savoir s'il y avait des gènes dans la région candidate du locus SCA34 qui faisaient partie des 770 interactions (Tableau XI).

**Tableau XI.** Listes de gènes présents dans l'ataxie-ome localisés au locus 6q13-q16.2

<b>Gène</b>	<b>Localisation</b>
<b>C6orf57</b>	chr6:71333346-71355327
<b>EEF1A1</b>	chr6:74282194-74287476
<b>MYO6</b>	chr6:76515629-76685974
<b>FAM46A</b>	chr6:82512166-82519147
<b>ME1</b>	chr6:83976829-84197498
<b>CGA</b>	chr6:87851941-87861543
<b>C6orf165</b>	chr6:88174440-88230902
<b>CASP8AP2</b>	chr6:90596379-90640876
<b>MAP3K7</b>	chr6:91282074-91353628

Parmi les gènes connus pour les différentes formes d'ataxies héréditaires, peu semblaient avoir un lien entre eux. Les résultats de cette étude ont permis de découvrir l'existence d'un certain patron d'interaction entre les différentes protéines causant des maladies neurodégénératives avec des phénotypes similaires. Cette étude pourrait potentiellement permettre l'identification de nouveaux gènes candidats pour les formes d'ataxie héréditaire inexplicables.

Il faut tout de même garder une certaine critique face à ce nouvel essor d'outils de prédictions statistiques et d'études fonctionnelles qui génèrent une multitude de données. En ce qui a trait aux outils de prédiction, leur pertinence est bonne dans un projet où la région candidate est grande résultant d'un grand nombre de gènes candidats. Il permet de prioriser le séquençage. Par contre, puisqu'ils traitent d'une seule maladie à la fois, des syndromes avec plusieurs manifestations tant cutanées que neurologiques tels MEDNIK, CEDNIK et SCA34 sont désavantagés.

De plus, puisque l'interactome a été produit en «yeast two-hybrid», il ne faut pas éliminer la possibilité de faux positifs. Par exemple, lorsque deux protéines interagissent véritablement *in vitro* ou dans le noyau de la levure, mais ne se trouvent jamais dans le même compartiment cellulaire ou le même type de cellule, ils ne pourront donc jamais interagir *in vivo*<sup>143</sup>.

Ces techniques ne remplaceront jamais la précision d'une étude de liaison suivie d'une cartographie fine de la région candidate, mais elles sont tout de même complémentaires à cette approche.

### **4.3.3 Prioriser la région du chromosome 6q15**

Même suite à la réduction de la région candidate par les familles européennes, le locus contient toujours plus de 100 gènes. Avant d'amorcer le séquençage de gènes candidats en lien avec les deux sections précédentes, nous croyons que le cas du garçon atteint d'EK et de retard mental associé à un réarrangement du chromosome 6q15

demeure un indice très valable. L'étude du caryotype de cet individu atteint a démontré une insertion de matériel chromosomique maternel d'origine inconnue sur le chromosome 6q15. Il nous apparaît donc prioritaire de déterminer les points de rupture chromosomique afin de connaître le ou les gènes atteints par cette insertion. En 2009, Machida *et al.*, ont publié une analyse des points de rupture chromosomique d'une translocation t(9;17)(q32;q12) chez un individu japonais atteint de fente labiale et / ou palatine (Cleft Lip and/or Palate)<sup>144</sup>. Par hybridation fluorescente in situ (*Fluorescent in situ hybridization* ou FISH), ils ont pu identifier les points de rupture chromosomique. Par la suite, ils ont effectué une série d'amplifications PCR longue distance pour détecter la séquence recombinante causée par la translocation. Les amorces ont été conçues sur la base des résultats de FISH, avec des amorces de part et d'autre de la translocation. Ils ont ainsi pu identifier l'emplacement exact des points de rupture chromosomique et ainsi identifié le gène causal<sup>144</sup>. Nous avons récemment contacté le clinicien qui suivait le petit garçon avec l'insertion au chromosome 6q15 afin d'obtenir un échantillon d'ADN. Cette méthode nous permettrait de déterminer avec exactitude les gènes perturbés par ce réarrangement. Nous pourrions par la suite séquencer ce gène dans nos familles et potentiellement découvrir le gène responsable de SCA34. De façon intéressante, une translocation entre les chromosomes 5 et 13 a récemment été identifiée chez une fille et sa mère perturbant le gène codant pour le facteur de croissance des fibroblastes 14 b isoforme (*FGF14-1b*), gène responsable de la forme SCA27<sup>73</sup>. Cet exemple montre que les réarrangements chromosomiques peuvent aider à l'identification de gènes responsables de maladies.

## 4.4 Conclusion

Ce projet de maîtrise nous a permis de caractériser le phénotype clinique et de localiser le gène pour une maladie neurocutané unique, non développementale. Ainsi, les syndromes CEDNIK et MEDNIK sont deux exemples de maladie neurocutané dont les phénotypes se produisent simultanément<sup>98, 101</sup>, mais qui sont associées à une anomalie du développement neurologique. En comparaison, la famille Giroux-Barbeau présente des lésions d'EK qui débutent à l'enfance, mais des manifestations neurologiques à l'âge

adulte associées à une dégénérescence du cervelet. Cette combinaison inhabituelle de symptômes serait le premier exemple d'EK associé à une dégénérescence du système nerveux. Si l'ataxie SCA34 et l'EK retrouvées dans la famille Giroux-Barbeau sont causées par une mutation du même gène, cette découverte pourrait offrir des indices supplémentaires vers l'identification de nouveaux mécanismes génétiques et moléculaires qui sous-tendent la dégénérescence cérébelleuse. Les ataxies héréditaires consistent en un groupe hétérogène de maladies neurologiques dont la caractéristique commune est l'atteinte progressive et dégénérative du cervelet. Pour plusieurs variantes d'ataxie, les gènes en cause demeurent indéterminés. À ce jour, il n'existe malheureusement pas de traitement spécifique pour cette condition invalidante. Nous croyons que l'identification de nouveaux gènes et mécanismes moléculaires qui causent les ataxies héréditaires permettra non seulement une meilleure compréhension de la maladie, mais également le potentiel de développer des traitements mieux ciblés.

## 5.0 Bibliographie

1. Carlson KM, Andresen JM, Orr HT. Emerging pathogenic pathways in the spinocerebellar ataxias. *Curr Opin Genet Dev* 2009.
2. Manto M, Marmolino D. Cerebellar ataxias. *Curr Opin Neurol* 2009;22(4):419-29.
3. Duenas AM, Goold R, Giunti P. Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* 2006;129(Pt 6):1357-70.
4. Storey E, Bahlo M, Fahey MC, Sisson O, Lueck CJ, Gardner RM. A new dominantly-inherited pure cerebellar ataxia, SCA 30. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008.
5. Vale J, Bugalho P, Silveira I, Sequeiros J, Guimaraes J, Coutinho P. Autosomal dominant cerebellar ataxia: frequency analysis and clinical characterization of 45 families from Portugal. *Eur J Neurol* 2009.
6. Matilla-Duenas A, Sanchez I, Corral-Juan M, Davalos A, Alvarez R, Latorre P. Cellular and Molecular Pathways Triggering Neurodegeneration in the Spinocerebellar Ataxias. *Cerebellum* 2009.

7. Zoghbi HY. Spinocerebellar Ataxias. *Neurobiology of Disease* 2000;7(5):523-527.
8. Sherwood L. Physiologie humaine. Paris; 2000.
9. Kandel ER., Schwartz JH. , Jessel TM. Principles of Neural Science (4ième ed), ; 2000.
10. Glickstein M, Doron K. Cerebellum: connections and functions. *Cerebellum* 2008;7(4):589-94.
11. Dietrichs E. Clinical manifestation of focal cerebellar disease as related to the organization of neural pathways. *Acta Neurol Scand Suppl* 2008;188:6-11.
12. Schols L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 2004;3(5):291-304.
13. Klockgether T. The clinical diagnosis of autosomal dominant spinocerebellar ataxias. *Cerebellum* 2008.
14. Harding AE. The hereditary ataxias and related disorders CHURCHILL LIVINGSTONE ed. London; 1984.
15. Hammans SR. The inherited ataxias and the new genetics. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;61(4):327-32.
16. Faruq M, Scaria V, Singh I, Tyagi S, Srivastava AK, Mukerji M. SCA-LSVD: A repeat-oriented locus-specific variation database for genotype to phenotype correlations in spinocerebellar ataxias. *Hum Mutat* 2009.
17. Orr HT, Chung MY, Banfi S, et al. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 1993;4(3):221-6.
18. Imbert G, Saudou F, Yvert G, et al. Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet* 1996;14(3):285-91.
19. Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, et al. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 1996;14(3):269-76.
20. Sanpei K, Takano H, Igarashi S, et al. Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nat Genet* 1996;14(3):277-84.
21. Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 1994;8(3):221-8.

22. Flanigan K, Gardner K, Alderson K, et al. Autosomal dominant spinocerebellar ataxia with sensory axonal neuropathy (SCA4): clinical description and genetic localization to chromosome 16q22.1. *Am J Hum Genet* 1996;59(2):392-9.
23. Bauer P, Schols L, Riess O. Spectrin mutations in spinocerebellar ataxia (SCA). *Bioessays* 2006;28(8):785-7.
24. Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, et al. Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet* 2006;38(2):184-90.
25. Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, et al. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 1997;15(1):62-9.
26. David G, Abbas N, Stevanin G, et al. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet* 1997;17(1):65-70.
27. Koob MD, Moseley ML, Schut LJ, et al. An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet* 1999;21(4):379-84.
28. Matsuura T, Yamagata T, Burgess DL, et al. Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat Genet* 2000;26(2):191-4.
29. Johnson J, Wood N, Giunti P, Houlden H. Clinical and genetic analysis of spinocerebellar ataxia type 11. *Cerebellum* 2008.
30. Houlden H, Johnson J, Gardner-Thorpe C, et al. Mutations in TTBK2, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11. *Nat Genet* 2007;39(12):1434-6.
31. Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, et al. Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet* 1999;23(4):391-2.
32. Waters MF, Minassian NA, Stevanin G, et al. Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nat Genet* 2006;38(4):447-51.
33. Chen DH, Brkanac Z, Verlinde CL, et al. Missense mutations in the regulatory domain of PKC gamma: a new mechanism for dominant nonepisodic cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 2003;72(4):839-49.
34. Gardner RJ, Knight MA, Hara K, Tsuji S, Forrest SM, Storey E. Spinocerebellar ataxia type 15. *Cerebellum* 2005;4(1):47-50.
35. Gardner RJ. "SCA16" is really SCA15. *J Med Genet* 2008;45(3):192.

36. Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, et al. SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet* 2001;10(14):1441-8.
37. Devos D, Schraen-Maschke S, Vuillaume I, et al. Clinical features and genetic analysis of a new form of spinocerebellar ataxia. *Neurology* 2001;56(2):234-8.
38. Brkanac Z, Fernandez M, Matsushita M, et al. Autosomal dominant sensory/motor neuropathy with Ataxia (SMNA): Linkage to chromosome 7q22-q32. *Am J Med Genet* 2002;114(4):450-7.
39. Schelhaas HJ, Verbeek DS, Van de Warrenburg BP, Sinke RJ. SCA19 and SCA22: evidence for one locus with a worldwide distribution. *Brain* 2004;127(Pt 1):E6; author reply E7.
40. Verbeek DS, Schelhaas JH, Ippel EF, Beemer FA, Pearson PL, Sinke RJ. Identification of a novel SCA locus (SCA19) in a Dutch autosomal dominant cerebellar ataxia family on chromosome region 1p21-q21. *Hum Genet* 2002;111(4-5):388-93.
41. Knight MA, Hernandez D, Diede SJ, et al. A duplication at chromosome 11q12.2-11q12.3 is associated with spinocerebellar ataxia type 20. *Hum Mol Genet* 2008;17(24):3847-53.
42. Knight MA, Gardner RJ, Bahlo M, et al. Dominantly inherited ataxia and dysphonia with dentate calcification: spinocerebellar ataxia type 20. *Brain* 2004;127(Pt 5):1172-81.
43. Vuillaume I, Devos D, Schraen-Maschke S, et al. A new locus for spinocerebellar ataxia (SCA21) maps to chromosome 7p21.3-p15.1. *Ann Neurol* 2002;52(5):666-70.
44. Verbeek DS, van de Warrenburg BP, Wesseling P, Pearson PL, Kremer HP, Sinke RJ. Mapping of the SCA23 locus involved in autosomal dominant cerebellar ataxia to chromosome region 20p13-12.3. *Brain* 2004;127(Pt 11):2551-7.
45. Stevanin G, Broussolle E, Streichenberger N, Kopp N, Brice A, Durr A. Spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy (SCA25). *Cerebellum* 2005;4(1):58-61.
46. Stevanin G, Bouslam N, Thobois S, et al. Spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy (SCA25) maps to chromosome 2p. *Ann Neurol* 2004;55(1):97-104.
47. Yu GY, Howell MJ, Roller MJ, Xie TD, Gomez CM. Spinocerebellar ataxia type 26 maps to chromosome 19p13.3 adjacent to SCA6. *Ann Neurol* 2005;57(3):349-54.

48. Brusse E, de Koning I, Maat-Kievit A, Oostra BA, Heutink P, van Swieten JC. Spinocerebellar ataxia associated with a mutation in the fibroblast growth factor 14 gene (SCA27): A new phenotype. *Mov Disord* 2006;21(3):396-401.
49. Maltecca F, Magnoni R, Cerri F, Cox GA, Quattrini A, Casari G. Haploinsufficiency of AFG3L2, the gene responsible for spinocerebellar ataxia type 28, causes mitochondria-mediated Purkinje cell dark degeneration. *J Neurosci* 2009;29(29):9244-54.
50. Cagnoli C, Mariotti C, Taroni F, et al. SCA28, a novel form of autosomal dominant cerebellar ataxia on chromosome 18p11.22-q11.2. *Brain* 2006;129(Pt 1):235-42.
51. Di Bella D, Lazzaro F, Brusco A, et al. Mutations in the mitochondrial protease gene AFG3L2 cause dominant hereditary ataxia SCA28. *Nat Genet* 2010.
52. Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, et al. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nat Genet* 1994;6(1):9-13.
53. Nagafuchi S, Yanagisawa H, Sato K, et al. Dentatorubral and pallidoluysian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nat Genet* 1994;6(1):14-8.
54. Sato N, Amino T, Kobayashi K, et al. Spinocerebellar Ataxia Type 31 Is Associated with "Inserted" Penta-Nucleotide Repeats Containing (TGGAA)(n). *Am J Hum Genet* 2009.
55. Margolis RL. Dominant spinocerebellar ataxias: a molecular approach to classification, diagnosis, pathogenesis and the future. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3(6):715-32.
56. Bauer PO, Nukina N. The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J Neurochem* 2009;110(6):1737-65.
57. Chai Y, Berke SS, Cohen RE, Paulson HL. Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways. *J Biol Chem* 2004;279(5):3605-11.
58. Park Y, Hwang YP, Lee JS, Seo SH, Yoon SK, Yoon JB. Proteasomal ATPase-associated factor 1 negatively regulates proteasome activity by interacting with proteasomal ATPases. *Mol Cell Biol* 2005;25(9):3842-53.
59. Lin X, Antalffy B, Kang D, Orr HT, Zoghbi HY. Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. *Nat Neurosci* 2000;3(2):157-63.
60. Lipinski MM, Yuan J. Mechanisms of cell death in polyglutamine expansion diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4(1):85-90.



61. Chou AH, Yeh TH, Kuo YL, et al. Polyglutamine-expanded ataxin-3 activates mitochondrial apoptotic pathway by upregulating Bax and downregulating Bcl-xL. *Neurobiol Dis* 2006;21(2):333-45.
62. Bernard G, Shevell MI. Channelopathies: a review. *Pediatr Neurol* 2008;38(2):73-85.
63. O'Hearn E, Holmes SE, Calvert PC, Ross CA, Margolis RL. SCA-12: Tremor with cerebellar and cortical atrophy is associated with a CAG repeat expansion. *Neurology* 2001;56(3):299-303.
64. Dick KA, Margolis JM, Day JW, Ranum LP. Dominant non-coding repeat expansions in human disease. *Genome Dyn* 2006;1:67-83.
65. Honti V, Vecsei L. Genetic and molecular aspects of spinocerebellar ataxias. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2005;1(2):125-33.
66. Brouwer JR, Willemsen R, Oostra BA. Microsatellite repeat instability and neurological disease. *Bioessays* 2009;31(1):71-83.
67. Holmes SE, Hearn EO, Ross CA, Margolis RL. SCA12: an unusual mutation leads to an unusual spinocerebellar ataxia. *Brain Res Bull* 2001;56(3-4):397-403.
68. Stankewich MC, Tse WT, Peters LL, et al. A widely expressed betaIII spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(24):14158-63.
69. Holleran EA, Ligon LA, Tokito M, Stankewich MC, Morrow JS, Holzbaue EL. beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin. *J Biol Chem* 2001;276(39):36598-605.
70. Asai H, Hirano M, Shimada K, et al. Protein kinase C gamma, a protein causative for dominant ataxia, negatively regulates nuclear import of recessive-ataxia-related aprataxin. *Hum Mol Genet* 2009;18(19):3533-43.
71. Sato S, Cerny RL, Buescher JL, Ikezu T. Tau-tubulin kinase 1 (TTBK1), a neuron-specific tau kinase candidate, is involved in tau phosphorylation and aggregation. *J Neurochem* 2006;98(5):1573-84.
72. van Swieten JC, Brusse E, de Graaf BM, et al. A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia [corrected]. *Am J Hum Genet* 2003;72(1):191-9.
73. Misceo D, Fannemel M, Baroy T, et al. SCA27 caused by a chromosome translocation: further delineation of the phenotype. *Neurogenetics* 2009.
74. Iwaki A, Kawano Y, Miura S, et al. Heterozygous deletion of ITPR1, but not SUMF1, in spinocerebellar ataxia type 16. *J Med Genet* 2008;45(1):32-5.

75. Hara K, Shiga A, Nozaki H, et al. Total deletion and a missense mutation of ITPR1 in Japanese SCA15 families. *Neurology* 2008;71(8):547-51.
76. Richard G, Lin JP, Smith L, et al. Linkage studies in erythrokeratodermias: fine mapping, genetic heterogeneity and analysis of candidate genes. *J Invest Dermatol* 1997;109(5):666-71.
77. Costa SMD. Erythro et keratoderma variabilis in a mother and a daughter *Acta Derm Venerol* 1925;6:255-61.
78. Richard G, Brown N, Smith LE, et al. The spectrum of mutations in erythrokeratodermias--novel and de novo mutations in GJB3. *Hum Genet* 2000;106(3):321-9.
79. Common JE, O'Toole EA, Leigh IM, et al. Clinical and genetic heterogeneity of erythrokeratoderma variabilis. *J Invest Dermatol* 2005;125(5):920-7.
80. Morley SM, White MI, Rogers M, et al. A new, recurrent mutation of GJB3 (Cx31) in erythrokeratoderma variabilis. *Br J Dermatol* 2005;152(6):1143-8.
81. Richard G, Brown N, Rouan F, et al. Genetic heterogeneity in erythrokeratoderma variabilis: novel mutations in the connexin gene GJB4 (Cx30.3) and genotype-phenotype correlations. *J Invest Dermatol* 2003;120(4):601-9.
82. Macari F, Landau M, Cousin P, et al. Mutation in the gene for connexin 30.3 in a family with erythrokeratoderma variabilis. *Am J Hum Genet* 2000;67(5):1296-301.
83. Richard G, Smith LE, Bailey RA, et al. Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. *Nat Genet* 1998;20(4):366-9.
84. Schnichels M, Worsdorfer P, Dobrowolski R, et al. The connexin31 F137L mutant mouse as a model for the human skin disease erythrokeratoderma variabilis (EKV). *Hum Mol Genet* 2007;16(10):1216-24.
85. Lopez-Bigas N, Olive M, Rabionet R, et al. Connexin 31 (GJB3) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment. *Hum Mol Genet* 2001;10(9):947-52.
86. Gerido DA, White TW. Connexin disorders of the ear, skin, and lens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2004;1662(1-2):159-170.
87. Willecke K, Eiberger J, Degen J, et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 2002;383(5):725-37.
88. Paolo M. Connexines, canaux jonctionnels et communications cellulaires. *médecine/sciences* 1996;12:909-20.

89. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 2006;394(Pt 3):527-43.
90. Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004;62(2):228-32.
91. Richard G. Connexins: a connection with the skin. *Exp Dermatol* 2000;9(2):77-96.
92. Zoidl G, Dermietzel R. Gap junctions in inherited human disease. *Pflugers Arch* 2010.
93. Maestrini E, Korge BP, Ocana-Sierra J, et al. A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum Mol Genet* 1999;8(7):1237-43.
94. Cryns K, Orzan E, Murgia A, et al. A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. *J Med Genet* 2004;41(3):147-54.
95. Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, Lam H, Iizuka H, Friedman RA, Christiano AM. The molecular pathology of progressive symmetric erythrokeratoderma: a frameshift mutation in the loricrin gene and perturbations in the cornified cell envelope. *Am J Hum Genet* 1997;61(3):581-9.
96. Maestrini E, Monaco AP, McGrath JA, et al. A molecular defect in loricrin, the major component of the cornified cell envelope, underlies Vohwinkel's syndrome. *Nat Genet* 1996;13(1):70-7.
97. Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders. *Exp Dermatol* 1998;7(1):1-10.
98. Sprecher E, Ishida-Yamamoto A, Mizrahi-Koren M, et al. A mutation in SNAP29, coding for a SNARE protein involved in intracellular trafficking, causes a novel neurocutaneous syndrome characterized by cerebral dysgenesis, neuropathy, ichthyosis, and palmoplantar keratoderma. *Am J Hum Genet* 2005;77(2):242-51.
99. Ungar D, Hughson FM. SNARE protein structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:493-517.
100. Saba TG, Montpetit A, Verner A, et al. An atypical form of erythrokeratoderma variabilis maps to chromosome 7q22. *Hum Genet* 2005;116(3):167-71.
101. Montpetit A, Cote S, Brustein E, et al. Disruption of AP1S1, causing a novel neurocutaneous syndrome, perturbs development of the skin and spinal cord. *PLoS Genet* 2008;4(12):e1000296.

102. Beare JM, Nevin NC, Froggatt P, Kernohan DC, Allen IV. Atypical erythrokeratoderma with deafness, physical retardation and peripheral neuropathy. *Br J Dermatol* 1972;87(4):308-14.
103. Owen DJ, Collins BM, Evans PR. Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:153-91.
104. Boehm M, Bonifacino JS. Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* 2001;12(10):2907-20.
105. Giroux JM, Barbeau A. Erythrokeratoderma with ataxia. *Arch Dermatol* 1972;106(2):183-8.
106. Stein CM, Elston RC. Finding genes underlying human disease. *Clin Genet* 2009;75(2):101-6.
107. Schork NJ, Thiel B, St Jean P. Linkage analysis, kinship, and the short-term evolution of chromosomes. *J Exp Zool* 1998;282(1-2):133-49.
108. Eggen A. 4 - Recherche de gènes associés à des fonctions - Cartographie fine d'un gène et clonage positionnel. *INRA Productions Animales: numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales* 2000:133-136.
109. Sheffield VC, Nishimura DY, Stone EM. Novel approaches to linkage mapping. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5(3):335-41.
110. Ricard G GS, Froguel P. Outil d'aide au clonage positionnel - Bioinformatic tool for positionnal cloning. *JOBIM* 2002:325-328.
111. Zheng-Fischhofer Q, Kibschull M, Schnichels M, et al. Characterization of connexin31.1-deficient mice reveals impaired placental development. *Dev Biol* 2007;312(1):258-71.
112. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science* 2008;322(5903):881-8.
113. Elahi E, Kumm J, Ronaghi M. Global genetic analysis. *J Biochem Mol Biol* 2004;37(1):11-27.
114. Slate J, Gratten J, Beraldi D, Stapley J, Hale M, Pemberton JM. Gene mapping in the wild with SNPs: guidelines and future directions. *Genetica* 2009;136(1):97-107.
115. Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng* 2007;9:289-320.
116. AJF G, JH M, DT S, RC L, WM G. An Introduction to Genetic Analysis. 5th ed: WH Freeman and Company; 1993.

117. Brusco A, Gellera C, Cagnoli C, et al. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. *Arch Neurol* 2004;61(5):727-33.
118. Mariotti C, Brusco A, Di Bella D, et al. Spinocerebellar ataxia type 28: A novel autosomal dominant cerebellar ataxia characterized by slow progression and ophthalmoparesis. *Cerebellum* 2008;7(2):184-8.
119. Kinirons P, Verlaan DJ, Dube MP, et al. A novel locus for idiopathic generalized epilepsy in French-Canadian families maps to 10p11. *Am J Med Genet A* 2008;146A(5):578-84.
120. Lathrop GM, Lalouel JM. Easy calculations of lod scores and genetic risks on small computers. *Am J Hum Genet* 1984;36(2):460-5.
121. Sobel E, Lange K. Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics. *Am J Hum Genet* 1996;58(6):1323-37.
122. Saillour Y, Cossee M, Leturcq F, et al. Detection of exonic copy-number changes using a highly efficient oligonucleotide-based comparative genomic hybridization-array method. *Hum Mutat* 2008;29(9):1083-90.
123. van de Leemput J, Chandran J, Knight MA, et al. Deletion at ITPR1 underlies ataxia in mice and spinocerebellar ataxia 15 in humans. *PLoS Genet* 2007;3(6):e108.
124. Sharp AJ, Mefford HC, Li K, et al. A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet* 2008;40(3):322-8.
125. Harper PS, Marks R, Dykes PJ, Young ID. Ichthyosis, hepatosplenomegaly, and cerebellar degeneration in a sibship. *J Med Genet* 1980;17(3):212-5.
126. Gohlke BC, Haug K, Fukami M, et al. Interstitial deletion in Xp22.3 is associated with X linked ichthyosis, mental retardation, and epilepsy. *J Med Genet* 2000;37(8):600-2.
127. Brown A, Bernier G, Mathieu M, Rossant J, Kothary R. The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nat Genet* 1995;10(3):301-6.
128. Brown A, Dalpe G, Mathieu M, Kothary R. Cloning and characterization of the neural isoforms of human dystonin. *Genomics* 1995;29(3):777-80.
129. Leung CL, Zheng M, Prater SM, Liem RK. The BPAG1 locus: Alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains,

- including predominant isoforms in neurons and muscles. *J Cell Biol* 2001;154(4):691-7.
130. Young KG, Kothary R. Dystonin/Bpag1--a link to what? *Cell Motil Cytoskeleton* 2007;64(12):897-905.
131. Sun L, Bittner MA, Holz RW. Rim, a component of the presynaptic active zone and modulator of exocytosis, binds 14-3-3 through its N terminus. *J Biol Chem* 2003;278(40):38301-9.
132. Johnson S, Halford S, Morris AG, et al. Genomic organisation and alternative splicing of human RIM1, a gene implicated in autosomal dominant cone-rod dystrophy (CORD7). *Genomics* 2003;81(3):304-14.
133. Legler AA, Zlotoff BJ, Clericuzio C. Chromosome 6 abnormality with associated dysmorphological features and erythrokeratoderma. *Pediatr Dermatol* 2008;25(4):503-4.
134. Mejia C, Garcia-Alcocer G, Berumen LC, Rosas-Arellano A, Miledi R, Martinez-Torres A. Expression of GABA $\rho$  subunits during rat cerebellum development. *Neurosci Lett* 2008;432(1):1-6.
135. Reinstein E, Ciechanover A. Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection. *Ann Intern Med* 2006;145(9):676-84.
136. Colicelli J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 2004;2004(250):RE13.
137. Park TS, Lee SG, Song J, et al. CASP8AP2 is a novel partner gene of MLL rearrangement with t(6;11)(q15;q23) in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;195(1):94-5.
138. Inagaki A, Iida A, Matsubara M, Inagaki H. Positron emission tomography and magnetic resonance imaging in spinocerebellar ataxia type 2: a study of symptomatic and asymptomatic individuals. *Eur J Neurol* 2005;12(9):725-8.
139. Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009;10:451-81.
140. Adie EA, Adams RR, Evans KL, Porteous DJ, Pickard BS. Speeding disease gene discovery by sequence based candidate prioritization. *BMC Bioinformatics* 2005;6:55.
141. Lim J, Hao T, Shaw C, et al. A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* 2006;125(4):801-14.
142. Humbert S, Saudou F. The Ataxia-ome: Connecting Disease Proteins of the Cerebellum. *Cell* 2006;125(4):645-647.

143. Rubinsztein DC. Protein-protein interaction networks in the spinocerebellar ataxias. *Genome Biol* 2006;7(8):229.
144. Machida J, Felix TM, Murray JC, et al. Searching for genes for cleft lip and/or palate based on breakpoint analysis of a balanced translocation t(9;17)(q32;q12). *Cleft Palate Craniofac J* 2009;46(5):532-40.

## ANNEXE 1 : Amorces utilisées pour amplifier les exons des gènes candidats

Fragment	Amorce Foward	Amorces Reverse	Taille (pb)
RIMS1exon1.2	gaaagactgggtctcgctct	actcagccgcgaggacta	435
RIMS1exon2	gccccaaaggttaatgttgaa	tccagctcatacacattcca	528
RIMS1exon3	ttgcttagtcaaagagctatgc	gttctcatgtttggaaggcg	404
RIMS1exon4	gcaggaccataatgtttgc	tcagagtcaagcagataaatgagc	503
RIMS1exon5.1	tgtgggaggaccattttcac	cttgctcctgtctgggtgt	405
RIMS1exon5.2	gaaagcacgactccaagagc	gagatagacaacgcccctca	346
RIMS1exon6.1	tccattagatccccttaccttg	tgcggtacctggctgataa	436
RIMS1exon6.2,1	aacgggagcgcgaaagaaa	gcagttctctcagccgagtaag	382
RIMS1exon6.2,2	gcctgaggagcagcagat	cagcatggctcccacttct	382
RIMS1exon6.3	caagcagctaacgaaccaca	cactggcggtaacgctatct	493
RIMS1exon7	taaggctaggaggggcagat	tcaatattgccccttaccaaatg	477
RIMS1exon8	acttcatgcgggaactaaca	ccagaaactccgatgaatgc	344
RIMS1exon9	catgcaattcaagtgtatcataaaa	taaaactaaccccaaattgaaaacc	292
RIMS1exon10	ggcaatcaattgtctttga	gtgtggagcttctaaaatgtagtga	475
RIMS1exon11	acatcacgtataatgggctatgatt	gccaacatctagtaccaatgga	265
RIMS1exon12	cctgtgcaataccatgcact	ctcaaggaaaggcgaacat	448
RIMS1exon13	gcctgccagtgttaggttatgttta	attccaacactgagggacttct	504
RIMS1exon14	gcgacacatcatttagaatgtacc	aaaagcgctgtctccaattc	547
RIMS1exon15	ccaaccaagagtgcagaaga	tgagctctgcaattactctg	531
RIMS1exon16	atgtctttgggtgaatgaggaaaaa	ttagtatcctaaagagggtccggaag	371
RIMS1exon17	tcatagatcaatggctgcttt	tcagttagtttgcagcaatttaca	338
RIMS1exon18	gccacaggcaaaaactcatag	tctaatgtgctatgccacaatatct	393
RIMS1exon19	caatggcaaatcagcaacag	ccactaaggagagacggaag	369
RIMS1exon20-21	aggcctcctacttctgaatc	aggcagaattgagctccaca	514
RIMS1exon21	tgtcagaattctagtgtctttgca	acagatgccacacaaaaca	336
RIMS1exon22	ccttatgaactgaatcccagtgga	cctgtaaggctgtcatgaaaca	318
RIMS1exon23	ttccaaacatctcccgaat	aatggatcctgacttactgg	551
RIMS1exon24	tcgtgtctctattgggcaac	agaaccgcctgaaattatcc	495
RIMS1exon25	attgctgtatgggttctctt	tggtgtcaaaatgagtgaagc	419
RIMS1exon26	ccagtgagggggtttatgtc	ctcagcaaaaactgagtgcac	415
RIMS1exon27	ttacgttcccattctgtgt	cggcccaaatgataacttct	442
RIMS1exon28	cctttattgggtggtgctaa	tgccacaaagactgttctgc	604
RIMS1exon29	tcagggtgggtgtgatac	ttccatcacaagccatagca	490
RIMS1exon30	tgcatagcatccagtggta	tgaatgaccaggtgtagagggtg	533
RIMS1exon31	agcctcatatgcttgctca	aaatgccaccatgtctctac	546
RIMS1exon32	aaatctgtagtctgttacgggctct	cagatgatgcaaaacagagcat	299
RIMS1exon33	cctgcattgaaccaagtaagt	tgttgaccatctctctgatgt	470
RIMS1exon34.1	tagttgctttgagccctcg	catcagtgactctcaccagca	525
RIMS1exon34.2	cgaaagcattgtggagaca	ttggggagatgctacagaga	550
RIMS1exon34.3	tcaccacatctgtattccacta	aatccattcttagtcaccatttt	513



Fragment	Amorce Foward	Amorces Reverse	Taille (pb)
RIMS1exon34.4.1	tgcaactaatgtctggggact	gggagaacatatcaatgcacct	509
RIMS1exon34.4.2	tgcaagcacaagcttgatt	gcaacatacaagctggccta	349
RIMS1exon34.5	agcagcatgacttggaactg	gccactaagacagaacggaatc	563
RIMS1exon34.6	cagggcacagattgaccac	gctcccattttgaccata	292
SNAP91exon01	gggcggtgtgtgagtag	ctgacagcgaagcccagt	538
SNAP91exon1	gtaactgagacaagcggaggag	tcccagctactcacacacacc	493
SNAP91exon2	ctactcacggccaagactcc	gaggccacagcattatggac	450
SNAP91exon3b	cgcttgtcaatgtatctgtg	cctattcgaccctttgtctg	491
SNAP91exon4	ttcccctcagagaaattcagc	gggtctagcacaccactgt	475
SNAP91exon4b	gctgaattagtcaccaagacct	tgcattccatattctgtgct	657
SNAP91exon5	caagcacatcaagcaaatgg	ttgtaaactgggacctcaaga	550
SNAP91exon5b	ctgaggatgtggacctgtg	tgctctcccctattgagaa	299
SNAP91exon6	gtgtgggggaacagcttaga	tcccgaggaaatctttggat	274
SNAP91exon7	ccatctttgatattggtagg	tctgcccatatcgttctgc	433
SNAP91exon8	caggttcccttgttttaggtg	actccgaggcactccaac	392
SNAP91exon9	gagcattccctatccagaagc	caagactatgccatttggg	489
SNAP91exon10	tatatcggggtcctccaca	ggaagagtaggggtctgagg	331
SNAP91exon11	tgcttgaccaagtgaatcc	ttccggaaatggatagagagg	288
SNAP91exon12	gctgggcatgtcatggttat	tccatatcagccaattcaga	474
SNAP91exon13	tagagaccaactggccctca	tccctccaagtttctaatacca	469
SNAP91exon14-15	ggcttgacattggtatggt	tgatgcattgcaatctctgc	621
SNAP91exon16	gggagccttctcacaatttaac	ggcctcttctaactacgggg	274
SNAP91exon17	caaggagcctcacacctagc	ccaagaacacacatgccttt	602
SNAP91exon18-19	ggactgggaagtgtatgctgt	tgatgatggtcccaagagtg	531
SNAP91exon20	atccaagatgccattgtc	gccaacagatcaggatcacc	496
SNAP91exon21	gagaataaaccggctcagagca	aatacttgcccctccctcaa	401
SNAP91exon22	gatttgctgcatagtttctc	gcaaatagatggtgtgcaggt	668
SNAP91exon23	tcgacatgttctcttggtgtt	ccctgccatactcaccata	452
SNAP91exon24	gcagcatcaaacctgctatg	ctgcaacctgccttacagtg	774
SNAP91exon25	aatctaaggagccacacacca	gtcggcagcaaagttagca	282
SNAP91exon26	cagcatagcatgaccatct	tggtcctaaaattggctggt	732
SNAP91exon27	tggtcctaaaattggctggt	tctgaagcaacaggtatgagga	415
SNAP91exon28	tctgcaggtttgtttcttga	tgagtacctctgaaatagctaagca	373
SNAP91exon29.1	tgctataccgaatgtctctgct	tcacactacgctgtaacagagat	747
SNAP91exon29.2.1	ctatttgaagagcgtctgtttt	tcgttctgataaggtagctcaaaa	325
SNAP91exon29.2.2	ccaatcacaggaactcaactg	tataccttgggtgcctca	349
SNAP91exon29.3	gactgaaaagtaaagggtctg	aactctattggcatgaacagca	752
CASP8AP2_5'UTR	accctgatagcgcctctggtg	ctctcgaaggaccacagagg	334
CASP8AP2_exon1	tgccaaattcgaaaattgct	tgagctccaagtctgaagtc	317
CASP8AP2_exon2	tttctggtccttttagttagg	tcttaggagctatgatataccagg	239
CASP8AP2_exon3	gaaacaccatctcaccatctact	aacaggtctgaagcaaaaactga	509
CASP8AP2_exon4	gacctcatctgccttcttagtga	tcaagagtctccctcctcag	421
CASP8AP2_exon5	tcatagtctcagctccccac	ttaggcagacatggtgtgtg	566
CASP8AP2_exon6.1	actcatgtgaatgaagtttgaata	gagaacgtgaccaaacacca	341

Fragment	Amorce Foward	Amorces Reverse	Taille (pb)
CASP8AP2_exon6.2	tggaaaaggaaggaaaacca	tttcttcttctgtctgtgatt	508
CASP8AP2_exon6.3	tgaaccaagactgaaagcaaa	tctcccatcctctctctctc	366
CASP8AP2_exon6.4	gagcatcacttctcattcca	ctgggaaacaggttgctttt	569
CASP8AP2_exon6.5	gcaatgaaagctgagagtgg	aaatgggctcttcacaatgc	409
CASP8AP2_exon6.6	agtgactgaaccaggatcg	aggctccagatgacacgact	496
CASP8AP2_exon6.7	agcagctcctgtggtaatgg	aacctcctatgtgcactct	683
CASP8AP2_exon7.1	acaacagtggaattgcctcagtatt	tttcttatcattcgtaacatgtgc	610
CASP8AP2_exon7.2	tgatgtgcggaagtcaaaga	cgatcaactatgccattctttt	471
CASP8AP2_exon7.3	ttgagtcagcaattttgagtttt	ttggcttgataatttctcaga	458
CASP8AP2_exon7.4	ggacaactccaacagagaattg	gcagctgcttctctggagtc	485
CASP8AP2_exon7.5	agtgatgcacaaatgggtga	tcaggagtgaactggacga	494
CASP8AP2_exon7.6	ccctgcgtttctccatact	gtttccaattcctccacagattta	513
CASP8AP2_exon7.7	taaacagagatgatgcctgatgaa	gatctacgtatgtgttgaagatg	389
CASP8AP2_exon7.8	gggaaacaaaagtgcctgaa	tatgcaaagtcacaggaac	531
CASP8AP2_exon7.9	ccacagaatctcccagtcca	cctcagcgtcccaaagtatt	515
CASP8AP2_exon8	ggtttaaattccctggttgg	ctggctgtgctgggattat	309
CASP8AP2_exon9	ccaattggaagatgagaaagc	tgttgctttcattttggaagtct	400
CASP8AP2_3'UTR	gctagtcatcattctgattgctta	ttcaaaattgcacctacgctc	551
UBE2J1_exon1	gactaccgaggaggctgac	gcgaaaccaggagctgag	453
UBE2J1_exon2	gccatagtctcatttgcact	cacatctgtaatgactcaaagcaa	285
UBE2J1_exon3	gcatttaattttctgtctggttaa	tggaccccaaaagcaaaa	354
UBE2J1_exon4	tgtgtcccatgagaggttaca	aagcaactgggtttattctgga	653
UBE2J1_exon5	gcagcctctgtggagtagtaa	ctgaattcctaaaagagcaaaactg	422
UBE2J1_exon6	gaattttccagtgctcttctttt	attgtaatagaactgcatcgctttc	340
UBE2J1_exon7	tccaacagagaggatttagcag	cgggactgatgagttagaatcc	345
UBE2J1_exon8	tcatatgtgtcctctgagattgtg	aaaaggaatgaagggtaaatacaaaa	496
MAP3K7_exon1a	gtatcatccggttgcctgagg	gggaggcaccttcagagc	609
MAP3K7_exon1	ctcctgtttccgatttcagc	gggaggcaccttcagagc	446
MAP3K7_exon2	tgttcagtggaatccaga	aaccgaattgctgatgttca	396
MAP3K7_exon3	tgattgcaatgctgttacat	tgaactattgggatcactgctg	393
MAP3K7_exon4	agttagggccaaaagaatga	ctgacggcaaatgtgaaga	273
MAP3K7_exon5	aagcaggactgatggagcat	gccaaatagagaaaagagaaactcc	393
MAP3K7_exon6	agcagcctccaagagagc	tatgcagaaataaaacctggaat	454
MAP3K7_exon7	tccctgataccatttcaaaa	agggaaaggggacaggagtag	298
MAP3K7_exon8	aacgtccgtgaagtaagagtaaaa	ttccctctgaaatgttctct	503
MAP3K7_exon9	agggaaaataaaacattaatcagga	ttaaaatgcaaatggggaca	264
MAP3K7_exon10	tctgttctgctgctgtagt	gctctttgcatgtttcagga	369
MAP3K7_exon11	cagaatcccatttgccatct	aacctttgacaactgaaactacca	304
MAP3K7_exon12	aatctgccttttctgagca	ttggagcaagaagcattttaca	337
MAP3K7_exon13	agctgttctctcttctttaca	acagtaattctgtttctgccta	323
MAP3K7_exon14	gggatctctaagtctctctgccc	cagtataatgctgcttctgtaaac	309
MAP3K7_exon15	tcatgttctgtctgttctg	caggtagcaacacaattgtcaac	210
MAP3K7_exon16	tgagatttctagggcatggtt	gggtgcttaagcttaacaagt	403
MAP3K7_exon17	aagatgcaaaatgataaaccaag	ttggcattcagaacacgc	412

Fragment	Amorce Foward	Amorces Reverse	Taille (pb)
ANKRD6_5'UTR_	cccttctcccactctca	attccagggaggcaactgat	667
ANKRD6_exon1	agtgtgcttctgtgtgtcct	cagcagttttcagacaatgg	486
ANKRD6_exon2n	tgctctagccctctgtctc	agagaccaagatgcagctaaaatgt	311
ANKRD6_exon2b	taaccgctctgtctgtgtg	tcgaggactcaaaagttcca	315
ANKRD6_exon3	tggtgtccgtaaaaatcca	ccactctgggctctactct	302
ANKRD6_exon4	agaatgtgagcgtgccttt	ctcacatgcctgaatgatcc	389
ANKRD6_exon5	ttgggtggagcatctatgt	gctgagtcccaggtagtgga	377
ANKRD6_exon6	tgactttgaagagccacacct	atccccgctctccagagt	309
ANKRD6_exon7	gtaggtgctgggtgtgactg	ccactgcctggttacattcc	323
ANKRD6_exon8	aagctgtaaattccattaggtcaga	gatgtgaaaccaaagagaaaaagac	378
ANKRD6_exon9	ttatgtattgcaaaggtctctgt	gagtggcttttagctgatgg	359
ANKRD6_exon10n	tgaacaaaagtggggctctt	taagtcaatgcctaaagtcctatc	400
ANKRD6_exon11	ccatcatctctatcccctggt	gggtggaaggggtgtgcta	352
ANKRD6_exon12	caggggctcctacttggttc	tgtaaaagctcttagggagtctcag	332
ANKRD6_exon13	tggtataattgaaaagtcctccttg	tatggttacgagcaaaatacagctcc	395
ANKRD6_exon14.1	tgatggagaaggctggtgat	cttgttgcccactcttcc	392
ANKRD6_exon14.2	agaaacgtcaaggtcagacag	gttgactccttggcatagc	502
MDN1_exon1	accgactagattttgttccattt	ctgcaccactccccactta	512
MDN1_exon2	accactgcactgtctctg	ttccgttttaccttctcagc	414
MDN1_exon3	cccaccaatcaatgaaaatatag	tcctttccctcctgacacac	460
MDN1_exon4	gtgtgtcaggagggaagga	aaccaaggccttctccaagt	602
MDN1_exon5	tcctttctagtgtcagttggc	gaaccagccaaagacagag	615
MDN1_exon6	cacaatgccatgagatcttta	ccaacagttataagcaagacc	532
MDN1_exon7	tggggccaacctatgtaaac	tgaagtacctgcaacatagtagc	400
MDN1_exon8	gacgttctttaaggggtgtg	ccttgctgaaagtagaccag	324
MDN1_exon9	aatatccagaggcacaattcag	gttgatgaggggtctggtgg	283
MDN1_exon10	atacaattttggctgaccagttt	ttctagctggtaagaacttgaacc	440
MDN1_exon11	gatgcctttgatgtctttgg	aaataacaacggaagtcaacagc	214
MDN1_exon12	ctctgtgcccaggaaaatg	gagaccagcaagcaagcaag	251
MDN1_exon13	ccaaaataagcctctggatgag	ctgagctagacctctgtcaagttt	259
MDN1_exon14	agctgtttctcatcctgttg	tggcactctttaaactctgtgg	363
MDN1_exon15n	gcctaaggagcactgga	cctgcaaaaagctccaataa	290
MDN1_exon16	ttttctgagccatgcttttaac	cgcttactcttccccaaaac	370
MDN1_exon17	tgtgtaagatgcttaattttgtgtg	aaatagtaacctgcctgaaacattg	289
MDN1_exon18	ccccgcctctatttctaacc	ggcccatgcatcctcttaa	339
MDN1_exon19	gacaaggatggtgtgagcag	aggattctgaggtgggaggt	349
MDN1_exon20	caagcagttaaaatgagctgaca	catattgtgtgtgtgcacgag	300
MDN1_exon21	ccaggaagttgtgtgatga	aactggaaagcacaggcaac	372
MDN1_exon22	ccaagaggttaaatgttctgg	aaacttttgcaacagattaccttta	324
MDN1_exon23	ttcaacaagtggtgttttcc	ccatagtgtctccctcaaac	443
MDN1_exon24	ctatgattgcaccaccatactttag	gcctcaattggaaggatga	411
MDN1_exon25	ttctcctgatctgcagtgt	ggaggctctgacattcacca	497
MDN1_exon26	tatgtagcattgtctcctccttc	ttggaaaaatacatcaacagacaga	421
MDN1_exon27	gctgggattacaggcttgag	ggcctgcaggaataagatca	489

Fragment	Amorce Foward	Amorces Reverse	Taille (pb)
MDN1_exon28_29	ctacctcaccagccgcgtat	ccccgaccactcttagtct	632
MDN1_exon30	gactcccacagtggttctctc	accccaccactaactcatgc	308
MDN1_exon31	cagaatgcctacttcacccc	atgatcatgacacggcactg	349
MDN1_exon32	cacagaaattgggatagtggagtc	tgtaacaatgacatttcaggcac	552
MDN1_exon33	ttcttcaagactgtttccag	tacacacagggctgatgtcc	298
MDN1_exon34	agcagagaccccttttaggc	gtgtgccaatcacctttcaa	491
MDN1_exon35	ccgggaacctgtgctagag	catgccagtcaggattttcaa	462
MDN1_exon36	ggggaaatattgaaataggattg	tgattaggcaaataaattgacacag	441
MDN1_exon37	gccagccccaagtattatc	aagtcacagcgggatctt	335
MDN1_exon38	ccaacataactcagccaaaa	ccagggcaaaagatgaagg	552
MDN1_exon39	cgactgggcctctttt	tgcccttccactagaaacctg	506
MDN1_exon40	ccaggcatttgaagtcttg	ggcttgcaattagtgtatgtcc	430
MDN1_exon41_42	taagggaatttggccagtg	catgaactcatcatagggtcagag	705
MDN1_exon43	taaaccctgtgctgactg	cctcagcttcttttactttctagg	520
MDN1_exon44	atgaaatcttaaaaaccttggctaga	tatggctgaggacgcttg	402
MDN1_exon45	ccgtgcatggaaggaaag	ggaagtcctactgaacgtctacctc	264
MDN1_exon46	tgatgctgagctacaccttg	cgaaatctttgatgagcagtc	368
MDN1_exon47	tatttgggtggggtgacag	tcttaggtcactgggttcc	359
MDN1_exon48	gtgaggtgctcgcatgg	tgtgtctgaccatttccag	382
MDN1_exon49	tgatccaatatttggaaagaggtt	cctaggagacctccaactg	441
MDN1_exon50	aggtcctcatatgtgactagtgtt	gcttctgcatatcatgagtcttcta	366
MDN1_exon51	tgtgctcaaagtaaaacaatgaaaa	ggttcacaaaattcaacacacataa	340
MDN1_exon52	ttccaagtgttccagcaaatag	cagctgctgaatagcctctc	286
MDN1_exon53	gaccttgtactgggataacattt	aatattgggcatataacaacactaaa	355
MDN1_exon54	ttggtgagcagctctgggtc	ccaatatgccaaggggaataaac	366
MDN1_exon55	agaaaatattaatggcttcttactg	cagttccaagttccaaaagg	276
MDN1_exon56	aaacaagtcctttgtttctgg	ctctaccctcacatcacc	451
MDN1_exon57	ttgcagtcacatagcaggtg	tgcttcgtaaccatcccta	429
MDN1_exon58	caccttccctaatgtagcagc	ttccaaccagctgtgcaaaag	283
MDN1_exon59	tgggccttagaagaaagaagac	caatcacctgtttatgaccactc	365
MDN1_exon60	ctcaggttccctaatgtctgc	tctcactgggtctctgtcc	364
MDN1_exon61	attgatgctgcattctgtgg	ttgtgatgatctgagcacc	602
MDN1_exon62	gattccttccatctgttctctac	ccccctctcctcttca	388
MDN1_exon63.1	catctgagcaccagcaacat	cggcatctggatagaagggtg	527
MDN1_exon63.2	gcaggccctccacatagat	agtgggacaggcttcttg	430
MDN1_exon63.3	gacactttgtctcggtgaa	atagggaaaaagaaggaacagaaaa	370
MDN1_exon64	ttggatgttggcttttatttg	agcaagaccagctctaaaatacat	423
MDN1_exon65	tgcccagcctgtagtctttt	gccaaggaaactccaataagg	561
MDN1_exon66	ggccctgtgctgacatc	cagggataatggtgaggctg	394
MDN1_exon67	ggggaatctctgttcagg	caacaaaggtgccacaagac	262
MDN1_exon68	gggcccagtagcttctactc	accagtttctcctcaag	403
MDN1_exon69	gcatgtagcttctgcatctttg	tcctacactttgcagcactcc	273
MDN1_exon70	cttgccatccgtagtatcc	catgcagagaattcaaagcc	317
MDN1_exon71	tgaaatatgaaggccacagc	tggataacagggttaacgaaag	265

Fragment	Amorce Foward	Amorces Reverse	Taille (pb)
MDN1_exon72	agtgagctctggctttgctg	agcaacatcaaaacaatcaagg	316
MDN1_exon73	aggtacagggtattagattatgtatgg	tgcttgacataaaaacacag	381
MDN1_exon74	caacagttaaatttagttcccttcg	aaggacacagttgccacattc	329
MDN1_exon75	gaatgatactggcctttgtctc	gtgtccaccatctcaactgtcta	372
MDN1_exon76	gctgtttagaagactttgctttgag	tgagccaggcacttttgtaa	363
MDN1_exon77	gacagctgactcttggttatgg	ctgcaaaaagctcagttcca	339
MDN1_exon78	aaacagctttctagaggcacatc	ttattcctctcccacatgc	283
MDN1_exon79	ttccttctgactgtatgaaaaagc	ctaggtccagggtgtctaaaag	735
MDN1_exon80	ccttcagctatgatgagttctacct	ctgcctcagaacctggac	469
MDN1_exon81	gcttgacacagtggtctatc	aacatccatccttaactatttagcc	367
MDN1_exon82	ggctaaatagttaaggatggatgt	gcaagccctaagcttctcaa	461
MDN1_exon83	accaccactatctagttccagaatg	cacagggagagcaaatcaca	374
MDN1_exon84	tcctgtggcaagaatgaaatc	gcaccaatatactagggtctgtag	352
MDN1_exon85	tggtctctctgtgtttctc	gcagctgctgaggttttcat	429
MDN1_exon86	cgggtccacacctctcta	aatggtagggtgtgggcaga	319
MDN1_exon87	ttcttaggtcacggatggc	cctgtaagagcctctgttc	453
MDN1_exon88	atgtgtgcagataattttagggaat	ctcagactgggattgagcctac	420
MDN1_exon89	tgccactcgctggttagag	ccacatgttgatggaggagatc	533
MDN1_exon90	tgctgttgcaaggctcc	tcaacaacaaaacaaacaacaaat	365
MDN1_exon91	tcaatgcagcacagtaacca	ctgctcaccaaggctgctat	325
MDN1_exon92	tggtacacctgatttactatcc	ggcacagctgacttgacttg	470
MDN1_exon93	tagaatgacagaaaccataccact	tggtattaggacatggaactgaa	364
MDN1_exon94	gaaatgtgttgagagtgaatgaat	aacaaccagatgtccataaagttc	401
MDN1_exon95	tactgtagggcggaagacac	ttctccatagcctgtgctc	298
MDN1_exon96	aggtcatttctaccactttgctta	aagctggcactataaatggttaggt	314
MDN1_exon97	caggttctagttactgtctattgg	gccatcatatattaagcattagcc	405
MDN1_exon98_99	aagccttgggtttgtgtg	atactgtatgctgtggagg	839
MDN1_exon100	ttcaatgtcagaaatactatcagctc	aaacacagtgacggggacac	249
MDN1_exon101	tgtcctactttgggtagttgtgagt	ccatattcagattgaacaggttg	298
MDN1_exon102	caggagatgtaaaggtagcaaaag	aggcaggaagaaggataactct	537
MDN1_3'UTR	ttacaacgtgatcttacagcctaca	agttgcttatgagaacacacacac	474
RRAGD_5'UTRa	gggtcacgcagctctctct	cttactccctcctccccttt	679
RRAGD_5'UTRb	tggaagagtggcatcatctg	agagccctgaccaagaaaca	540
RRAGD_exon1	agctgttgaggggaacctt	tccatctacagcatgaaacagg	463
RRAGD_exon2	agaaggcagattaccggtgt	gctatagaagcaatcgaaataaga	300
RRAGD_exon3	tggtcattcaattttgtgtatca	cggtgacattgtctcaataac	398
RRAGD_exon4	aagccggtctctgtcactg	ctgtgtccaccacattca	318
RRAGD_exon5	tccttactgccccctactg	gcagttctcacacgggattt	537
LYRM2_exon1	gcagcagctagggtcctcagt	aaccaaggaagcagccagt	388
LYRM2_exon2	tttcaaaattgaccaacgag	ccagctcagtgccactatattc	362
LYRM2_exon3.1	aggcagcagttccaataggt	ggcaactgttctgatgtgtttt	343
BACH2_5'UTR1	ctcccgtaaagttattgtgaatgg	cgttcctagaaaatgccataaaag	666
BACH2_5'UTR2	tcaagcagagaaggaagtgg	aacggacataactgaaaaacaaaa	329
BACH2_5'UTR3	gtgcagactggatcattgc	ggcaggagaagcaacctctt	328

<b>Fragment</b>	<b>Amorce Foward</b>	<b>Amorces Reverse</b>	<b>Taille (pb)</b>
<b>BACH2_5'UTR4</b>	tgaaaattctcgtggacagatg	tgctgcacctcctgacatag	481
<b>BACH2_5'UTR5</b>	agaacggagatggcgagat	tcatgtgtgctgggctatt	330
<b>BACH2_exon1</b>	catgatgttcttctcacctcct	tgactatgccacagacctaaca	495
<b>BACH2_exon2.1</b>	cagaatcattgctgaccagt	gctctccttggtgtctgtgg	571
<b>BACH2_exon2.2</b>	ggaggagacgatggattcag	gctctgtcctggcgctcag	411
<b>BACH2_exon2.3</b>	aggttttgcaagcacattcc	gaggtgctcacttggcaca	579
<b>BACH2_exon2.4</b>	tttgacaaggggatcactca	tgtctgctccgagaacgat	688
<b>BACH2_exon2.5</b>	ctgccacagaacatcagga	tgctttctaggacagaagtgg	365
<b>GABRR2_exon1</b>	gatggatcaatggtcaagcc	atcccactgtgccactgc	561
<b>GABRR2_exon2</b>	ctgcagggagtaatagccc	gccagagggagccagag	552
<b>GABRR2_exon3</b>	caactggggctgttccc	tctgcccacacaggcac	489
<b>GABRR2_exon4</b>	ccacagtagtgaatggtggg	gacagtctcagggccaag	511
<b>GABRR2_exon5</b>	cagataactgttccaaacttctgc	gccagtccagaagtaaataggtctt	340
<b>GABRR2_exon6</b>	tatttacttctggactggcatagga	gggagacagagtgagacctgt	371
<b>GABRR2_exon7</b>	gtcagtgaaagacgggttcc	gcaagaaacatgaagttgctcc	439
<b>GABRR2_exon8</b>	tctccgaggtggaacacac	caagatcctcctcgtttgc	560
<b>GABRR2_exon9</b>	aatgtggcttggctcttgg	gtgtggtcaacaagtccgctc	479

**ANNEXE 2 : Amorces utilisées pour amplifier les séquences répétées de CAG**

<b>Fragment</b>	<b>Amorce Foward</b>	<b>Amorce Reverse</b>	<b>Taille du fragment (pb)</b>
<b>chr6_54267351</b>	ccaagtggtcctcgacat	atggaggccaccaatgac	307
<b>chr6_67967041</b>	cctgaatacaagatacctccagat	cagcatgcagtagtggcagt	357
<b>runx2_exon3</b>	tcccgtagatccgagcac	ggcggtgtagcctcta	392
<b>TFEB_exon3_F</b>	catatacctgctgcccttc	gattctccaggtaggactgcac	370
<b>IBTK_intron</b>	tccctactgatcttctactattactgc	cagataccccaaggttcaga	362
<b>SCA3_MJD</b>	ccagtgactactttgattcg	ggctggcctttcacatggat	205

**ANNEXE 3 : Article de la première description de la famille  
canadienne-française par les Dr Giroux et Barbeau**

(La version initiale est dactylographiée et de mauvaise qualité.)



# Erythrokeratodermia With Ataxia

Jean-Marie Giroux, MD, FRCP(C), and André Barbeau, MD, FRCP(C), FACP, Montreal

An apparently new neurocutaneous syndrome was observed in 25 members from over five generations in a family of French Canadian ethnic background. The syndrome is characterized by the appearance soon after birth, of papulosquamous erythematous plaques which have mild variations in intensity and which tend to subside during the summer months. In most cases, the cutaneous manifestations almost disappear near the age of 25, sometimes to reappear after the age of 40. At that time, a slowly progressive neurological syndrome, with decreased tendon reflexes, nystagmus, dysarthria, and severe gait ataxia, becomes the predominant feature. The syndrome is inherited in an autosomal dominant fashion.

Known neurocutaneous syndromes are numerous, and their cutaneous and neurological manifestations are varied. Tumors are frequent in the phacomatoses; fibromas and angiofibromas individualize tuberous sclerosis. In von Recklinghausen's disease, skin neurofibromas are more frequent. On the other hand, the Lindeau-von Hippel syndrome, the Klippel-Trenaunay syndrome, and the Sturge-

Weber disease are characterized by different abnormal vascular proliferations of the skin and of the underlying bone structure. In hereditary dermatoses, neurologic symptoms are often prominent. Some of them can be aggravated by exposure to light, such as Hartnup disease. Others are classified within the large group of ichthyosiform erythroderma,<sup>1</sup> and they include Sjögren's syndrome, Rud's syndrome, and their variants. Despite the large number of eponymic entities already described, it is still possible to delineate new combinations of symptoms.

In this study, five generations of a family are described in which several members developed a rather unique syndrome. Initially, the affected members of this family have had, during infancy, adolescence or young adult age, a papulosquamous, ichthyosiform eruption, followed after the age of 40, by neurologic manifestations, in the form of progressive gait ataxia.

## Ethnic, Geographic, Social, and Genetic Background

The family is of French Canadian ethnic background, and all branches known to us, with the exception of one, have lived in the province of Quebec, mainly within 50 miles of Montreal. One branch of the family moved to the Niagara peninsula of Ontario. Economically, most members would be classified as of low-middle income, but all have regular employment; none are subsidized only by welfare. Cooperation with most branches of the family has been

Accepted for publication Nov 6, 1971.

From the Department of Medicine, Section of Dermatology, Hôtel-Dieu de Montréal (Dr. Giroux); the Département de Neuro-biologie, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (Dr. Barbeau); and the Département de Médecine, Université de Montréal (Drs. Giroux and Barbeau), Montreal.

Read before the Canadian Dermatological Association meeting, St. Johns, Newfoundland, July 10, 1971.

Reprint requests to Hôtel-Dieu de Montréal, 3840, rue Saint-Urbain, Montreal (131) (Dr. Giroux).

excellent. There is no known consanguinity within the five generations studied which are represented in Fig 1. The hereditary pattern is clearly autosomal dominant, as will be further delineated.

**Report of Cases**

**Propositus.—Patient V-22.**—This patient was 3 years old when first seen by us. She was brought by her mother because of "dry skin" on the lower extremities. The mother was very concerned because she had heard that in the family several members had had this problem when they were young. On physical examination, the child had a diffuse papulosquamous eruption which included the lower half of the buttocks, the thighs, legs, and the dorsal aspect of the feet, reminiscent of erythrokeratoderma variabilis. The planter regions were not affected, nor was the rest of the skin. The patellar and achilles tendons' reflexes were diminished, but, otherwise, the results of the neurological examination were normal. A skin biopsy was performed which will be described further.

In view of the family history given by the mother and the elucidation of the fact that at a later age many of the victims developed difficulties in walking, we carried out a detailed examination of available members of the family.

**Fifth Generation.—Patient V-1.**—A 21-year-old male patient was hospitalized for extensive investigations. He had had a papulosquamous eruption since infancy. The lesions were located on the wrists, dorsal aspect of the hands, knees (Fig 2 to 4), the lower third of the legs, and dorsal aspect of the feet. A skin biopsy was done in the right knee region. Intolerance to sunlight was slight. Results from neurological examination were essentially normal except for a slight gait hesitation after long walks and some fine nystagmus in the right lateral gaze. The tendon reflexes were present but not brisk. Sensory examination (superficial and deep sensations) revealed entirely normal findings. Lymphocyte culture for karyotyping was carried out. The chromosomal constitution proved to be of a normal 46 XY pattern (30 cells). Five cells had 45 chromosomes with partial breaks in C group chromosomes (two cells), G group (two cells), and D group (one cell). The patient, however, had undergone x-ray film examinations two months prior to the karyotyping.

A large number of laboratory studies were carried out in an effort to elucidate possible pathogenetic phenomena, but all

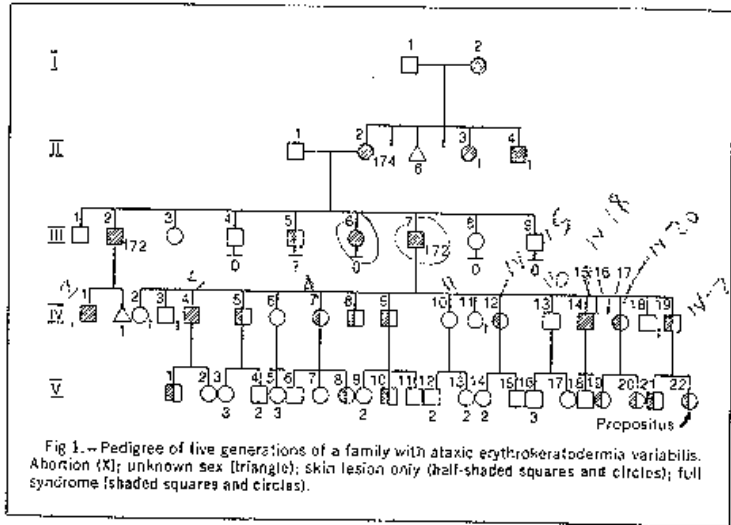


Fig 1.—Pedigree of five generations of a family with ataxic erythrokeratoderma variabilis. Abortion (X); unknown sex (triangle); skin lesion only (half-shaded squares and circles); full syndrome (shaded squares and circles).



Fig 2.—Papulosquamous eruptions on knees (patient V-1).

Fig 3.—Close-up of right knee showing well-defined, geographic border of lesion (V-1).

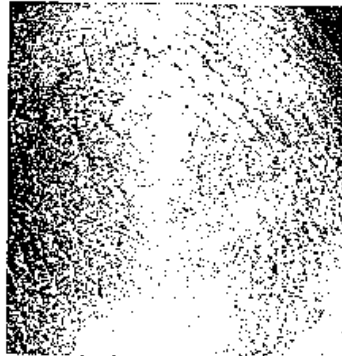
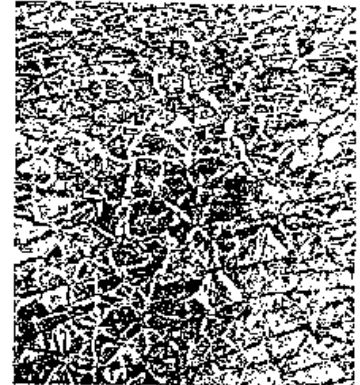


Fig 4.—Closer view of right knee showing hyperkeratosis and lichenification of lesion (patient V-1).



results were within normal limits. These included values for the following: urinalysis; complete blood cell count and differential; hemoglobin; hematocrit reading; sedimentation rate; blood smear; sulfobromophthalein; electrolytes; plasma cortisol; urinary 17OH- and 17-ketosteroids; urinary porphyrins; serum carotene; vitamin B-12 and folic acid; glucose tolerance test; and lupus erythematosus. Also included were results for the following: latex agglutination; blood iron; iron-binding capacity and saturation; blood ceruloplasmin; T-3; T-4; protein-bound iodine; serum electrophoresis; and immunoelectrophoresis. Results from skull, lung, and skeletal x-ray films were all normal. Results from the electrocardiogram, electroencephalogram, and γ-encephalogram were within normal limits.

Special attention was paid to a study of lipids, but the lipid profile was normal. The following values were obtained: cholesterol, 123 mg/100 ml; triglycerides, 92 mg/100 ml; uric acid, 5.8 mg/100 ml; glucose, 86 mg/100 ml. Lipid electrophoresis results were also normal. Plasma phospholipids (total, 152 mg/100 ml) were within normal limits, with the possible exception of a slightly diminished sphingomyelin: cephalin, 1.9%; lecithin, 70.5%; sphingomyelin, 17.1%; and lysolecithin, 10.5%. Phytanic acid assays by thin-layer chromatography and gas chromatography were repeatedly negative.

In this fifth generation, three other youngsters (V-10, V-19, and V-20) were described, by at least two reliable observers, to have had similar skin eruptions limited to the distal areas and appearing at birth. Unfortunately, they were not available for examination. Moreover, the following children were examined, and the results obtained from neurological and dermatological examinations were normal: V-18; V-17; V-16 (three boys); V-15; V-14 (two girls); V-13; V-12 (two boys); V-4 (two boys); and V-3 (three girls).

Finally, two other patients (V-21 and V-8) were examined in detail. Both had erythematous scaling eruptions on the dorsal aspect of hands and feet. In both patients, tendon reflexes of the lower extremities were abolished, and slight tandem ataxia was noted. Otherwise, results of neurological examination were normal.

Thus, in the fifth generation, the predominant features were erythematous scaling eruptions, with or without diminished tendon reflexes.

#### Fourth Generation.—Patient IV-14.—

This patient, who was a 30-year-old man, had similar skin lesions shortly after birth. They have persisted since that time,

are always worse in winter, and clear in summer. At the time of examination, he also had a sharply demarcated papulosquamous eruption located on the dorsal aspect of the hands and wrists. A biopsy specimen of the skin on his right wrist was removed. Neurological examination revealed marked adiadochokinesia of his right upper extremity and moderate dysarthria. Tendon reflexes, gait, and deep sensations were normal.

*Patient IV-7.*—In the opinion of the other siblings, as well as her own, this 40-year-old woman had, when she was younger, one of the most severe skin eruptions seen in this family. She had a papulosquamous eruption on the elbows and heels. She complained of severe paresthesia in the four limbs. However, except for diminished tendon reflexes, the results from neurological examination were normal.

*Patient IV-4.*—This 44-year-old man developed a papulosquamous eruption of the lower extremities, shortly after birth, which lasted until the age of 20. More recently, his wrists were slightly involved. The neurologic examination revealed a striking diminution of tendon reflexes over the biceps, triceps, and achilles tendons, without changes in deep sensation (position, vibration). He complained of losing his equilibrium when walking, and, in fact, he had unsteady tandem walking. There was slight nystagmus to lateral gaze. No ataxia was noted in finger-to-nose tests. The remainder of the neurological examination disclosed normal results.

Other affected members of this generation were also examined by us or other physicians (IV-12; IV-9; IV-8; IV-5; and IV-1). All had an erythematous scaling eruption which tended to disappear or become attenuated around the 20th birthday. When neurological signs were present, they included decreased tendon reflexes, occasional cramps in the legs, and tandem ataxia. As the skin manifestations decreased, there was a tendency for more marked neurological impairment, as became evident in the third generation.

*Third Generation.—Patient III-7.*—This patient died at the age of 72 in 1964. We know that, from infancy until the age of about 30, he had a skin eruption similar to others in the family. This was confirmed by six of his children. After the age of 30, the eruption disappeared progressively. At about 40 years of age, he developed some difficulties in walking, complained of pains in the lower extremities, and would lose his equilibrium, with frequent falls. In the last 11 years of his

life, he was unable to walk and remained confined to a wheelchair. He was hospitalized shortly before his death and examined by a competent neurologist whose notes revealed a "supercerebellar syndrome without deep sensory changes or pes cavus," but with nystagmus, loss of tendon reflexes, and severe gait ataxia. No autopsy was performed.

*Patient III-6.*—This 66-year-old woman also had a skin eruption, described as red and scaly, during her youth. The eruption was mainly concentrated around the ears, the elbows, and the knees. The hands and feet were not affected. Her difficulty in walking was first observed at the age of 43, with occasional drops and "knee weaknesses." In the last two years, her difficulty in walking had increased markedly. On physical examination, she had a papulosquamous eruption on the knees and ankles. The dorsal aspect of the hands was slightly scaly. The neurologic examination revealed a clear-cut ataxia in the finger-to-nose exercise (past pointing) and in attempted gait. There was also marked bilateral adiadochokinesia, a slight intention tremor in both hands, internal strabismus of the left eye, and slowed lateral movements of the right eye. Osteotendinous reflexes of the four extremities were markedly diminished. Speech was slow, dysarthric, and staccato. There was some facial asymmetry, with the left labial commissure lower than the right. Results from the funduscopic examination were normal. The other cranial nerves were also normal. Fasciculations were observed on both forearms. All sensations (superficial and deep) were within normal limits, except for a slight decrease in vibration sense at the ankles. Despite the diminished reflexes, the gait was spastic, but there were no Babinski's signs. Tone of the muscles in the lower limbs was slightly increased. There was no pes cavus.

Two further cases of the syndrome are known in this generation, but were not examined by us. Patient III-5 only had the papulosquamous eruptions, while patient III-2 had such a severe case of both ichthyosis and ataxia that he was confined to a wheelchair.

*Second Generation.*—Patients described in the pedigree chart (Fig 1) as being affected were personally examined or reliably described by more than one observer as having had skin or gait abnormalities. Some were also described to us as involved. However, the data from these patients were not recorded because the information could not be checked with more than one source.

Three patients in this generation were

clearly affected with early skin changes and late neurological signs (II-2; II-3; and II-4). In all three cases, the last years of life were spent in a wheelchair with "paralyzed legs." Previously, ataxia had been the main feature.

**First Generation.**—*Patient I-2*—All the evidence from family records points to this patient as being the probable origin of the illness in the family. This woman died at an advanced age from an unknown "chronic neurological disorder." She had spent four years in a wheelchair before her death. Further generations could not be studied reliably.

#### Biopsy Specimens of Skin

We were able to study biopsy specimens of skin from three of our patients. These biopsy specimens showed remarkable similarities.

**Patient V-22.**—The biopsy specimen was taken from the left thigh of this patient. Hyperkeratosis, small foci of parakeratosis, an almost normal granular layer, and small papillomatosis were seen. There was a very mild perivascular lymphocytic infiltration (Fig 5).

**Patient IV-14.**—Biopsy specimens of skin were taken from the right wrist. The hyperkeratosis here was more striking. The granular cell layer was well developed. There was a slight vacuolization of granular cells and increased clumping of keratohyaline granules. There was no spongiosis. The dermis was normal (Fig 6).

**Patient V-1.**—The biopsy specimen of skin was taken from the right leg. Here, again, the hyperkeratosis was prominent. There were small foci of parakeratosis. The granular layer was the same as that in patient IV-14. There was slight acanthosis. There was a mild perivascular lymphocytic infiltration around the vessels of the upper dermis and the dermal papillae (Fig 7).

One common feature of the three skin biopsy specimens was the increased granular cell layer with small vacuolization and clumping of the keratohyaline granules. As a whole, this is quite reminiscent of the nonbullous form of dominant ichthyosis congenita. On the other hand, the papillomatosis and the laminated arrangement with saw-



Fig 5.—Biopsy specimen of skin from left thigh of patient V-22 showing hyperkeratosis, foci of parakeratosis, papillomatosis (hematoxylin-phloxine-safran, original magnification  $\times 600$ ).

toothed contour of the stratum corneum, the thickness and weavy aspect of the epidermis (especially in patient IV-14) are quite similar to the features seen in erythrokeratoderma variabilis, as described by Vandersteen and Muller.<sup>2</sup> The PAS stain showed normal basement membrane. The elastic tissue was also normal.

#### Comment

Five generations of a family were studied in which 25 subjects (14 males and 11 females) were variably affected with an apparently new neurocutaneous syndrome. Fifteen affected subjects were examined personally, and ten were reliably described as being affected. ~~On-~~

~~domance appears to be inherited fol-~~  
~~lowing an autosomal dominant pat-~~  
~~tern.~~ In the most extensively studied generation, the fourth, ten of 19 siblings had the disease. In the last three generations, 21 out of a possible 50 descendants were affected. The skin manifestations were characterized by papulosquamous plaques which appeared soon after birth, and tended to subside in the summer months. Except in a few cases, the skin eruption progressively disappeared after the age of 25. The individual lesions were usually discrete, configurate patches of erythema and hyperkeratosis. The more frequent distribution observed was on the dorsal aspects of the hands



Fig 6. — Biopsy specimen of skin from right wrist of patient IV-14. The hyperkeratosis is striking; vacuolization of granular cells and increased clumping of keratohyaline granules (hematoxylin-phloxine-safran, original magnification  $\times 800$ ).



Fig 7. — Biopsy specimen of skin from right leg of patient V-1. Note lamellar and saw-toothed contour of stratum corneum. Granular cell layers show same changes as in patient IV-14 (hematoxylin-phloxine-safran, original magnification  $\times 400$ ).

and feet, the wrists and ankles, the knees, and the external ears. Occasionally, the entire lower extremities and buttocks would be affected. None of the patients examined have shown lesions of the palms or soles. The scalp, hair, and nails were not involved. Cataracts were never noted. The general appearance of the patients was normal.

Skin biopsy specimens in our patients point to a nonbullous form of congenital ichthyosiform erythroderma. It is to be noted that the resemblance to erythrokeratoderma variabilis is striking. Enzymatic, histochemical, and ultrastructural studies have been started in these patients, and the findings will be reported elsewhere.

The neurological component is also intriguing. Except for paresthesia, once the patients reached the age of 40 years, the following neurological symptoms and signs were observed by the following: 1. occasional numbness of the hands and feet; 2. occasional muscle pains; 3. occasional mild tremors of the hands and feet; 4. occasional mild spastic paraparesis. In all cases, results of examination of the fundus were normal, and retinitis pigmentosa or retinal degeneration were not seen. Otitis media did not seem to be affected. Deafness is not a feature of this illness. There are no superficial or deep sensory changes except for paresthesia and numbness.

No abnormal reflexes have been noted. Sphincter control is always normal. Mentation is usually entirely within normal limits. Unfortunately, no autopsy has been performed. It is noteworthy that, in the five generations studied, we have not found a single patient who manifested neurological signs and symptoms along with the skin changes. Conversely, the only neurological sign observed before the age of 40 is the decrease in tendon reflexes. Ataxia is always a late manifestation.

The differential diagnosis of the disease in this family included several known syndromes, especially the variants of ichthyosis with neurological signs and the neuroectodermic dysplasias.<sup>3</sup>

The Sjögren-Larsson syndrome<sup>4</sup> is inherited in an autosomal recessive fashion, and the distribution of the skin eruption is mainly on the flexor surfaces. The palms are often affected. Mental deficiency is generally of a high degree, which was not the case in our series. Spasticity is usually severe, and in most cases, there is a definite retinitis pigmentosa.

The Netherton syndrome<sup>5,6</sup> shows, in addition to ichthyosiform ery-

throderma, sparse, brittle hair with defects on the shaft, trichorrhexis invaginata, and, sometimes, pili torti. Recent studies are concerned with the question of whether this syndrome is a distinct entity.<sup>7</sup>

In Rud's syndrome,<sup>8</sup> the ichthyosiform erythroderma is associated with dwarfism, mental deficiency, hypogonadism, and epilepsy, which was not the case in our patients.

Refsum's syndrome is an autosomal recessive disorder.<sup>9</sup> As in our cases, patients with Refsum's syndrome develop, usually later in life, polyneuritic changes with weakness and loss of reflexes. However, we were not able to find nerve deafness or typical retinitis pigmentosa with night blindness in any of our cases. In addition, repeated dosage of phytanic acid<sup>10</sup> produced negative re-

sults in one of the most severely affected cases (V-1).

In 1968, Schnyder and collaborators<sup>11</sup> described the case of a girl who had an erythrokeratoderma combined with labyrinthine deafness, psychic and somatic retardation, and motor impairment. None of our patients had one or the other of the previously associated signs, and the neurological impairment in the motor sphere was clearly different.

Although our patients did not exhibit those configurated geographic plaques which may change pattern in a matter of weeks, the structure of the lesions remained that which were observed in erythrokeratoderma variabilis.<sup>12</sup> That erythrokeratoderma variabilis is a form of congenital ichthyosiform erythroderma has been challenged recently. This is

why we believed that the studies of Vandersteen and Muller<sup>2</sup> should be done on our cases. These studies are now in process and will be reported later. To our knowledge, there has been no case of erythrokeratoderma variabilis reported with neurologic symptoms and signs.

Although basic studies are not yet completed, the unusual conglomeration of symptoms encountered in this family, and apparently not yet individualized, led to this description of it, in the hope that similar cases may be uncovered and studied by others.

Professor Jean Davignon performed the lipid studies on patient V-1.

Mr. Yves Marcel performed the phytanic acid determinations.

Professor Marcel Cadotte performed lymphocyte culturing and karyotyping.

#### References

1. Schnyder VW: Inherited ichthyoses. *Arch Derm* 102:240-252, 1970.
2. Vandersteen PR, Muller SA: Erythrokeratoderma variabilis: An enzyme histochemical and ultrastructural study. *Arch Derm* 103:362-370, 1971.
3. Reed WB: Congenital cutaneous diseases associated with central nervous system disorders. *Postgrad Med* 41:527-536, 1967.
4. Sjögren T, Larsson T: Oligophrenia in combination with congenital ichthyosis and spastic disorders: A clinical and genetic study. *Acta Psychiat Scand*, suppl 113, pp 1-112, 1957.
5. Netherlton EW: A unique case of trichorrhexis nodosa "bamboo hairs." *Arch Derm* 78: 423-427, 1958.
6. Wilkinson RD, Curtis GH, Hawk WA: Netherlton's disease. *Arch Derm* 89:46-54, 1964.
7. Hurwitz S, Kirsch N, McGuire J: Reevaluation of ichthyosis and hair shaft abnormalities. *Arch Derm* 103:266-271, 1971.
8. Van Bogaert L: Les dysplasies neuro-ectodermiques congénitales. *Rev Neurol* 68:352-356, 1935.
9. Refsum S: Heredo-ataxia hemeralopica polyneuritiformis, familial syndrome not previously described: Preliminary report. *Nord Med* 28:2652-2655, 1945.
10. Refsum S, Eldjarn I: Heredopachia atactica polyneuritiformis: An inborn defect in the metabolism of branched-chain fatty acids, in *Zukunft der Neurologie Georg*. Stuttgart, Germany, Thieme Verlag, 1967, pp 36-44.
11. Schnyder VW, Wissler H, Wendt GG: Eine Weitere Form von atypischer Erythrokeratodermie mit Schwerhörigkeit und cerebraler Schädigung. *Helv Paediat Acta* 23:220-230, 1968.
12. Brown J, Kierland RR: Erythrokeratoderma variabilis: Report of three cases and review of the literature. *Arch Derm* 93:194-201, 1966.