



# Etude génétique et fonctionnelle de l'ataxie spastique autosomique récessive de Charlevoix-Saguenay (ARSACS)

Julie Pilliod

► **To cite this version:**

Julie Pilliod. Etude génétique et fonctionnelle de l'ataxie spastique autosomique récessive de Charlevoix-Saguenay (ARSACS). Génétique. Université de Bordeaux, 2014. Français. <NNT : 2014BORD0368>. <tel-01157617>

**HAL Id: tel-01157617**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01157617>**

Submitted on 28 May 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
DOCTEUR DE

## **L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE sciences de la vie et de la santé  
SPÉCIALITÉ génétique

Par Julie PILLIOD

### **Etude Génétique et Fonctionnelle de l'Ataxie Spastique Autosomique Récessive de Charlevoix-Saguenay (ARSACS)**

Sous la direction de : Cyril GOIZET

Soutenue le 27 novembre 2014

#### **Membres du Jury**

Pr Erwan Bézard

Président

Pr Dominique Bonneau

Rapporteur

Pr Benoit Funalot

Rapporteur

Pr Mathieu Anheim

Examineur

Pr Cyril Goizet

Directeur de thèse



## **Etude génétique et fonctionnelle de l'ataxie spastique autosomique récessive de Charlevoix-Saguenay (ARSACS)**

ARSACS est une maladie neurodégénérative autosomique récessive caractérisée par une ataxie cérébelleuse, une paraplégie spastique et une polyneuropathie sensitivo-motrice démyélinisante. Le gène *SACS*, responsable de la maladie, a été identifié en 2000. Depuis, de nombreux cas ont été décrits dans le monde entier. Le gène *SACS* code pour la saccine, dont la fonction reste inconnue malgré l'identification de nombreux domaines protéiques et surtout la description récente d'un rôle dans la physiologie mitochondriale. Les objectifs de ma thèse étaient d'identifier des mutations dans *SACS* au sein d'une large cohorte de patients atteints d'ataxie grâce à plusieurs collaborations puis d'étudier leurs effets au niveau du compartiment mitochondrial en utilisant essentiellement des cellules de malades. Nous avons pu identifier 2 variants de *SACS* dans 10% des cas analysés recrutés *via* le réseau international SPATAX. Nous avons parallèlement confirmé les mutations de *SACS* identifiées par séquençage haut-débit chez 5 autres patients *via* le PHRC ATAXIC et analysé un dernier cas porteur d'une délétion complète de *SACS* découverte par CGH-array pangénomique. Des cultures primaires de fibroblastes ont été obtenues chez 11 patients pour l'analyse fonctionnelle. Une altération de la morphologie des mitochondries a été observée chez tous les patients sauf un. Ces anomalies du réseau mitochondrial semblent très utiles pour cheminer vers le diagnostic d'ARSACS qui peut s'avérer complexe dans les situations non exceptionnelles où les résultats moléculaires sont délicats à interpréter (mutations faux-sens). Nous proposons une définition graduelle d'ARSACS reposant sur des critères cliniques, génétiques et cellulaires intégrant ces anomalies du réseau. Enfin, nous avons débuté l'exploration des mécanismes impliqués dans cette altération de la dynamique du réseau mitochondrial. Nos résultats préliminaires font évoquer une action potentielle de la saccine au niveau du renouvellement des mitochondries.

ARSACS is a recessive autosomal neurodegenerative condition characterized by cerebellar ataxia, spastic paraplegia and demyelinating sensitivo-motor polyneuropathy. ARSACS is caused by mutations in the *SACS* gene identified in 2000. Since then, cases have been reported worldwide. *SACS* encodes saccin, a protein of still unknown function in spite of the description of numerous protein domains and of a recent focus on a potential implication in the regulation of mitochondrial physiology. Aims of this thesis were to identify new mutations in a large population of ataxic patients and then to functionally analyze their cellular effects in the mitochondrial compartment. We identified 2 variants in *SACS* in 10% of analyzed cases collected through the international SPATAX network. We also confirmed mutations in *SACS* in 5 patients identified using next-generation sequencing in the ATAXIC project, and studied a last case harbouring a large deletion encompassing the entire *SACS* gene identified by pangenomic CGH-array. For functional analyses, primary cultures of fibroblasts were obtained in 11 patients. A drastic and recurrent alteration of the mitochondrial network was observed in all patients except one. These anomalies seem very useful for the diagnosis of ARSACS when molecular results are difficult to interpret (missense variants). We therefore propose a grading diagnostic definition using clinical, genetic and cellular criteria for ARSACS. Finally, we started to study the mechanistic of the mitochondrial function of saccin. Our preliminary data may suggest a potential role at the mitochondrial turn over level.



## Remerciements

Trois ans, cela fait beaucoup de monde à remercier, le plus dur sera de ne pas en oublier. Dès lors je m'excuse si dans l'émotion de cette rédaction j'omets des noms, mais vous savez bien mes sentiments à votre égard puisque je n'ai pas manqué de vous le dire.

En premier lieu, je voudrais remercier mes premiers instructeurs. Isabelle, Elise et Michelle. Nous parlons souvent dans la vie des premiers pas, des premiers mots. Vous m'avez appris mes premières PCR, mes premières séquences. Qui aurait su dire ce juin 2009, que cette initiation à la recherche m'aurait tant été utile aujourd'hui. Et même si maintenant de nombreuses PCR-séquence sont passées par là (et mon dieu ce qu'il y en a eu), ces premières seront gravées.

Par voie de fait, je remercie Benoit Arveiler, qui à l'époque a accepté une petite licenciée fraîchement débarquée du grand Nord, à venir encombrer le petit bureau du fond du couloir du 4<sup>ème</sup>. Deux mois ce fut court mais suffisant pour me donner la confirmation que le travail effectué au sein du laboratoire (EA 4137 à l'époque) était ce que je voulais faire en étant plus grande ;).

Qui dit séquence, dit séquenceur et qui dit séquenceur prononce le nom du Roi de la séquence, Christophe Hubert. Merci à toi et ton équipe (Fanny, Isis et Sabrina) pour votre courage face aux nombres incommensurables de plaque 96 puits. Nous n'oublierons jamais les séries de 4 à 6 plaques/2jours. Merci de ne pas m'avoir tiré les oreilles trop souvent quand j'oubliais d'envoyer le plan de plaque AVANT les plaques. Et surtout merci d'être toi.

Une expression me vient à l'esprit : « L'herbe est plus verte chez le voisin ». Pas faux, mais ne dit-on pas non plus « on n'est pas mieux que chez soi ». J'approuve. Le MRGM a été mon second chez moi durant ces trois ans. ET pas parce que je dormais sur place :p. Chacun des membres qui ont été là, et ceux qui y sont toujours, m'ont apporté quelque chose et je tiens à les en remercier :

Elise, après les séquences tu as eu la patience de m'apprendre tes techniques de culture, WB, ICC... tout en gardant ta bonne humeur légendaire et du bon son dans le bureau.

Isabelle, l'âme de ce laboratoire. L'intendante sans qui notre petit écosystème ne tournerait pas. Tu es sur tous les feux et tu as été là pour moi. Depuis le début je te décris comme mon sous-chef et tu le resteras. Un grand merci pour ton soutien et tel une maman oiseau me donner la confiance en moi pour prendre mon autonomie au cours de ce projet. Désolée pour les fautes d'orthographe ou de grammaire dont tu me corrigeais tout le temps mais là il était difficile de te faire corriger ces quelques lignes (que dit-je, ces quelques pages). On garde le contact quoi qu'il arrive, nous ne sommes pas à l'abri d'un retour en force au MRGM d'ici quelques années :p.

Rodrigue, le roi de la mito, tu as su prendre de ton temps (si rarement libre) pour m'expliquer le B.A.B.A de la mitochondrie si importante aujourd'hui dans les projets. Merci pour les discussions spontanées entre deux portes qui ont permis d'avancer.

Nadège, ah Nadège. Toujours là pour mettre un peu de rythme à ces longues fin de journée au labo G. Tu as su me réconcilier avec l'oxygraphe *via* ta maîtrise experte. Et tu as toujours été READY pour mes soirées Cosmo ! Merci d'être ce rayon de la Martinique chaud à nos cœurs.

Maître Giovanni. La force me donner tu as su, ta récompense le chocolat a été. Jeune padawane est devenue Jedi, est tu y es pour beaucoup. Tu as été un modèle pour moi. Je ne te remercierai jamais assez pour tous le temps et les conseils avisés que tu m'as donné.

Christelle, au cours de ces 3 ans j'ai enfin réussi à découvrir le diamant pure que tu caches sous ton bouclier de femme réservée. Et c'est avec délice que j'ai appris à te connaître. Merci à toi de m'avoir soutenue pendant cette période difficile, j'ai apprécié ton implication pour la finalisation de mon travail et tes conseils judicieux. Gros câlinS virtuels ;)

Caroline, Dorothee, Julie B, merci de votre patience et votre disponibilité pour la partie CGH. Caroline je te remercie d'être un splendide modèle de Business Woman. J'espère avoir autant de charisme que toi dans mon avenir proche.  
Sans oublier Marie-Laure, toujours avec un sourire, toujours prête à aider. Merci pour tout.

Harmony et Stephanie, merci à vous deux pour votre implication dans l'amélioration du système laborantin. Vous faites un travail génial et je vous en remercie.

Marie B, je ne regrette pas le lobbying que j'ai mis en œuvre lors de ta candidature au laboratoire. Je ne pense pas que tu le regrette non plus. Excepté peut être lors du « harcèlement humoristique » dont tu sais si bien nous accabler. Mais comme tu le sais on a tous une part de sadomaso en nous et on adore ça !

Sabine, ma petite sabine, ma voisine de bureau qui m'a élit chef du bureau. Je vais regretter nos séances ciné, nos échanges littéraires, j'ai adoré et j'espère que nous continuerons en dehors.

Ma grande sœur Fanny, depuis mon master 2 nous avons partagé tellement de bons instants. De nos confidences dans ton petit cagibi en verre du 4<sup>ème</sup> à nos délires capillaires de Mériadeck, il s'en ai passé des choses. Je te remercie petite fleur pour tout, tu le sais je t'adore et tu restes dans mon cœur 4ever.

Estelle, ma brune du sud. J'adore nos discussions tardives. Tu m'apportes beaucoup dans la vie de tous les jours. Je n'aurais qu'un conseil : HAKUNA MATATA.

Magali alias poupipou. Ton passage fut court mais notre amitié qui en résulte sera éternelle dans mon cœur. Ma blonde, mon amante, ma meilleure amie, ma confidente. Tu as été tout pour moi en l'espace d'un an et tu ne me quitteras plus jamais.

La petite Julie, il me faudrait des pages pour te remercier à la hauteur de ce que tu m'as apporté. Tant sur le plan professionnel que personnel. Je n'oublierai pas ta positive attitude,

avec ton entrain à toujours vouloir aller au fond des choses mais aussi et surtout ton cri de souris « hiiiiiiiiiiiiiiii ». Il va me manquer celui là quand je passerai du côté obscur de la force. Ne change pas ma nordiste temporaire, ne doute pas de toi tu es l'une des personnes les plus intelligente que j'ai rencontré en ce monde. The best.

Kelly et Emeline. Mes chouchoutes de cette dernière année. Un grand MERCI à vous deux pour les personnes que vous êtes et pour m'avoir fait découvrir celle que je suis devenue après ces trois ans. Kelly avec tes câlins, ton entrain et ta détermination mais aussi ton sens de la fête. Que de bons moments qui je compte bien ne s'arrêterons pas là. Emeline, tu es la personne la plus joviale que j'ai rencontrée et ma mauvaise humeur disparaissait immédiatement au premier regard. Vive les couleurs avec toi et tu m'en as mis plein la tête.

Vous tous m'avez fait grandir, de la petite étudiante timide et discrète je suis devenue cette femme volontaire et entreprenante. Je suis sortie de ma coquille et j'ai déployé mes ailes. Ces années avec vous resteront les meilleures. Je vous remercie tous pour être qui vous êtes, pour m'avoir intégré dans vos cercles et je l'espère dans vos cœurs. Où que j'aille, j'emporte avec moi un peu de chacun de vous. Un grand merci, mes collègues, mes am(i)es, mes amours.

Entre ces premières leçons et la fin de ma thèse, le laboratoire a changé. Tout d'abord de nom, puis de locaux. Mais je suis toujours restée fidèle à une équipe, mon équipe. Je te remercie Cyril de m'avoir pris sous ton aile dès le début. Plus qu'un mentor tu as été un exemple. Je ne suis pas très discours (*a contrario* de ce que peuvent faire penser ces 3 dernières pages), ma meilleure façon de te remercier pour ton rôle dans ma vie est d'une part un gros câlin et d'autre part de ne rien lâcher dans la suite de ma carrière pour que tu sois fière de ta première étudiante en thèse (et je n'espère pas la dernière).

Je finirai ses remerciements par remercier bien évidemment mes amis et ma famille. Bénédicte, Elodie, Nathalie et Marie, merci à vous 4 d'avoir rendu mes premières années sur Bordeaux aussi sublime. Nos délires en cours, nos soirées Disney, je n'aurais pas pu rêver mieux. Elodie ma number two, et Etienne mon papatissier, merci d'être un couple modèle. Nathalie, comme tu l'as si bien dit nous avons passé notre Koh Lanta à nous, et tu sais quoi ? We do IT and WIN. Marie, tu sais tout ce que tu représente pour moi. Je te remercie d'être ma petite tête en l'air, d'être toujours prête à venir manger à la maison quand j'en fais pour dix au lieu de deux, d'être toujours prête sans l'être tout simplement. Merci les filles, vous êtes gavé bien ;). Je vous aime

Sophie, Jean, qui aurait cru il y a des années que j'aurais été jusque là. Moi qui rechigner tant à travailler. Mais vous m'avez démontré que lorsque l'on fait quelque chose qu'on aime, on travaille avec plaisir. Vous êtes les meilleurs frères et sœurs que l'on puisse rêver d'avoir et je vous aime FORT.

Quentin, je te remercie mon amour de m'avoir supporté pendant ses périodes de doutes où je ne suis franchement pas facile à vivre. Grâce à toi j'ai voulu donner le meilleur de moi-même pour être à ta hauteur (et la barre est haute). J'espère que tu es fière de ta petite femme aujourd'hui, moi je suis très fière de toi. Je t'aime.



# **Table des matières**

<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>13</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS ET DES TABLEAUX .....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>17</b>
<b>CHAPITRE 1 : LES STRUCTURES ANATOMIQUES .....</b>	<b>18</b>
I] LE CERVELET.....	18
A) <i>L'anatomie du cervelet .....</i>	18
B) <i>L'histologie du cervelet .....</i>	19
C) <i>Les mécanismes moléculaires .....</i>	22
1. <i>Lors du développement du cervelet .....</i>	22
2. <i>Les interactions cellulaires .....</i>	23
II] LE FAISCEAU PYRAMIDAL.....	24
<b>CHAPITRE 2 : LES MALADIES DU CERVELET ET/OU DU MOTONEURONE SUPERIEUR .....</b>	<b>27</b>
A) <i>Les ataxies congénitales .....</i>	27
B) <i>Les dégénérescences spinocérébelleuses.....</i>	29
1. <i>Les ataxies cérébelleuses héréditaires ou ACH.....</i>	29
2. <i>Les ataxies spastiques ou AS .....</i>	33
3. <i>Les paraplégies spastiques héréditaires ou PSH .....</i>	33
<b>CHAPITRE 3 : L'ATAXIE SPASTIQUE AUTOSOMIQUE RECESSIVE DE CHARLEVOIX-SAGUENAY (ARSACS) .....</b>	<b>35</b>
A) <i>Historique .....</i>	35
B) <i>Description clinique.....</i>	36
C) <i>Le gène SACS.....</i>	39
D) <i>La saccine.....</i>	42
E) <i>Aspects physiopathologiques.....</i>	44
<b>CHAPITRE 4 : LA MITOCHONDRIE .....</b>	<b>46</b>
A) <i>Description.....</i>	47
B) <i>La balance mitochondriale.....</i>	49
C) <i>Fonctions.....</i>	52

D) Le système de dégradation.....	54
1. L'autophagie.....	54
2. La mitophagie.....	55
<b>PROBLEMATIQUE DE LA THESE.....</b>	<b>57</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>58</b>
I] PATIENTS .....	59
1. SPATAX .....	59
2. ATAXIC .....	59
3. PATIENTE JAM-001.....	59
II] ETUDE DE L'ADN ET DE L'ARN.....	60
A) Analyse de l'ADN.....	60
1. Extraction d'ADN .....	60
2. Amorces de PCR .....	60
3. Amplification et séquençage de l'ADN.....	60
4. Analyse des marqueurs microsatellites .....	61
5. Puce d'hybridation génomique comparative ou CGH-array.....	62
B) Extraction et transcription inverse de l'ARN.....	63
C) Analyse par interférence de la traduction .....	64
1. Petits ARN en épingle à cheveux (Sh-RNA) .....	64
2. Amplification et extraction du plasmide.....	65
3. Transfection des cellules .....	66
4. Mise au point de l'efficacité des sh-RNA.....	66
III] CULTURE CELLULAIRE .....	67
A) Cultures primaires.....	67
1. Biopsies de peau.....	67
2. Mise en culture.....	68
B) Cultures de fibroblastes et de cellules HeLa .....	69
1. Conditions de culture cellulaire .....	69
2. Congélation et décongélation .....	69
3. Entretien des cellules .....	69

IV] ETUDE DES PROTEINES .....	70
A) <i>Profils protéiques</i> .....	70
1. Extraction protéique.....	70
2. Western blot.....	70
3. Fractionnement Subcellulaire .....	71
B) <i>Immunofluorescence</i> .....	72
V] ETUDE DES MITOCHONDRIES .....	73
A) <i>Morphologie mitochondriale</i> .....	73
1. MitoTracker®.....	73
2. TMRM .....	73
B) <i>Analyse de l'ADN mitochondrial</i> .....	73
C) <i>Respiration mitochondriale</i> .....	74
VI] ANALYSES STATISTIQUES.....	74
<b>RESULTATS .....</b>	<b>75</b>
<b>PARTIE I : IDENTIFICATION DE NOUVELLES MUTATIONS DANS LE GENE SACS.....</b>	<b>76</b>
<b>PARTIE II : LE COMPARTIMENT MITOCHONDRIAL : SIEGE D'UNE FONCTION PRIMAIRE DE LA SACSINE ? .....</b>	<b>90</b>
<b>DISCUSSION -.....</b>	<b>111</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>111</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>124</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>136</b>

## Abréviations

<b>ACC</b>	Ataxie Cérébelleuse Congénitale
<b>ACH</b>	Ataxie Cérébelleuse Hériditaire
<b>AS</b>	Ataxie Spastique
<b>ACAD</b>	Ataxie Cérébelleuse Hériditaire autosomique dominante
<b>ACAR</b>	Ataxie Cérébelleuse Hériditaire autosomique récessive
<b>ADOA</b>	Autosomic Dominant Optic Atrophy
<b>ATP / GTP</b>	Adénosine / Guanosine TriPhosphate
<b>ADNmt</b>	Acide DésoxyriboNucléique mitochondrial
<b>ADNn</b>	ADN nucléaire
<b>CMT</b>	Charcot Marie-Tooth
<b>CMT2A</b>	Charcot-Marie-Tooth de type 2A
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DPBS</b>	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
<b>HEPN</b>	Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding
<b>HSP70 / 90</b>	Heat Shock protein 70 / 90
<b>IRM</b>	Imagerie à Résonance Magnétique
<b>JS</b>	Joubert Syndrome
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>PSH</b>	Paraplégie Spastique Hériditaire
<b>PD</b>	Parkinson Disease
<b>pb</b>	paire de base
<b>PE</b>	PhosphoEthanolamine
<b>rpm</b>	rotation par minute
<b>SCA</b>	SpinoCerebellar Ataxia
<b>SRR</b>	Sacsin Repeating Region
<b>TOM</b>	Translocase Outer Membrane
<b>TIM</b>	Translocase Inner Membrane
<b>UbL</b>	Ubiquitin-Like
<b>VDAC</b>	Voltage-Dependent Anion Channel
<b>VUS</b>	Variant of Uncertain clinical Significance
<b>XPCB</b>	Xeroderma Pigmentosum complementation group C Binding

## Table des illustrations et des tableaux

Figure 1 : Anatomie externe et interne du cervelet.....	19
Figure 2 : Synapse du système nerveux central de type axo-somatique.....	20
Figure 3 : Histologie cellulaire des trois couches constituantes du cervelet.....	21
Figure 4 : Formation du cerveau chez l'humain au cours de l'embryogénèse .....	22
Figure 5 : Représentation de l'homuncule moteur.....	25
Figure 6 : Faisceau corticospinal .....	26
Figure 7 : Organigramme regroupant les pathologies impliquant le cervelet.....	27
Figure 8 : IRM d'un patient atteint du syndrome de Joubert .....	28
Figure 9 : Origine des populations habitant dans la région Saguenay et la région Charlevoix au Québec, Canada.....	35
Figure 10 : IRM cérébrale chez un patient ARSACS.....	37
Figure 11 : Fond d'œil gauche chez un patient ARSACS .....	38
Figure 12 : Représentation schématique du gène SACS .....	39
Figure 13 : Représentation schématique des domaines protéiques de la saccine.....	43
Figure 14 : Schéma représentant l'ADN mitochondrial et les régions codant pour les sous- unités protéiques nécessaires à l'assemblage de la chaîne respiratoire .....	48
Figure 15 : Organisation interne d'une mitochondrie .....	48
Figure 16 : Mécanismes d'import des protéines dans l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale .....	49
Figure 17 : Trois états du réseau mitochondrial en fonction de la balance entre la fusion et la fission.....	50
Figure 18 : Partenaires protéiques essentiels à la dynamique du réseau mitochondrial.....	51
Figure 19 : Représentation de la chaîne respiratoire insérée dans la membrane interne mitochondriale .....	52
Figure 20 : Circuit du calcium dans la terminaison synaptique à la suite d'une dépolarisation .....	53
Figure 21 : Différentes étapes de la formation de la vésicule lysosomale de l'autophagie ....	54
Figure 22 : Action combinée de pink1 et parkine pour l'initiation de la mitophagie .....	55
Figure 23 : Recrutement de la mitochondrie à l'autophagosome .....	56

Figure 24: Schématisation du principe de CGH-array pour l'analyse des variations de dosage génique .....	62
Figure 25: Répartition des amorces pour l'amplification de l'ARNm de SACS.....	63
Figure 26: Schéma du plasmide pLKO.1 intégrant la séquence d'un sh-RNA.....	65
Figure 27: Centrifugation différentielle de fractionnement subcellulaire.....	71
Figure 28: Arbres généalogiques et électrophorégrammes des familles de .....	79
Figure 29: Analyse par CGH-array sur puce à façon du patient ANG-120054380-003 porteur d'une seule mutation tronquante hétérozygote.....	86
Figure 30: Arbres généalogiques et électrophorégrammes des patients ATAXIC.....	88
Figure 31: Analyse par CGH-array sur puce à façon de la patiente JAM-001 .....	89
Figure 32: Etude du réseau mitochondrial marqué par la sonde MitoTracker® .....	93
Figure 33 : Quantification de la masse globale du réseau mitochondrial .....	94
Figure 34: Quantification de l'ADN mitochondrial par PCR quantitative .....	95
Figure 35: Quantification du facteur de transcription mTFA.....	96
Figure 36: Analyse de la respiration mitochondriale chez 5 patients.....	97
Figure 37: Quantification du TMRM chez le patient AAR-437-014.....	98
Figure 38: Western Blot de la sacsine avec les trois anticorps commerciaux .....	100
Figure 39 : Localisation intracellulaire de la sacsine dans les fibroblastes de patients.....	101
Figure 40: Inhibition de l'expression du gène SACS <i>via</i> l'utilisation de 5 sh-RNA par PCR quantitative.....	103
Figure 41: Quantification par immunofluorescence de la sacsine dans les fibroblastes témoins transfectés avec le vecteur vide ou un sh-RNA.....	104
Figure 42: Analyse par immunofluorescence de la localisation subcellulaire de DRP1.....	106
Figure 43: Fractionnement subcellulaire sur les fibroblastes des patients .....	107
Figure 44: Analyse en Western Blot de DRP1 .....	108
Figure 45: Quantification relative de p62 localisée ou non à la mitochondrie.....	109
Figure 46: Quantification par Western Blot de la protéine LC3 chez 3 patients .....	110
Figure 47 : Schématisation du diagnostic selon les critères proposés de notre définition graduelle du diagnostic d'ARSACS .....	123

Tableau 1 : Les différentes formes d'ACAD, classification moléculaire et principaux signes cliniques.....	31
Tableau 2 : Principales caractéristiques cliniques, biologiques, neurophysiologiques et moléculaires des ataxies cérébelleuses autosomiques récessives .....	33
Tableau 3 : Récapitulatif des mutations du gène <i>SACS</i> déjà publiées .....	40
Tableau 4: Réactifs et protocole pour réaliser une PCR à partir d'ADN génomique .....	60
Tableau 5: Réactifs et protocole pour réaliser une réaction de séquence .....	61
Tableau 6: Réactifs et protocole pour la réalisation de la transcription inverse de l'ARN .....	63
Tableau 7 : Taille attendue pour les amorces utilisées dans le cadre de l'amplification de l'ARNm.....	64
Tableau 8: Séquences des amorces de PCR quantitative dessinées sur la séquence nucléotidique du gène <i>SACS</i> .....	65
Tableau 9: Efficacités d'inhibition des différents sh-RNA dirigés contre la sarsine .....	67
Tableau 10 : Récapitulatif des individus pour lesquels une biopsie de peau pour une culture de fibroblastes a été réalisée .....	68
Tableau 11: Conditions retenues pour les expériences de Western blot et d'immunocytochimie.....	72
Tableau 12: Récapitulatif des variants tronquants à l'état homozygote (hm) ou hétérozygote composite (hc).....	81
Tableau 13: Récapitulatif des variants tronquants à l'état hétérozygote composite (hc) et hétérozygote (ht).....	81
Tableau 14: Récapitulatif des variants faux-sens homozygotes et hétérozygotes.....	83
Tableau 15: Récapitulatif des nouveaux polymorphismes identifiés dans <i>SACS</i> .....	85
Tableau 16: Analyse des marqueurs microsatellites proches ou dans le gène <i>SACS</i> chez 3 patients présentant le même variant homozygote.....	87
Tableau 17: Récapitulatif des variants identifiés en NGS chez les 5 patients issus du projet ATAXIC et confirmés par la méthode Sanger .....	87
Tableau 18: Biopsies de peau obtenues de 12 individus .....	91
Tableau 19: Tableau récapitulatif des patients inclus dans l'étude fonctionnelle .....	116
Tableau 20 : Proposition de grade pour diagnostiquer un ARSACS.....	122

# Introduction

# Chapitre 1 : Les structures anatomiques

## *1] Le cervelet*

Le cervelet joue un rôle majeur dans l'intégration des fonctions motrices. Les dommages d'une ou plusieurs parties du cervelet conduisent à des déficits tels que la perte de la coordination des muscles ou la diminution du tonus musculaire. Ces troubles sont les principales caractéristiques des ataxies, et lorsque leurs origines sont liées à une dégradation du cervelet, elles sont appelées ataxies cérébelleuses<sup>1</sup>.

### A) L'anatomie du cervelet

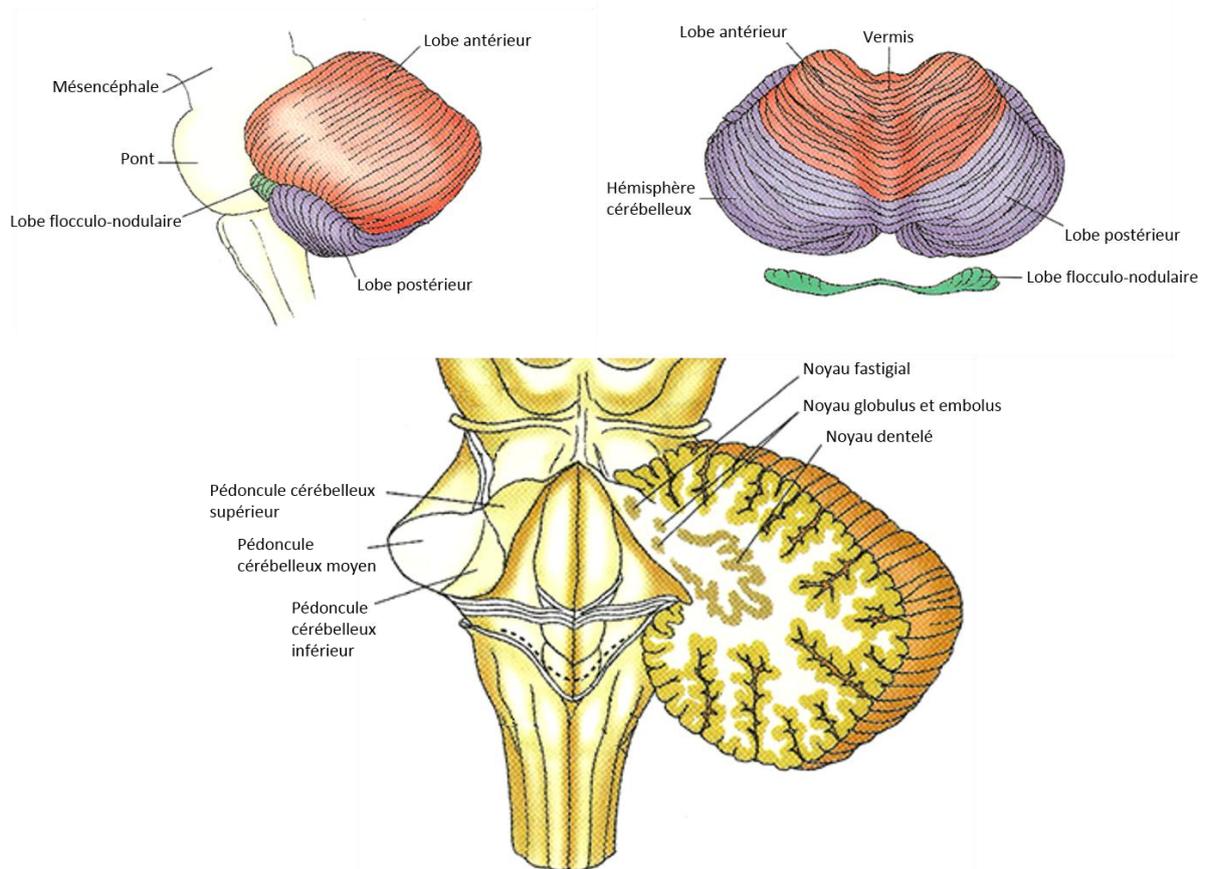
Le cervelet est rattaché par trois paires de pédoncules à la face postérieure du tronc cérébral, partie du système nerveux central et relai entre les structures de l'encéphale et de la moelle épinière. Ces pédoncules cérébelleux (inférieur, moyen et supérieur) sont le point de départ des différentes fibres permettant la connexion entre le cervelet et, entre autre, la moelle épinière et le cortex cérébral.

A l'instar du cortex cérébral, le cervelet se divise en deux hémisphères cérébelleux latéraux liés par un lobe médian : le vermis. Chaque hémisphère est subdivisé en trois lobes (antérieur, postérieur et flocculo-nodulaire), qui ont pour fonction la réception des signaux envoyés par les autres compartiments cérébraux (figure 1).

Le tissu interne du cervelet est composé :

- d'une substance grise périphérique constituant l'écorce cérébelleuse
- d'une substance blanche en profondeur
- de noyaux gris centraux de la substance grise.

Chaque noyau (le noyau fastigial, le globulus et l'embolus puis le noyau dentelé), possède des caractéristiques propres liées à l'origine du cervelet au cours de l'évolution (respectivement, l'archéocerebellum, le paléocerebellum et le néocerebellum). Ces noyaux et leurs axones constituent la première voie par laquelle l'information existe dans le cervelet (figure 1).



**Figure 1 : Anatomie externe et interne du cervelet**

(En haut, de gauche à droite), représentation sagittale et dorsale externe du cervelet.

(En bas), représentation dorsale interne du tronc cérébral et du cervelet. Les connexions du cervelet au tronc cérébral sont indiquées par la présence des pédoncules supérieur, moyen et inférieur.

*Modifié à partir d'Essential neuroscience par Allan Siegel et Hreday N'Capru<sup>1</sup>*

## B) L'histologie du cervelet

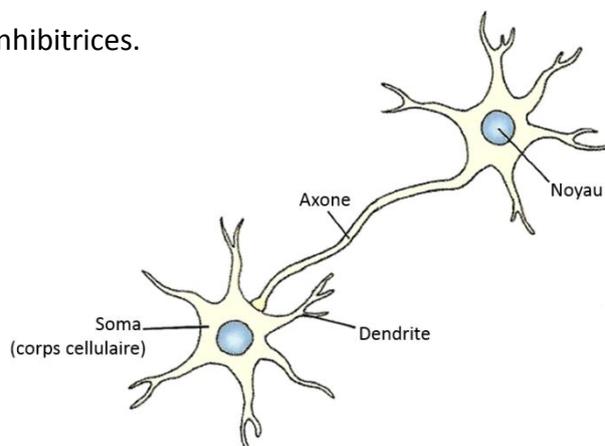
Le cortex cérébelleux, et plus précisément la lame de substance grise, est constitué de trois couches cellulaires : l'inférieure, la médiane et la supérieure (figure 3).

La couche inférieure, dite couche granulaire, est composée principalement de grains du cervelet ou cellules granulaires. Ces grains sont constitués d'un noyau, d'un axone et de plusieurs dendrites organisées « en crampon » afin d'augmenter leur capacité de réception des fibres cérébelleuses. Chaque axone fin et non myélinisé des cellules granulaires remonte

jusqu'à la surface du cortex, au niveau de la couche la plus externe : la couche moléculaire. Chaque axone va se diviser en deux, formant un T parallèle à la surface et devenant ainsi les « fibres parallèles ». Celles-ci permettent l'établissement de contacts synaptiques avec plusieurs dendrites issues des cellules de Purkinje. La couche granulaire contient également un autre type cellulaire, minoritaire : les cellules de Golgi de type II. Ce sont des cellules de type GABAergiques, par conséquent inhibitrices, situées à proximité de la couche des cellules de Purkinje. Des contacts entre les fibres parallèles et les cellules de Golgi ont également été observés.

La couche médiane est composée uniquement des cellules de Purkinje et ceci en quantité importante. Il s'agit des neurones du cervelet. Leurs dendrites forment une arborisation en rameaux ascendants qui se dispersent tout au long de la couche moléculaire. L'axone émerge du bas du corps cellulaire en direction de la couche granulaire et de la substance blanche et se termine dans un des noyaux gris centraux. Les cellules de Purkinje sont des cellules inhibitrices qui utilisent l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur.

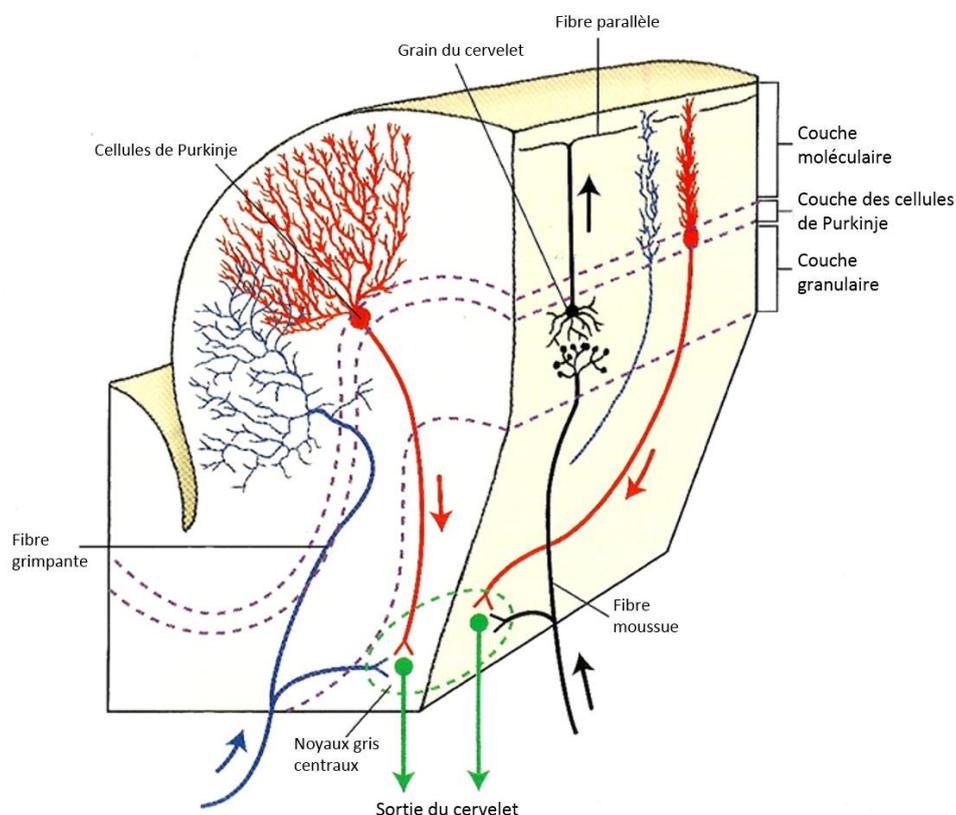
La couche supérieure, dite couche moléculaire ou plexiforme, contient les dendrites des cellules de Purkinje, les fibres parallèles et deux autres types cellulaires référencés comme des cellules « basket ». Ce sont des cellules qui reçoivent les informations des fibres parallèles et créent, avec les cellules de Purkinje, des synapses axo-somatiques (figure 2). Ces synapses se caractérisent par une zone de connexion entre les terminaisons axonales d'une cellule « basket » et le corps cellulaire d'une cellule de Purkinje. Ces synapses sont inhibitrices.



**Figure 2 : Synapse du système nerveux central de type axo-somatique**

*Traduit d'Essential neuroscience par Allan Siegel et Hreday N'Capru<sup>1</sup>*

Le système de communication du cortex cérébelleux passe par deux types de fibres afférentes : les fibres moussues et les fibres grimpantes, qui sont identifiées sur leur base morphologique (figure 3). Les fibres moussues sont les fibres afférentes majoritaires dans le cervelet, elles traversent la couche granulaire et y génèrent plusieurs branches qui finissent par former des rosettes de fibres moussues. Les fibres grimpantes émanent du tronc cérébral et montent à travers la couche granulaire jusqu'à la couche moléculaire où elles formeront des synapses avec les dendrites des cellules de Purkinje. A l'inverse des fibres moussues qui peuvent exciter plusieurs grains du cervelet, les fibres grimpantes vont stimuler une à une les cellules de Purkinje *via* l'aspartate.



**Figure 3 : Histologie cellulaire des trois couches constituantes du cervelet**

Représentation interne du cortex cérébelleux illustrant les différents types de cellules et de fibres le composant.

*Traduit d'Essential neuroscience par Allan Siegel et Hreday N'Capru<sup>1</sup>*

En résumé, le cervelet est un organe régulateur de la fonction motrice, intégrant et traitant les informations qui lui parviennent de la moelle, du tronc cérébral et du cerveau.

## C) Les mécanismes moléculaires

### 1. Lors du développement du cervelet

Il était initialement admis que le cervelet dérivait exclusivement d'une région du tube neural. En réalité, cette région n'est pas uniquement issue du métencéphale mais s'étend à la partie antérieure de l'isthme mésencéphalique et dans la partie caudale du mésencéphale (figure 4).

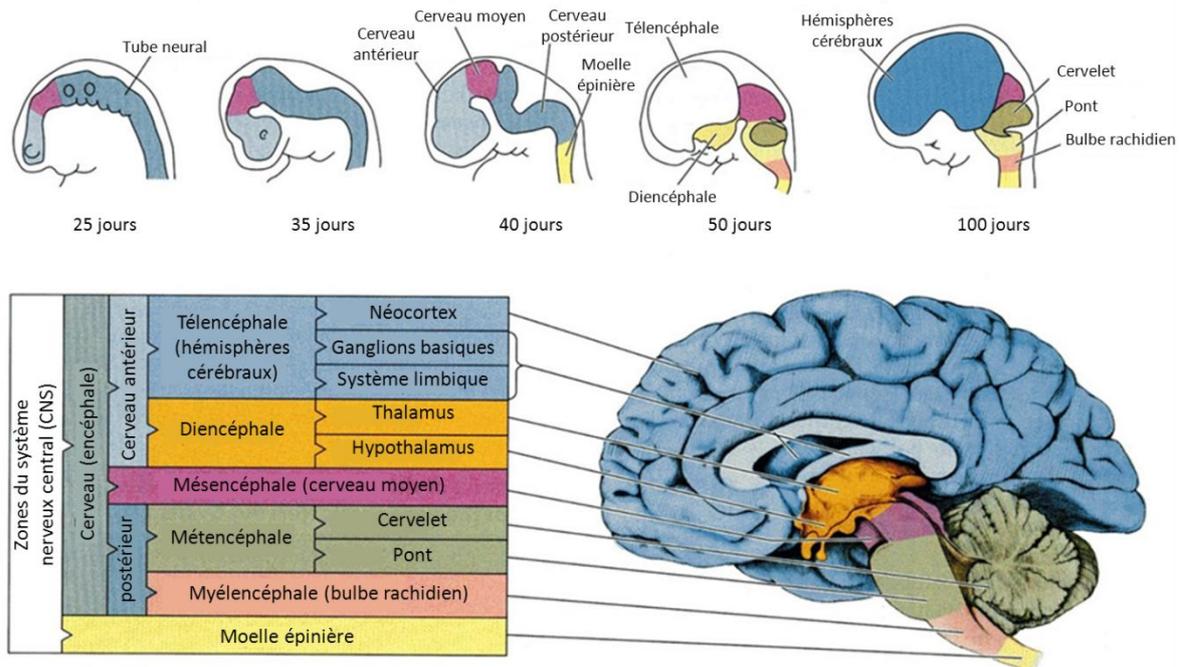


Figure 4 : Formation du cerveau chez l'humain au cours de l'embryogénèse

Traduit d'Essential neuroscience par Allan Siegel et Hreday N'Capru<sup>1</sup>

Cette région de l'isthme est le siège d'expression de nombreux gènes régulateurs. Les plus connus sont les gènes *Wnt1* et *En1* dont l'inactivation a un effet drastique sur le développement du cervelet, puisque celui-ci est alors inexistant<sup>2</sup>. L'inactivation d'autres acteurs comme *FGF8*, *GBX2* et *Islet3* sur des modèles animaux va conduire à de très larges délétions du cervelet<sup>3-5</sup>. Tous ces gènes ne vont pas agir exclusivement sur le développement du cervelet. Par exemple, l'inactivation de *Pax2* conduit à la perte du cervelet mais aussi à l'élimination de la région postérieure du mésencéphale.

## 2. Les interactions cellulaires

Le cervelet est une structure hautement ordonnée avec un système de régulation des interactions entre les cellules de Purkinje et les cellules de la couche granulaire. Ce mécanisme n'est pas complètement décrypté, cependant il apparaît que le nombre de cellules de Purkinje détermine la taille de la population cellulaire de la couche granulaire. Lorsque le nombre de cellules de Purkinje est diminué, il en est de même pour la taille de la couche granulaire. Cette relation est déterminée par l'utilisation de deux voies cellulaires, l'activité mitotique et la mort cellulaire.

L'utilisation de souris transgéniques avait permis de démontrer que les cellules de Purkinje ont la possibilité de contrôler l'activité mitotique des grains du cervelet avec la partie externe de la couche granulaire<sup>6</sup>. D'autres études ont mis en évidence la présence d'un mécanisme rétroactif utilisant au moins deux acteurs : le ligand Sonic hedgehog (Shh) et le récepteur Patched 1 (ptch 1). Le ligand Shh est une glycoprotéine, sécrétée par les neurones de Purkinje, qui se lie à son récepteur membranaire Ptch1, localisé au niveau des cellules granulaires. Cette voie Shh/Ptch 1 permet l'activation des facteurs de transcription qui influencent la transcription de gènes spécifiques dont *Patch 1*. La couche granulaire communique de cette façon avec les cellules de Purkinje sur la taille de sa population cellulaire proliférative<sup>7,8</sup>. La production cellulaire de la couche granulaire est également sous le contrôle d'autres molécules telles que Pax6, qui lors d'une mutation perte de fonction induit l'hypertrophie de la couche externe granulaire, ou encore RU49 qui est impliquée dans la régulation du nombre de cellules<sup>9,10</sup>.

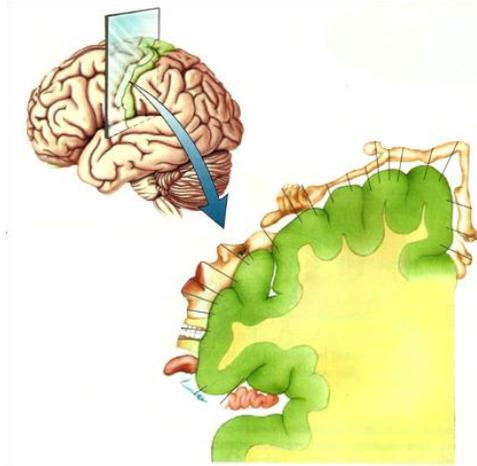
D'autre part, les facteurs de croissance (BDNF et IGF I) ont été démontrés comme modulateurs de la mort cellulaire de la population contenue dans la couche granulaire<sup>11,12</sup>. Outre cette modulation par les facteurs de croissance, une implication du calcium a également été mise en évidence. Le calcium aurait une action sur l'activité dépolarisante des récepteurs aux acides aminés provoquant la mort cellulaire des grains du cervelet<sup>13,14</sup>.

## *II] Le faisceau pyramidal*

Le faisceau pyramidal joue un rôle préférentiel dans le contrôle de la motricité volontaire. Une atteinte à ce niveau provoque typiquement une spasticité, c'est-à-dire une atteinte musculaire ainsi qu'une faiblesse progressive des membres inférieurs entraînant des difficultés de la marche. Ces anomalies caractérisent le syndrome pyramidal.

Aussi appelé faisceau cortico-spinal, il correspond à un ensemble d'axones moteurs cortico-spinaux permettant la communication entre le cortex, qui commande une action motrice, et la moelle épinière, qui réalise le mouvement grâce aux motoneurones et inter-neurones (figure 6)<sup>1</sup>.

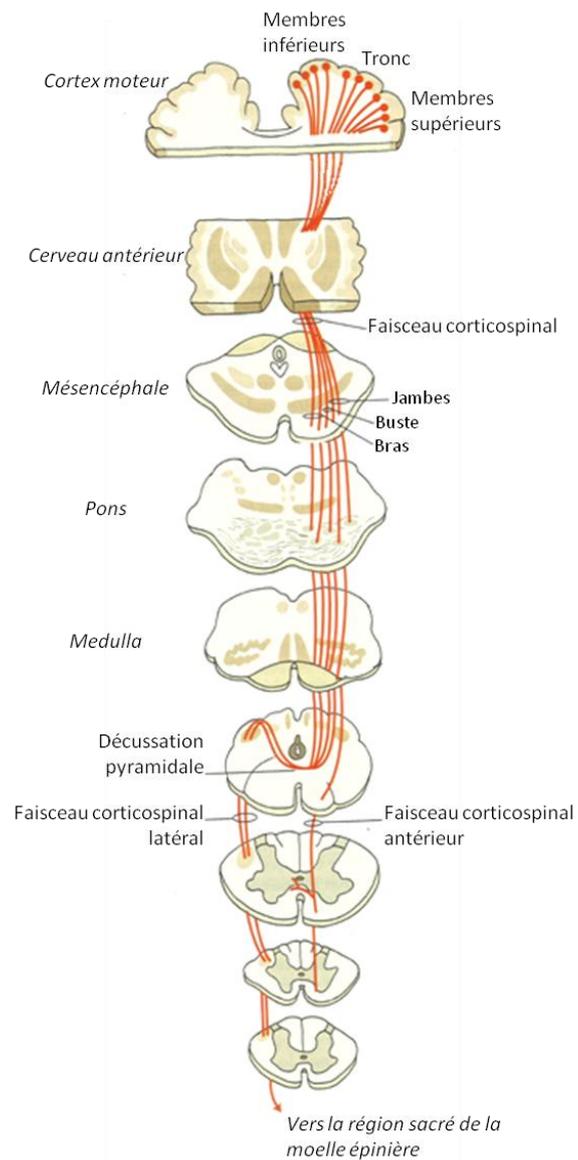
Anatomiquement le faisceau pyramidal est le plus important et long faisceau du système nerveux central humain. Il débute au niveau du cortex moteur et descend jusqu'à la moelle épinière en passant par les pyramides bulbo-médullaires. Au niveau du cortex moteur, le faisceau cortico-spinal a son origine dans trois grandes régions différentes : 30% depuis le cortex moteur primaire, 40% à partir du cortex somato-sensoriel primaire et 30% de l'aire moteur supplémentaire. Ainsi, la stimulation de chacune de ces régions va induire un mouvement spécifique : la stimulation des régions dorsale et médiane du cortex moteur sera associée aux mouvements des membres inférieurs tandis que la stimulation latérale du cortex moteur va produire ceux des membres supérieurs (figure 6). Cette répartition somatotopique du cortex moteur est appelé homuncule moteur (figure 5). Une organisation similaire existe pour le cortex somato-sensoriel.



**Figure 5 : Représentation de l'homuncule moteur**

*Traduit d'Essential neuroscience par Allan Siegel et Hreday N'Capru<sup>1</sup>*

D'un point de vue histologique, le faisceau est composé par environ un million de fibres dont 90% sont myélinisées. Le faisceau pyramidal prend naissance dans la couche V du cortex moteur qui contient les neurones dits pyramidaux dont les cellules de Betz. De cette couche V du cortex moteur partent les fibres descendantes en direction du thalamus, du tronc cérébral et de la moelle épinière. Pendant la descente jusqu'à la moelle épinière, au niveau de la décussation pyramidale (point d'intersection dans la région inférieure du bulbe rachidien), les axones de ces cellules pyramidales se scindent en deux faisceaux : le faisceau cortico-spinal latéral et le faisceau cortico-spinal antérieur. Quarante-vingt-dix pourcent des axones formant le faisceau latéral descendent par le côté dorso-latéral opposé de la moelle jusqu'aux motoneurones innervant les fibres musculaires pour les mouvements fins (extrémités des membres). Tandis que les 10% constituant le faisceau antérieur rejoignent directement les motoneurones médullaires (permettant de réguler la posture) en passant par la colonne ventro-médiane de la moelle.

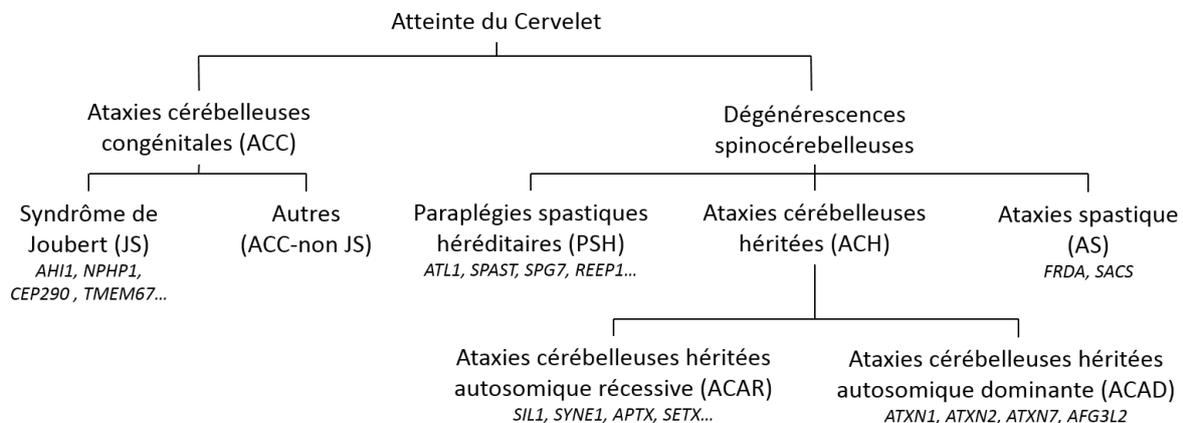


**Figure 6 : Faisceau corticospinal**

*Traduit d'Essential neuroscience par Allan Siegel et Hreday N'Capru<sup>1</sup>*

## Chapitre 2 : Les maladies du cervelet et/ou du motoneurone supérieur

Un syndrome cérébelleux est un ensemble de signes et de symptômes caractéristiques d'une atteinte plus ou moins grave du cervelet. L'hypotonie et l'ataxie cérébelleuse en sont les signes cardinaux. L'hypotonie est associée à des dommages du cortex cérébelleux et se manifeste par une diminution du tonus musculaire. L'ataxie cérébelleuse implique le vermis et/ou les hémisphères cérébelleux et reflète une interruption du signal entre le cortex cérébelleux et le cortex cérébral. L'ataxie statique (atteinte du vermis) se manifeste par une perturbation de la marche et du maintien de l'équilibre alors que l'ataxie cinétique (atteinte des hémisphères) se caractérise par des troubles de la coordination des membres et une dysmétrie. On distingue schématiquement deux groupes d'ataxie héréditaires : les ataxies cérébelleuses congénitales considérées comme des maladies développementales et les ataxies progressives à début plus tardif considérées comme des maladies neurodégénératives (figure 7).



**Figure 7 : Organigramme regroupant les pathologies impliquant le cervelet**

### A) Les ataxies cérébelleuses congénitales

Les ataxies cérébelleuses congénitales (ACC) sont un groupe hétérogène de maladies rares caractérisées par une atteinte malformative ou fonctionnelle précoce du cervelet. Elles sont diagnostiquées très tôt, dès la petite enfance.

Les ACC héréditaires peuvent être séparées en 2 groupes : le syndrome de Joubert (JS) et les ACC-non JS. Du point de vue clinique, la suspicion d'ACC héréditaires peut être posée dans les premiers mois de vie suite à l'observation d'une hypotonie, de mouvements oculaires anormaux et occasionnellement de troubles cardio-respiratoires (apnées et/ou tachycardie épisodique). Puis une déficience intellectuelle peut être observée avec une sévérité variable. La différenciation des groupes est fonction de la présence ou non du signe de la "dent molaire" observé à l'IRM (figure 8). Ce signe clinique est une caractéristique spécifique du syndrome de Joubert et correspond à l'hypoplasie du vermis cérébelleux et des malformations du mésencéphale et du rhombencéphale.



**Figure 8 : IRM d'un patient atteint du syndrome de Joubert**

La zone encadrée est le signe de la dent molaire

*Issu du centre de référence « Malformations et maladies congénitales du cervelet »*

Ces deux groupes de pathologies sont génétiquement différents puisque 24 gènes, majoritairement de transmission autosomique récessive, sont responsables du JS<sup>15</sup>. En ce qui concerne les ACC-non JS, il existe également une très grande hétérogénéité génétique avec l'identification de plus de 20 gènes responsables, avec tous les modes de transmission (autosomique récessif (AR) ou dominant (AD), et lié à l'X (LX)).

Sur le plan physiopathologique, l'identification de ces gènes a révélé une grande diversité des voies de signalisation impliquées dans la survenue des ataxies. Les gènes impliqués dans le JS sont essentiellement impliqués dans le développement ciliaire faisant de ces pathologies un bel exemple de ciliopathies<sup>15</sup>. Les gènes connus d'ACC sont impliqués dans le métabolisme des ARNs (*TSEN54*, *EXOSC3*)<sup>16,17</sup>, le fonctionnement des canaux ioniques (*CACNA1A*)<sup>18</sup>, ou encore le contrôle de la migration neuronale (*VLDLR*)<sup>19</sup>. Contrairement aux

groupes des ataxies neurodégénératives qui vont évoluer dans le temps, l'observation d'une stabilisation de l'ataxie au cours de la croissance et jusqu'à l'âge adulte<sup>15,20</sup> est notable.

## B) Les dégénérescences spinocérébelleuses

Les dégénérescences spinocérébelleuses constituent un groupe de maladies neurodégénératives héréditaires conduisant à un handicap moteur progressif. Elles se caractérisent principalement par une atteinte du cervelet et/ou une atteinte de la voie pyramidale (support de la motricité volontaire). L'âge de début, la sévérité et la rapidité d'évolution sont extrêmement variables d'une entité à l'autre et d'un individu à l'autre. Trois principaux sous-groupes peuvent être distingués : les ataxies cérébelleuses héréditaires (ACH), les ataxies spastiques et les paraplégies spastiques héréditaires (PSH).

### 1. Les ataxies cérébelleuses héréditaires ou ACH

Les ataxies cérébelleuses héréditaires (ACH) désignent un large spectre de maladies neurologiques avec une ataxie cérébelleuse comme principal symptôme. Les ACH sont des affections neurodégénératives d'évolution progressive, souvent lente, et aboutissant à un handicap lourd. Elles résultent du dysfonctionnement et/ou de la dégénérescence de structures impliquées dans la coordination des mouvements dont le cortex cérébelleux, les noyaux profonds du cervelet et le tronc cérébral. La première a été décrite en 1863, par Nikolaus Friedreich, de transmission AR, c'est l'ataxie de Friedreich<sup>21</sup>.

Une classification basée sur des critères cliniques, génétiques et physiopathologiques est utilisée afin de distinguer les différentes entités.

Les ataxies spinocérébelleuses (SCAs) sont les formes AD (ACAD) de début tardif, en moyenne vers la trentaine, associant en plus de l'ataxie, une neuropathie périphérique, des troubles cognitifs, des signes pyramidaux et extra-pyramidaux (tableau 1).

Maladie	Chromosome	Gène ou locus	Nature des mutations	Localisation des mutations	Signes cliniques principaux
<b>GENES CONNUS</b>					
<b>EXPANSIONS CAG/POLYGLUTAMINE CODANTES</b>					
SCA1	6p23	<i>ATXN1</i>	expansion CAG	5'codant	Atteinte multisystémique, spasticité

Maladie	Chromosome	Gène ou locus	Nature des mutations	Localisation des mutations	Signes cliniques principaux
SCA2	12q24	<i>ATXN2</i>	expansion CAG	5'codant	Atteinte multisystémique : saccades lentes, PNP, tremblement de repos, myoclonus, démence
SCA3	<u>14q24.3-q31</u>	<i>MJD1</i>	expansion CAG	3'codant	Atteinte multisystémique : diplopie nystagmus, PNP, signes pyramidaux, parkinsonisme, dystonie, rigidité
SCA6	19p13	<i>CACNA1A</i>	expansion CAG	3'codant	Relativement pure
SCA7	<u>3p21.1-p12</u>	<i>ATXN7</i>	expansion CAG	5'codant	Baisse de l'acuité visuelle, signes pyramidaux,
SCA17	6q27	<i>TBP</i>	expansion CAG	5'codant	Atteinte multisystémique, démence, symptômes psychiatriques, spasticité parkinsonisme, dystonie, chorée
DRPLA	12p13.31	<i>ATN1</i>	expansion CAG	codant	Atteinte multisystémique : démence, épilepsie, myoclonus, chorée, dystonie
<b>EXPANSIONS NON CODANTE</b>					
SCA8	13q21	<i>ATXN8OS/ATXN8</i>	Transcription bidirectionnelle (CTG non codant et CAG codant)	Codant et non codant	Pure
SCA10	22q13	<i>E46L</i>	Expansion ATTCT	Intron	Pure +/- épilepsie
SCA12	<u>5q31-q33</u>	<i>PPP2R2B</i>	Expansion CAG	5'UTR	Atteinte multisystémique : tremblement, signes pyramidaux, parkinsonisme, démence
SCA31	<u>16q21</u>	<i>BEAN-TK2</i>	Expansion TGGAA	Intron	Pure, début tardif
<b>MUTATIONS CONVENTIONNELLES</b>					
SCA5	<u>11q13</u>	<i>SPTBN2</i>	Faux sens, délétion en phase	codant	Pure
SCA11	15q15.2	<i>TTBK2</i>	DCL	codant	Pure +/- dysarthrie, troubles de la déglutition
SCA13	<u>19q13.3-q13.4</u>	<i>KCNC3</i>	Faux sens	codant	Retard mental
SCA14	<u>19q13.4</u>	<i>PKCG</i>	Faux sens	codant	Pure +/- myoclonus, tremblement, atteinte cognitive
SCA15/16	<u>3p26-p25</u>	<i>ITPR1</i>	Faux sens, délétion	codant	Pure +/- atteinte cognitive, signes pyramidaux
SCA20	11p13-q11	<i>Large duplication</i>	Duplication	-	Pure +/- dysarthrie, dysphonie spasmodique, tremblement
SCA27	13q34	<i>FGF14</i>	Faux sens, DCL	codant	Début précoce, tremblement d'attitude, dyskinésies, PNP, troubles cognitifs
SCA28	<u>18p11</u>	<i>AFG3L2</i>	Faux sens	codant	Ophtalmoplégie, ptosis, signes pyramidaux
<b>AUTRES LOCI – GENES NON ENCORE IDENTIFIES</b>					
SCA4	<u>16q22.1</u>				Neuropathie sensitive, signes pyramidaux
SCA18	7q22-q32	--	--	--	Neuropathie sensitive et motrice
SCA19/22	1p21-q21	--	--	--	Retard mental

Maladie	Chromosome	Gène ou locus	Nature des mutations	Localisation des mutations	Signes cliniques principaux
SCA21	7p21.3-p15.1	--	--	--	Retard mental
SCA23	20p13-p12.3	--	--	--	Pure +/- dysarthrie, saccades lentes
SCA25	2p21-p13	--	--	--	Neuropathie sensitive
SCA26	19p13.3	--	--	--	Pure
SCA30	4q34.3-q35.1	--	--	--	Pure
SCA34	6q13-16.1	-	-	-	Pure +/- erythrokeratodermie

**Tableau 1 : Les différentes formes d'ACAD, classification moléculaire et principaux signes cliniques**

Les ACH autosomiques récessives (ACAR) débutent à l'âge de 20 ans et sont en général à l'origine d'un handicap majeur avant l'âge de 30 ans. Elles affectent le cervelet et/ou le tractus spinocérébelleux, la colonne postérieure de la moelle épinière et les nerfs périphériques. Au sein même des ACAR, 4 groupes sont distingués en fonction de leurs caractéristiques physiopathologiques : les ataxies dégénératives, les ataxies congénitales, les ataxies métaboliques et les ataxies avec un défaut de réparation de l'ADN (tableau 2).

Maladie	Age de début (moyenne)	Signes cliniques	Anomalies biologiques	Gène	Protéine
<b>Ataxie purement cérébelleuse (ataxie d'origine purement cérébelleuse, éventuellement associée à d'autres symptômes)</b>					
<b>ARCA1</b>	début tardif 32 ans (17-46)	ataxie pure, début tardif, hyperréflexie ostéo-tendineuse	-	<i>SYNE1</i>	SYNE1
<b>ARCA2</b>	4 ans (1-11)	hétérogénéité : retard mental, stroke-like syndrome, épilepsie, neuropathie axonale, hyperréflexie ostéo-tendineuse	lactates parfois élevés, taux de CoQ10 dans le muscle ou les fibroblastes parfois abaissé	<i>ADCK3 (CABC1)</i>	ADCK3
<b>Salih ataxia</b>	petite enfance (avant 7 ans)	épilepsie, retard mental et psychomoteur	-	<i>KIAA0226</i>	rundataxin
<b>MSS</b>	à la naissance	cataracte bilatérale habituellement congénitale, myopathie, retard psychologique et développemental	élévation des CPK dans le sang	<i>SIL1</i>	SIL1
<b>Ataxie spinocérébelleuse avec polyneuropathie sensitive</b>					
<b>FA</b>	16 ans (le plus souvent entre 8 et 25 ans, décrit de 2 à 60 ans)	la plus fréquente, ondes carrées, neuronopathie sensitive, signe de Babinski, atrophie cérébelleuse absente ou discrète	-	<i>FXN</i>	frataxin

<b>SANDO</b>	20-60 ans	hétérogénéité : ophtalmoparésie, neuronopathie sensitive, dysarthrie, ptosis, myoclonies	-	<i>POLG</i>	polymerase gamma
<b>IOSCA</b>	vers 1 an	exclusivement en Finlande	-	<i>Twinkle</i>	twinkle
<b>AVED</b>	17 ans (2- 50)	Friedreich-like, rétinite pigmentaire, parfois tremblement du chef	taux sanguin de vitamine E effondré	<i>alpha-TTP</i>	alpha-TTP
<b>ABL</b>	dès la naissance	vomissements, diarrhées, stéatorrhée néonatale	taux sanguins de cholestérol, triglycérides et vitamines A, D, E, K abaissés, abetalipoprotéïnémie acanthocytose	<i>MTP</i>	MTP
<b>Ataxie cérébelleuse avec neuropathie sensitive-motrice</b>					
<b>AT</b>	vers 2 ou 3 ans, le plus souvent avant 5 ans	télangiectasies, apraxie oculomotrice, prédisposition aux infections et cancers, mouvements choréo- dystoniques	élévation de l'AFP dans le sang, déficit en immunoglobulines, translocations (caryotype)	<i>ATM</i>	ATM
<b>ATLD</b>	entre 1 and 6 ans	-	-	<i>MRE11</i>	MRE11
<b>AOA1</b>	7 ans (1-20)	saccades hypométriques, mouvements choréo- dystoniques, neuropathie axonale sensitivo-motrice sévère	élévation du LDL cholestérol sanguine, hypoalbuminémie, parfois abaissement du CoQ10	<i>APTX</i>	aprataxin
<b>AOA2</b>	15 ans (7-25)	apraxie oculomotrice, strabisme	élévation de l'AFP dans le sang	<i>SETX</i>	senataxin
<b>SCAN1</b>	13-15 ans	neuropathie axonale	parfois légère élévation du LDL cholestérol ou hypoalbuminémie	<i>TDP1</i>	tyrosyl-DNA- phosphodiesteras e
<b>ARSACS</b>	2 ans (jusqu'à 12 ans)	ataxie spastique, hypertrophie des fibres myélinisées (fond d'oeil), neuropathie sensitivo- motrice axonale et démýelinisante	-	<i>SACS</i>	sacsin
<b>PHARC</b>	15 (4-37)	surdité de perception, neuropathie démýelinisante, cataracte, rétinite pigmentaire, signes pyramidaux	-	<i>ABHD12</i>	ABHD12
<b>RD</b>	10-20 ans	rétinite pigmentaire, surdité de perception, neuropathie démýelinisante	acide phytanique élevé dans le sang	<i>PhyH / PEX7</i>	phytanoyl-CoA hydroxylase / PEX7

CTX	enfance	ataxie spastique, démence et/ou retard mental, tendon xanthomes tendineux, diarrhée chronique, cataracte précoce	cholestérol élevé dans le sang	CYP27	sterol 27 hydroxylase
-----	---------	---	-----------------------------------	-------	--------------------------

**Tableau 2 : Principales caractéristiques cliniques, biologiques, neurophysiologiques et moléculaires des ataxies cérébelleuses autosomiques récessives**

## 2. Les ataxies spastiques ou AS

Ce groupe définit les pathologies héréditaires associant une ataxie et une atteinte du faisceau pyramidal sous la forme d'une paraparésie/paraplégie spastique. En clinique, les AS sont rares. Deux gènes sont principalement impliqués dans ces formes. Des mutations du gène *FRDA* sont responsables de la maladie de Friedreich, la plus fréquente des ataxies spastiques et des ACH<sup>22</sup> en France et Europe puisqu'elle est de l'ordre de 1/50000 habitants dans les populations caucasiennes<sup>22</sup>. La pathologie débute en moyenne au cours de l'adolescence. Cliniquement l'ataxie de Friedreich se caractérise par une ataxie cérébelleuse et proprioceptive résultant d'une atteinte cordonale postérieure et d'une neuropathie sensitive. Plusieurs formes cliniques ont toutefois été décrites incluant une forme dominée par la paraplégie spastique.

Le second gène est *SACS*, dont les mutations provoquent une ataxie spastique récessive autosomique de Charlevoix-Saguenay (ARSACS). C'est sur cette pathologie que mon travail de thèse a porté.

## 3. Les paraplégies spastiques héréditaires ou PSH

Les paraplégies spastiques héréditaires (PSH), également nommées maladie de Strümpell-Lorrain, se caractérisent par un syndrome pyramidal des membres inférieurs entraînant une contraction involontaire des muscles, ou spasticité, et une faiblesse progressive. Il existe des formes pures ou complexes.

Les formes pures sont caractérisées par une atteinte isolée des neurones moteurs pyramidaux, aboutissant à la spasticité des membres inférieurs. L'évolution est généralement lente et progressive, avec des variations considérables de l'âge de début et de la sévérité.

Les PSH complexes sont définies par l'association de signes neurologiques supplémentaires dont une ataxie cérébelleuse, une neuropathie périphérique, des anomalies en imagerie (corps calleux fin, hyper-signaux de la substance blanche), une déficience intellectuelle et des troubles cognitifs. Des signes extra-neurologiques comme une cataracte, ou une dégénérescence rétinienne, peuvent aussi être associés.

Les PSH se transmettent selon tous les modes de transmission. Parmi les 52 loci localisés, 31 gènes ont été identifiés<sup>23</sup>.

La prévalence estimée des PSH est faible, autour de 1/100 000 dans la plupart des pays occidentaux et peut atteindre 5/100 000 dans les populations isolées ou consanguines.

Sur le plan physiopathologique, 4 grands mécanismes ont été identifiés :

- les anomalies du transport axonal
- le dysfonctionnement mitochondrial
- les anomalies du métabolisme des lipides
- le développement axonal anormal

# Chapitre 3 : L'ataxie spastique autosomique récessive de Charlevoix-Saguenay (ARSACS)

## A) Historique

L'ataxie spastique autosomique récessive de Charlevoix-Saguenay (ARSACS) est une maladie neurodégénérative progressive et héréditaire. Bouchard *et al.* l'ont décrit pour la première fois en 1978 dans deux régions du Québec au Canada : les régions Charlevoix et Saguenay-Lac Saint Jean<sup>24</sup>. L'origine et la forte prévalence régionale québécoise de cette pathologie s'expliquent par des phénomènes historiques et démographiques. Des études d'épidémiologie génétique menées par l'Institut interuniversitaire de Recherches sur les Populations (IREP) de Montréal (Canada) et par De Braekeleer *et al.*, ont démontré que le peuplement de ces régions a conduit à plusieurs effets fondateurs<sup>25</sup>. Dans la région de Saguenay se sont installés des individus hétérozygotes de l'ouest de la France (principalement de la Normandie) et dans la région de Charlevoix, des individus émigrants de Québec et de la Côte de Beauré (figure 9).

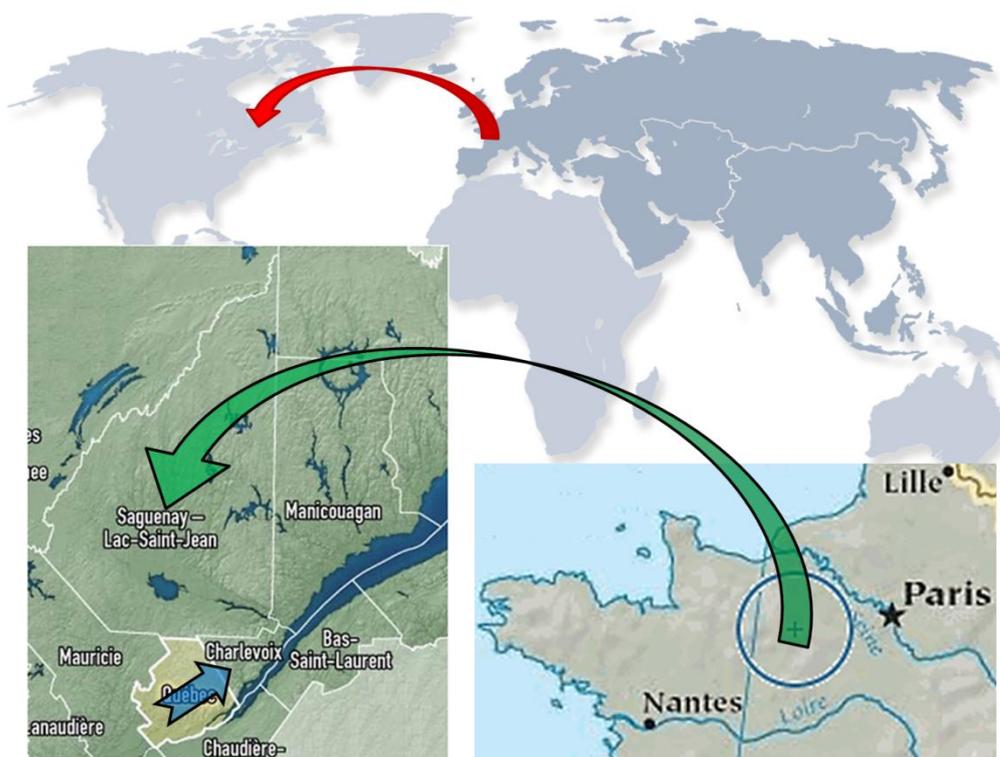


Figure 9 : Origine des populations habitant dans la région Saguenay et la région Charlevoix au Québec, Canada

L'homogénéité de la population a progressivement conduit à une augmentation significative de la fréquence des individus atteints et de ce fait, dans la population Saguenay une incidence d'ARSACS de 1 sur 2000 naissances a été observée ainsi qu'une prévalence de 1/22<sup>26</sup>.

Longtemps considérée comme une maladie régionale, ARSACS fut décrite à partir de 2003 dans d'autres pays du monde<sup>27</sup>. Puis progressivement dans un grand nombre de pays, suggérant que sa prévalence était jusque-là sous-estimée<sup>28</sup>. Aujourd'hui ARSACS est considérée comme la deuxième forme la plus fréquente des ataxies spastiques après l'ataxie de Friedreich<sup>29,30</sup>.

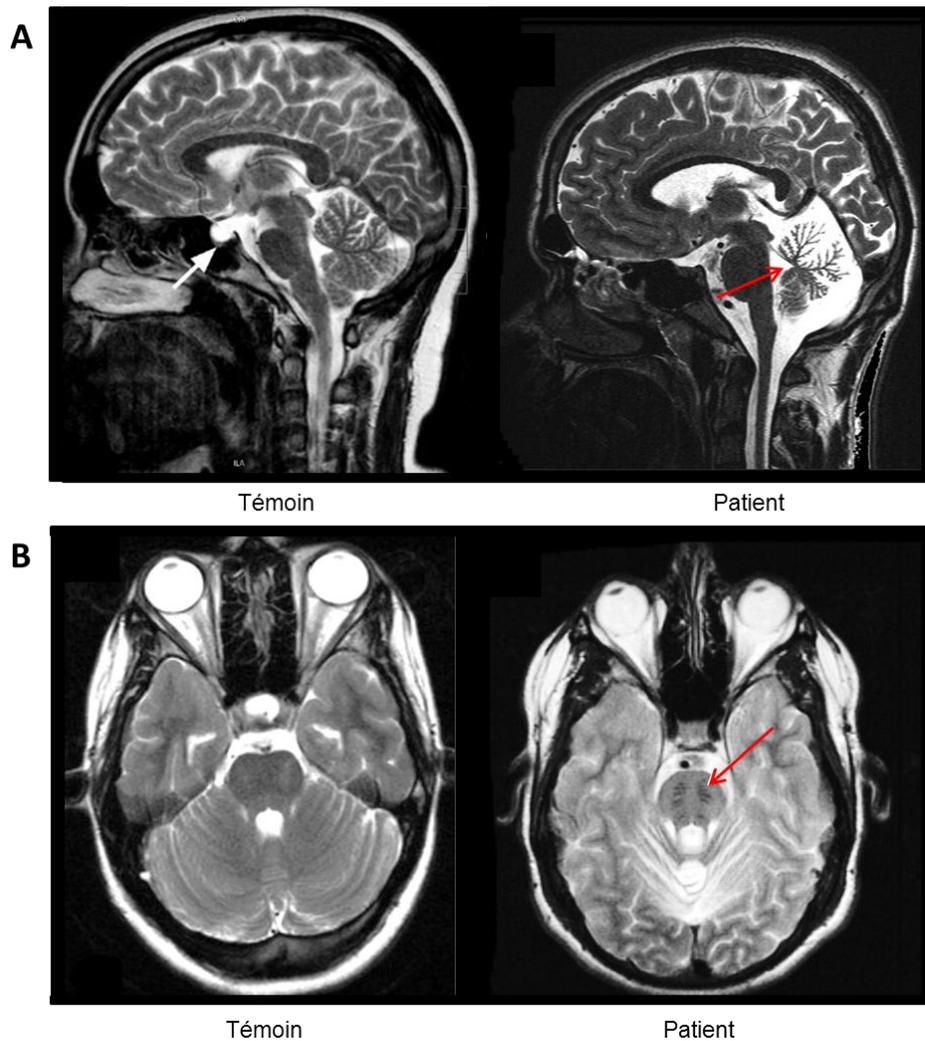
ARSACS appartient à la famille des dégénérescences spinocérébelleuses avec un spectre phénotypique hétérogène. Cependant certaines caractéristiques très évocatrices ont été mises en évidence, dont une ataxie avec atrophie cérébelleuse, une spasticité et une atteinte démyélinisante des nerfs périphériques. L'âge de début de la maladie est habituellement situé dans les premières années de la vie (2-10 ans). Les signes cliniques étant hétérogènes, le diagnostic moléculaire est nécessaire pour diagnostiquer sans ambiguïté les patients.

## B) Description clinique

Bouchard *et al.* ont décrit les premiers patients présentant un phénotype homogène<sup>31</sup>. Une ataxie, une dysarthrie, une spasticité et une atrophie musculaire distale étaient notées. Au niveau ophtalmologique, ils observaient la présence d'un nystagmus, d'une poursuite oculaire anormale ainsi que des stries rétinienne au fond d'œil (FO).

L'évolution clinique a été étudiée sur une large cohorte de 320 cas au Québec pendant une période de 20 ans<sup>32</sup>. De plus, un sous-groupe de 8 patients a été suivi dans 3 études distinctes en 1977, 1982 et 1992, ciblant des données précises (cardiaque, neurophysiologique, imagerie cérébrale...). Le spectre clinique était ainsi décrit : début par l'ataxie, début des signes de spasticité entre 12 et 18 mois après la naissance, utilisation d'un fauteuil roulant en moyenne à 41 ans, aucune hypertrophie cardiaque. Les anomalies de la poursuite oculaire débutaient précocement et étaient non progressives de même que les fibres myélinisées autour du disque optique (ou stries rétinienne). Les études électrophysiologiques avaient révélé la présence d'une neuropathie périphérique

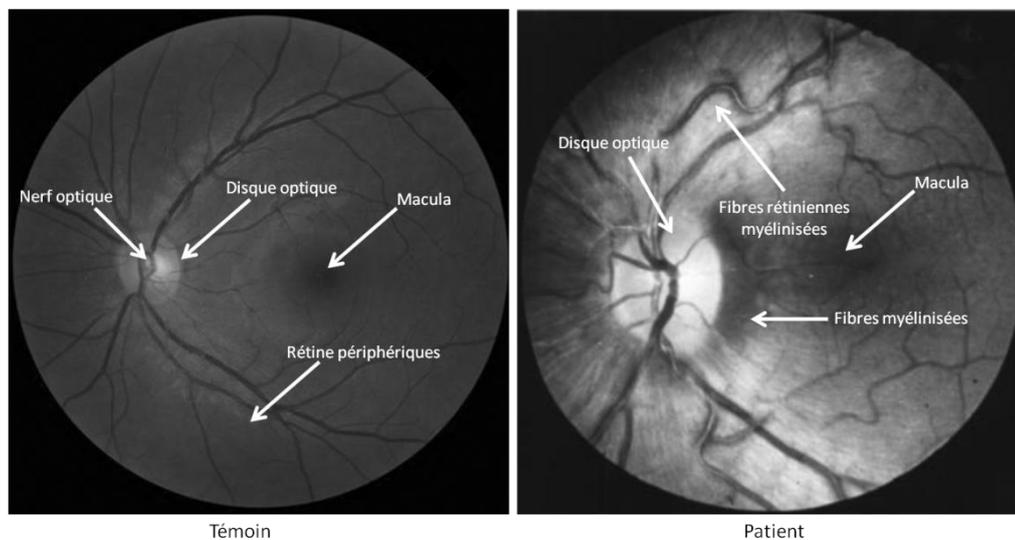
démyélinisante et axonale. L'imagerie cérébrale montrait la présence précoce d'une atrophie du cervelet progressive prédominant sur la partie supérieure du vermis (figure 10). A partir de l'année 2003, ARSACS a été identifiée au sein de populations en dehors du Québec<sup>27,29,33</sup>. Certains signes étaient systématiquement retrouvés tels que l'ataxie, l'atrophie du cervelet et la spasticité<sup>29,32,34,35</sup>, alors que d'autres apparaissaient plus spécifiques de la population québécoise, par exemple les stries rétiniennes (figure 11) et l'anomalie de la valve mitrale<sup>24</sup>.



**Figure 10 : IRM cérébrale chez un patient ARSACS**

En A est présentée l'IRM cérébrale en coupe sagittale avec l'observation chez le patient ARSACS d'une atrophie du cervelet (flèche rouge). En B est présentée l'IRM cérébrale en coupe axiale avec l'observation d'hypo-signaux au niveau du mésenchyme (flèche rouge).

*Issu de Gerwig et al. 2010<sup>35</sup>*



**Figure 11 : Fond d'œil gauche chez un patient ARSACS**

A gauche est présenté le fond d'œil (FO) d'un individu sain. Comparé au FO situé sur la droite où est observé une visibilité plus importante des fibres rétiniennes myélinisées ainsi que leur concentration au niveau du disque optique.

*A partir de Bouchard et al. 1998<sup>32</sup>*

Le début précoce avant l'âge de 20 ans était initialement considéré comme un critère majeur pour évoquer le diagnostic d'ARSACS. Cependant, des études plus récentes ont montré la possibilité de début tardif de la maladie après l'âge de 20 ans, chez 5 patients d'origine belge et dans une famille anglaise<sup>36,37</sup>. De la même façon, des formes atypiques avec un début de la maladie par une paraplégie spastique ont aussi été décrites<sup>30</sup>. Enfin, certains symptômes ont été rapportés plus rarement dans l'ARSACS comme un déficit intellectuel (DI) (4% des cas), une épilepsie, une atrophie optique et une surdité<sup>35,37</sup>.

Au final, le spectre clinique classique d'ARSACS a pu être précisé, rassemblant les caractéristiques majeures suivantes :

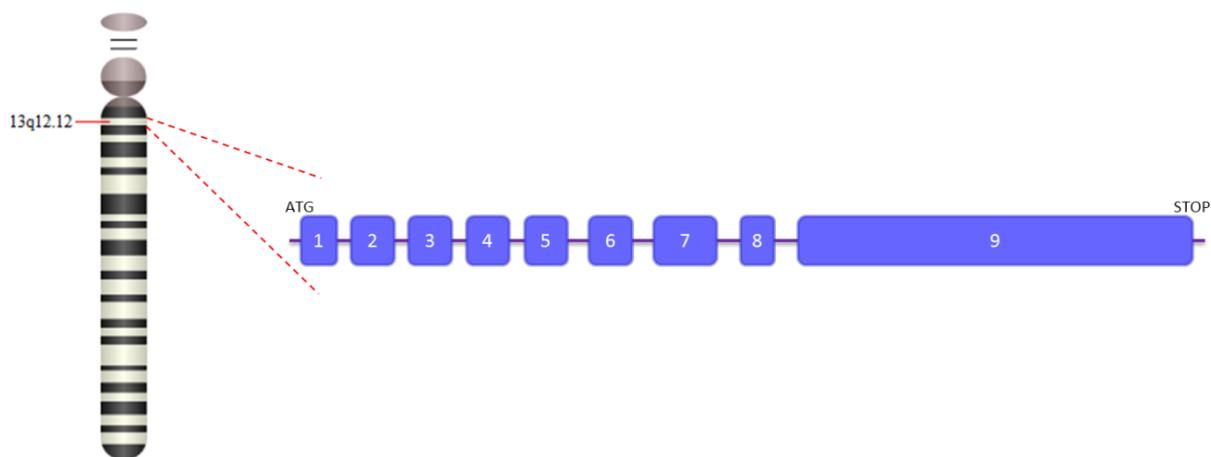
- un âge de début habituellement précoce
- une ataxie cérébelleuse qui initie le tableau clinique
- des signes de spasticité au niveau des membres inférieurs dans la grande enfance ou à l'adolescence
- une atteinte des nerfs périphériques de type axono-myélinique
- une évolution lente résultant en une perte complète de la marche en moyenne vers 40 ans

- des anomalies du cervelet et du tronc cérébral (observées en IRM cérébrale)
- des fibres nerveuses rétiniennes hypermyélinisées (ou stries rétiniennes) visibles au FO

Souvent le terme de triade clinique typique, regroupant une ataxie précoce, une spasticité et une neuropathie démyélinisante, est utilisé pour désigner les signes cardinaux.

### C) Le gène *SACS*

Le gène a été localisé par étude de liaison génétique sur le chromosome 13q11 dans une région candidate réduite à 5,5 cM à l'aide de la ségrégation des haplotypes de 9 microsatellites, en 1998 par Bouchard et son équipe<sup>32</sup>. Le gène responsable, *SACS*, a été identifié en 2000 par la même équipe, comprenant un seul exon codant pour un unique transcrite de 12 794 paires de bases (pb)<sup>38</sup>. Huit exons supplémentaires ont ensuite été identifiés en 2006 portant la taille du transcrite à 15 324 pb (figure 12)<sup>39</sup>.



**Figure 12 : Représentation schématique du gène *SACS***

Sur la gauche est représenté le chromosome 13 contenant le gène *SACS* à la position q12.12. Le gène est schématisé avec ses 9 exons (boîtes bleues) séparés par les introns (barre noire).

Le profil d'expression indiquait la présence du transcrite de *SACS* dans le système nerveux central (notamment dans les cellules de Purkinje<sup>40</sup>), les fibroblastes, le muscle squelettique ainsi que dans le pancréas en faible quantité<sup>38</sup>.

La première mutation décrite sur la population québécoise était la délétion d'un T en position 8844 (c.8844delT ; p.P2948Pfs\*5), provoquant l'interruption prématurée de la traduction<sup>38</sup>. Une centaine de mutations ont été publiées depuis, majoritairement tronquantes (55%) ou faux-sens (41%) (tableau 3).

Origine	Exon	Mutation niveau		Références
		Nucléotide	Protéine	
Québec	7	c.814C>T	p.R272C	Guernsey et al. 2010 <sup>41</sup> Thiffault et al. 2013 <sup>42</sup>
	9	c.7504C>T	p.R2502*	Engert et al. 2000 <sup>38</sup>
		c.8844delT	p.P2948Pfs*5	
		c.11707C>T	p.R3903*	
Gène entier	macro délétion		McMillan HJ et al. 2009 <sup>43</sup>	
Japan	6	c.482delA	p.N161Tfs*14	Kamada et al. 2008 <sup>44</sup>
	7	c.922C>T	p.L308F	Takado et al. 2007 <sup>45</sup>
		c.2061delT	p.D687Efs*26	Ouyang et al. 2006 <sup>39</sup>
	9	c.2405T>C	p.L802P	Kamada et al. 2008 <sup>44</sup>
		c.4033C>T	p.Q1345*	Okawa et al. 2006 <sup>46</sup>
		c.5199_5200delAG	p.K1733Kfs*3	Yamamoto et al. 2005 <sup>47</sup>
		c.6014_15delCT	p.L1999*	Shimazaki et al. 2007 <sup>48</sup>
		c.6355C>T	p.R2119*	Hara et al. 2007 <sup>49</sup>
		c.7471delT	p.N2457Nfs*17	Yamamoto et al. 2005 <sup>47</sup>
		c.7492T>C	p.W3248R	Ogawa et al. 2004 <sup>50</sup>
		c.8793delA	p.K2931Nfs*21	Hara et al. 2005 <sup>51</sup>
		c.12973C>T	p.R4325*	Takiyama et al. 2006 <sup>52</sup> Yamamoto et al. 2006 <sup>53</sup>
	Maroc	7	c.1667C>T	p.P556L
Algérie	9	c.4934G>A	p.R1645Q	Romano et al. 2012 <sup>54</sup>
		c.5719C>T	p.R1907*	Prodi et al. 2012 <sup>55</sup>
		c.6409C>T	p.Q2137*	H'mida-Ben Brahim et al. 2011 <sup>56</sup>
Tunisie	9	c.3328insA	p.I1110Nfs*1	El EuchFayeche et al. 2003 <sup>27</sup>
		c.3585delT	p.I1195Mfs*12	H'mida-Ben Brahim et al. 2011 <sup>56</sup>
		c.10290C>G	p.Y3430*	
		c.11374C>T	p.R3792*	Bouhhal et al. 2008 <sup>57</sup>
		c.12851_54delAGAG	p.E4284Afs*23	
		c.13380G>T	p.D4464Y	Bouhhal et al. 2011 <sup>33</sup>
Belgique	6	c.602C>A	p.T201K	Baets et al. 2010 <sup>36</sup>
	7	c.1667T>C	p.L556P	
	9	c.2971T>C	p.C991R	Baets et al. 2010 <sup>36</sup>
		c.3421insA	p.L1141Hfs*5	
		c.3932T>A	p.M1311K	Ouyang et al. 2008 <sup>58</sup>
		c.4761A>G	p.H1587R	Baets et al. 2010 <sup>36</sup>
		c.6094_96delTCG	2032delS	
		c.7273delC	p.L2458Lfs*16	
		c.7276C>T	p.R2426*	
		c.10934T>C	p.L3645P	Breckpot et al. 2008 <sup>59</sup>
		c.10958T>C	p.F3653S	
		c.11263_64delAT	p.I3755Mfs*7	Baets et al. 2010 <sup>36</sup>
	c.13027G>A	p.E4343K		
	c.13523A>C	p.K4508T		
3-5	Del exon 3-5			
Gène entier	Macro délétion		Breckpot et al. 2008 <sup>59</sup>	
Allemagne	6	c.502G>T	p.D168Y	Vermeer et al. 2008 <sup>29</sup>
	7	c.961C>T	p.R321*	
		c.1475G>A	p.W492*	
	8	c.2182C>T	p.R728*	
		c.1892+delG	NA	
		c.20942A>G	NA	
	9	c.4957G>T	p.E1653*	
		c.5125C>T	p.Q1709*	
		c.5143A>T	p.K1715*	
		c.6000_04delAGAA	p.R2001Efs*11	
		c.8401_03delCAA	p.2801delQ	
		c.9911_12delTC	p.L3304Qfs*13	
		c.10442T>C	p.L3281P	
		c.10906C>T	p.R3636*	
		c.12160C>T	p.Q4054*	
c.12992G>A	p.R4331Q			

**Tableau 3 : Récapitulatif des mutations du gène SACS déjà publiées**

Origine	Exon	Mutation niveau		Références
		Nucléotide	Protéine	
Italie	7	c.815G>A	p.R272H	Dibilio et al. 2013 <sup>60</sup>
		c.826C>T	p.R276C	Prodi et al. 2012 <sup>55</sup>
		c.1420C>T	p.R474C	Romano et al. 2012 <sup>54</sup>
	9	c.4033insC	p.Q1345fs*44	Criscuolo et al. 2004 <sup>61</sup>
		c.4108C>T	p.Q1370*	Grieco et al. 2004 <sup>28</sup>
		c.4198T>A	p.Y1400N	Romano et al. 2012 <sup>54</sup>
		c.4567T>C	p.W1523R	
		c.5629C>T	p.R1877*	Anesi et al. 2011 <sup>62</sup>
		c.5639C>T	p.T1880I	Romano et al. 2012 <sup>54</sup>
		c.6834insA	p.K2279Kfs*12	Grieco et al. 2004 <sup>28</sup>
		c.7121T>C	p.L2374S	Terracciano et al. 2009 <sup>63</sup>
		c.7250_54delCAGAA	p.T2417Rfs*11	Grieco et al. 2004 <sup>28</sup>
		c.11185C>T	p.Q3582*	Masciullo et al. 2008 <sup>64</sup>
		c.12428_29insA	p.Y4143*	Prodi et al. 2012 <sup>55</sup>
		c.12991C>T	p.R4331W	
c.13132C>T	p.R4378*	Anesi et al. 2011 <sup>62</sup>		
Gène entier	Macro délétion		Terracciano et al. 2009 <sup>63</sup>	
Espagne	6	c.832C>T	p.Q278*	Gazulla et al. 2012 <sup>65</sup>
	7	c.1894C>T	p.R632W	
	9	c.3091C>T	p.L1031P	Criscuolo et al. 2005 <sup>66</sup>
		c.3198T>A	p.C1066*	Gazulla et al. 2012 <sup>65</sup>
		c.4748C>G	p.P1583R	Romano et al. 2012 <sup>54</sup>
		c.8107C>T	p.R2703C	Criscuolo et al. 2005 <sup>66</sup>
		c.8677A>T	p.R2893*	Romano et al. 2012 <sup>54</sup>
		c.9670C>T	p.R3224*	Gazulla et al. 2012 <sup>65</sup>
c.13405G>C	p.A4469P			
Royaume-Uni	9	c.2224C>T	p.R742*	Terracciano et al. 2010 <sup>67</sup>
		c.13327C>T	p.Q4413*	
Autriche	9	c.3990T>A	p.D1330E	Guernsey et al. 2010 <sup>41</sup>
		c.11780C>T	p.A3927V	
Turquie	9	c.4182T>C	p.C1398R	Richter et al. 2004 <sup>68</sup>
		c.10298delC	p.T3433Kfs*27	
		c.11829_32delAGTT	p.L3943Lfs*7	
France	7	c.1607C>T	p.P536L	Anheim et al. 2008 <sup>69</sup>
	9	c.8289_91delTTC	p.Y2763*	Romano et al. 2012 <sup>54</sup>

**Tableau 3 (suite) : Récapitulatif des mutations du gène SACS déjà publiées**

## D) La saccine

Le gène *SACS* code pour la protéine saccine de 520 kDa. Le rôle précis de la saccine reste inconnu mais plusieurs études ont montré que celle-ci serait probablement multifonctionnelle. Les analyses par comparaison de séquences ont révélé la présence de motifs répétés similaires à l'HSP90 ainsi que des domaines protéiques : *Ubiquitine-like* (UbL), *heat shock protein DnaJ* (DnaJ), *Xeroderma Pigmentosum Complementation group C Binding* (XPCB) et *Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding* (HEPN)<sup>33,38,70</sup>.

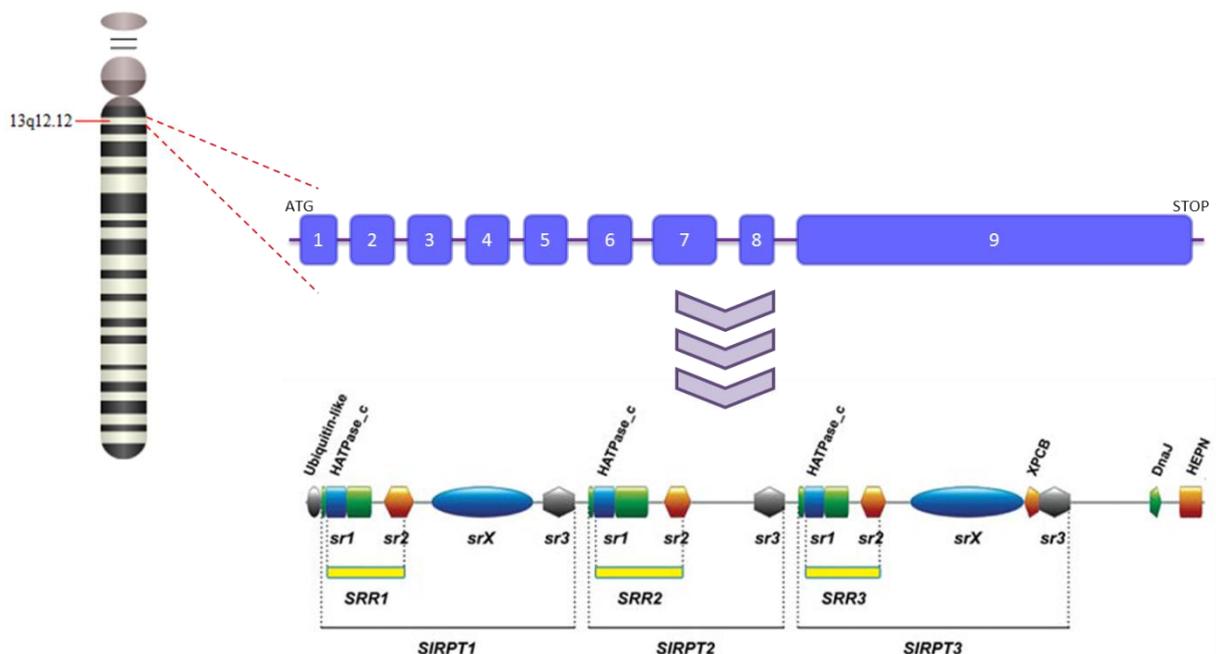
En 2008, Vermeer *et al.* ont émis l'hypothèse d'un rôle de chaperonne de la formation protéique, de par la présence du domaine DnaJ et de trois régions répétées similaires au domaine N-terminal des protéines de la famille HSP90 qui font partie de la grande famille des protéines chaperonnes<sup>29</sup>.

Anderson *et al* ont montré en 2010 que les 160 premiers acides aminés de ces régions répétées sont très fortement similaires au domaine de liaison à l'ATP des HSP90. Ils ont produit, à l'aide d'un vecteur d'expression, les 160 acides aminés de la seconde région répétée de la souris dans des cellules d'insecte, puis purifié cette protéine et démontré la conservation de l'activité d'hydrolyse de l'ATP<sup>70</sup>.

En 2009, Parfitt *et al.* confirment l'existence des 9 exons et la production d'une protéine de 4579 acides aminés<sup>40</sup>. L'existence d'un équivalent de la saccine chez la souris a été montrée, avec une taille prédite de 520 kDa ainsi qu'une expression endogène de *SACS* dans le modèle cellulaire SH-SY5Y (lignée cellulaire humaine issue d'un neuroblastome). Dans ces cellules, la localisation de la saccine était essentiellement cytoplasmique avec une faible portion nucléaire. Une co-localisation partielle de 30% avec la mitochondrie était également rapportée<sup>40</sup>. Leurs études de la séquence nucléique montrant l'absence d'une séquence d'adressage à la mitochondrie, ils concluaient que la co-localisation partielle observée résulte d'une localisation sur ou proche de la face cytosolique de la mitochondrie<sup>40</sup>. Dans la même étude, la fonctionnalité du domaine UbL a été confirmée en vérifiant son interaction avec l'unité 20S $\alpha$ C8 du protéasome par co-immunoprécipitation. Les expériences de complémentation bactérienne avaient permis d'établir que le domaine DnaJ était fonctionnel et interagissait avec les protéines de la famille HSP70, correspondant au sous-groupe de type 3 de la famille protéique. Ce groupe a un rôle spécifique de stimulation des HSP70, généralement impliquées dans la conformation des protéines. Cette caractéristique,

ajoutée à la localisation partielle de la saccine à la mitochondrie, conférerait un rôle de recruteur des protéines de la famille HSP70 à la surface des mitochondries.

Dans une autre étude, la présence de deux nouveaux domaines, XPCB et HEPN, a été décrite<sup>70</sup>. XPCB est un module d'interaction protéique et HEPN un domaine de liaison nucléotidique. Dès lors, les domaines répétés de la saccine sont redéfinies en 3 régions dites Saccin Repeating Region (SRR) avec pour chacune un domaine N-terminal à fonction ATPase spécifique aux HSP90, et une séquence peptidique sans fonction spécifique, si ce n'est le soutien structurel à la fonction en N-ter. La structure de ces régions SRR a ensuite été redéfinie en 2012<sup>54</sup>. Chacune des trois régions répétées est appelée SIRPT (Saccin Internal ReaPeaTs). Elles sont constituées de 4 sous répétitions (sr1-3 et srX). Les sous-répétitions sr1 et sr2 constituent les régions SRR définies précédemment (figure 13).



**Figure 13 : Représentation schématique des domaines protéiques de la saccine**

À la représentation du gène *SACS* (cf figure 10) sont ajoutés les différents domaines obtenus par les études de comparaison de séquences

*Adapté à partir de Romano et al. 2012<sup>54</sup>*

En 2011, Kozlov *et al.* ont caractérisé par cristallographie le domaine HEPN révélant un assemblage dimérique avec une large cavité chargée positivement et unique à tous les HEPN<sup>71</sup>. L'HEPN est composé de 4 protomères arrangés en paire de dimères. En plus de sa capacité de dimérisation, ce domaine contient une séquence de liaison nucléotidique qui se

lie au GTP (ratio 1 GTP/dimère HEPN). D'autres formes d'acides nucléiques, tels que l'ATP ou le GDP peuvent s'y lier mais avec moins d'affinité que le GTP. Cependant, le domaine HEPN ne contenant pas d'activité GTPasique, la fonction secondaire de ce domaine reste obscure. Finalement, la proximité des domaines HEPN et DNAJ évoque fortement une fonction de chaperonne de la sarsine, avec un effet de recrutement du GTP ou de l'ATP qui initierait l'échange de nucléotide sur HSP70.

## E) Aspects physiopathologiques

L'expression de la sarsine a été observée dans le cerveau et notamment dans les cellules de Purkinje. Ces cellules sont connues pour être en état de dégénérescence dans les ataxies héréditaires dont l'ARSACS<sup>31,40</sup>.

Un rôle protecteur de la sarsine a été montré contre l'effet toxique des expansions de CAG de la protéine ataxine-1, impliquée dans l'ataxie spinocérébelleuse de type I (SCA1)<sup>40</sup>. Une augmentation du nombre d'inclusions nucléaires de l'ataxine-1 a été mise en évidence dans des cellules SH-SY5Y transfectées avec une forme pathogénique d'ataxine-1 (queue polyglutamine constituée de 82 résidus), et une inhibition simultanée de la sarsine par siRNA. Le rôle protecteur de la sarsine interviendrait *via* une fonction de dégradation des protéines ataxine-1 agrégées. Aucun domaine particulier de la protéine n'a été identifié pour expliquer cette action protectrice. Cependant, les protéines impliquées dans les maladies neurodégénératives qui se caractérisent par la perte de cellules de Purkinje, telles que les SCA ou l'ataxie de Friedreich, formeraient un réseau d'interaction protéique expliquant la similarité clinique de ces maladies<sup>72</sup>. En ajoutant le rôle protecteur de la sarsine au fait que l'ARSACS appartient à cette catégorie de pathologies, tous les arguments sont réunis pour suggérer que la sarsine entre dans cet « interactome » protéique impliqué dans les ataxies<sup>72</sup>. En 2012, Girard *et al.* confirment la localisation partielle de la sarsine à la mitochondrie dans différents types cellulaires. De plus, ils montrent pour la première fois une altération morphologique des mitochondries dans des cellules SY-SH5Y inactivées pour la sarsine par siRNA, ainsi que sur des fibroblastes immortalisés de patients porteurs de la mutation québécoise c.8844delT à l'état homozygote<sup>73</sup>. Ces mitochondries présentaient des structures dites « en bulles » correspondant à des agrégats de mitochondries ou à des mitochondries isolées hyper-gonflées. Le réseau mitochondrial apparaissait également hyper-fusionné. Les

auteurs concluaient sur un rôle de la saccine dans le maintien de la morphologie des mitochondries dans les cellules. Dans la même étude, l'inactivation de la saccine dans des cultures de neurones hippocampiques de rats provoquait l'accumulation des mitochondries dans le soma et les dendrites proximales suggérant qu'une mutation de saccine entraînerait une réduction du transport mitochondrial dans les dendrites<sup>73</sup>. Parallèlement, la quantité de dendrites par neurone était réduite et ces dendrites présentaient une morphologie anormale, suggérant un autre rôle possible de la saccine dans la régulation de la morphologie des dendrites, via la distribution des mitochondries aux dendrites.<sup>73</sup>.

## Chapitre 4 : La mitochondrie

Des défauts du fonctionnement mitochondrial sont impliqués dans de nombreuses pathologies<sup>74-77</sup>. Elles se divisent en trois groupes : les pathologies causées par des mutations de l'ADN mitochondrial ; celles liées à des mutations de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales<sup>78</sup> et enfin, celles présentant des dysfonctions mitochondriales (morphologiques ou fonctionnelles)<sup>79</sup>. Lorsque le compartiment mitochondrial est altéré, les conséquences s'observent au niveau des organes à fort besoin énergétique tel que le système nerveux. Dans la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer, bien que les mécanismes moléculaires du processus de neurodégénérescence ne soient pas encore complètement élucidés, il a été démontré que la morphologie et la plasticité mitochondriale jouaient un rôle crucial<sup>80</sup>. C'est également le cas dans l'atrophie optique dominante (ADOA) causée par les mutations du gène *OPA1*<sup>81,82</sup> et de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT2A) causée par les mutations du gène *MFN2*<sup>83</sup>. Ces deux gènes codent pour des protéines mitochondriales impliquées dans la dynamique mitochondriale mais aussi dans son processus bioénergétique. Dans d'autres cas, ce sont des éléments fonctionnels qui sont affectés mais pas la dynamique. C'est le cas dans l'ataxie de Friedreich dont le gène responsable *FXN* code pour une protéine chaperone mitochondriale, la frataxine<sup>80</sup>. Cette protéine est primordiale pour le métabolisme du fer, la biogénèse des enzymes contenant un cluster fer-souffre ainsi que la détoxification du fer en excès. Des mutations dans le gène *FXN* conduisent à une accumulation du fer dans les mitochondries, une augmentation de l'absorption du fer cellulaire ainsi que des anomalies d'activité enzymatique. Ces perturbations mitochondriales provoquent une déficience des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire et par conséquent une diminution de la quantité d'ATP produite.

Ces différentes données confortent l'importance du rôle joué par les mitochondries dans le fonctionnement normal du système nerveux et en font un objet d'étude intéressant pour l'identification de mécanismes moléculaires à l'origine de pathologies cérébrales telles que les ataxies.

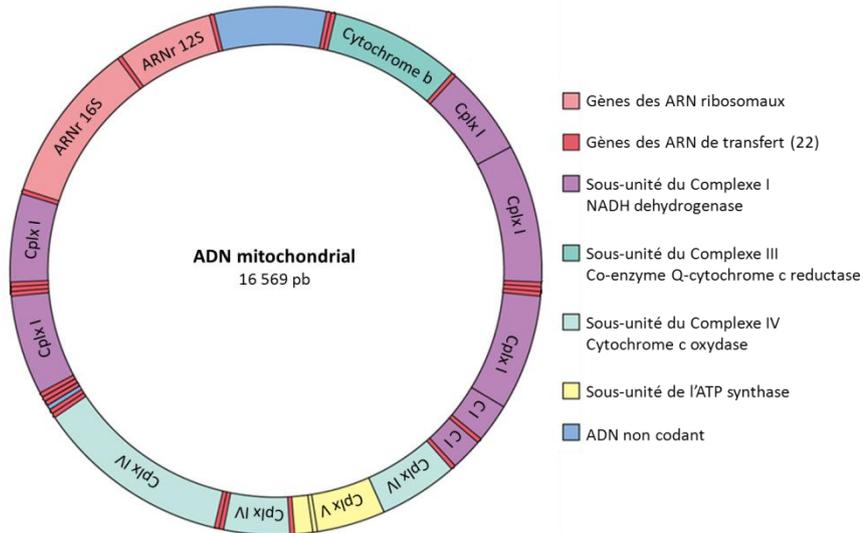
## A) Description

Les mitochondries sont des petites structures dont la taille varie entre 0,5 et 10 microns. Elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires, dont la plus connue est la production d'ATP.

Les mitochondries sont présentes en grand nombre au sein des cellules (1000 à 3000 mitochondries selon le type cellulaire). Sur le plan morphologique, elles ressemblent à des petites cellules. En effet elles possèdent une membrane, structurellement comparable à la membrane cellulaire, et sont capables d'augmenter de volume et de se diviser pour se dupliquer.

Mais surtout, les mitochondries possèdent leur propre ADN, distinct de l'ADN nucléaire (ADNn). L'ADN mitochondrial (ADNmt) se présente sous la forme circulaire double brin et a une taille de 16 569 pb chez l'homme. Il comporte 37 gènes codant pour seulement 13 protéines (figure 14). Chaque mitochondrie contient quelques dizaines à quelques milliers de molécules d'ADNmt codant pour :

- Treize sous-unités protéiques, qui avec des sous-unités codées par le génome nucléaire, participent à la formation des complexes de la phosphorylation oxydative
- les acides ribonucléiques ribosomiques (ARNr) 16S et 12S
- les acides ribonucléiques de transfert (ARNt).

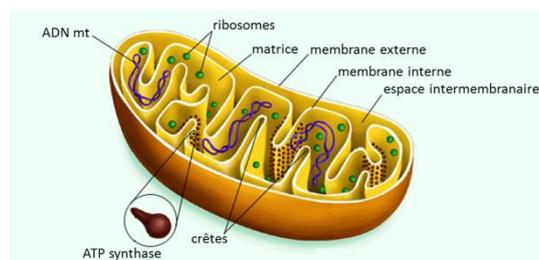


**Figure 14 : Schéma représentant l'ADN mitochondrial et les régions codant pour les sous-unités protéiques nécessaires à l'assemblage de la chaîne respiratoire**

*Modifié à partir de Pearson Education, Inc 2012*

L'essentiel des composants mitochondriaux est codé par l'ADN nucléaire et porte des séquences d'adressage spécifiques. Ces composants sont ensuite transportés dans les organites *via* des complexes de transport transmembranaire.

Les mitochondries sont composées d'une bicouche phospholipidique, une externe et une interne qui entoure la matrice et forme des crêtes (par les replis de la membrane interne) (figure 15).

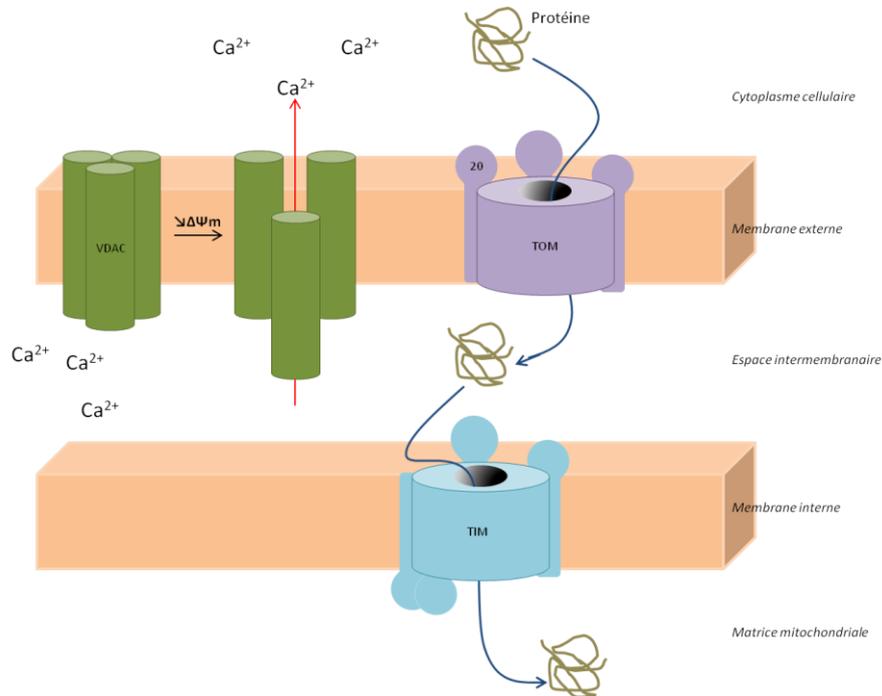


**Figure 15 : Organisation interne d'une mitochondrie**

*Traduit d'Encyclopaedia Britannica, Inc 1998*

La membrane externe contient des pores transmembranaires appelés VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), qui permettent une perméabilité passive aux molécules inférieures à 10 kDa. Elle contient également des translocases (TOM : Translocase Outer Membrane) qui permettent le transport spécifique des grosses protéines mitochondriales. La composition lipidique de la membrane interne est plus spécifique et la rend beaucoup

moins perméable. De ce fait le passage des molécules nécessite la présence de transporteurs spécifiques et les protéines sont importées vers la matrice grâce à un système de translocases, les TIM (Translocase Inner Membrane) (figure 16).



**Figure 16 : Mécanismes d'import des protéines dans l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale**

Schématisme du pore transmembranaire VDAC et son ouverture en fonction du potentiel de membrane. Sont également représentées les translocases TOM et TIM pour la circulation des protéines à travers les membranes mitochondriales.

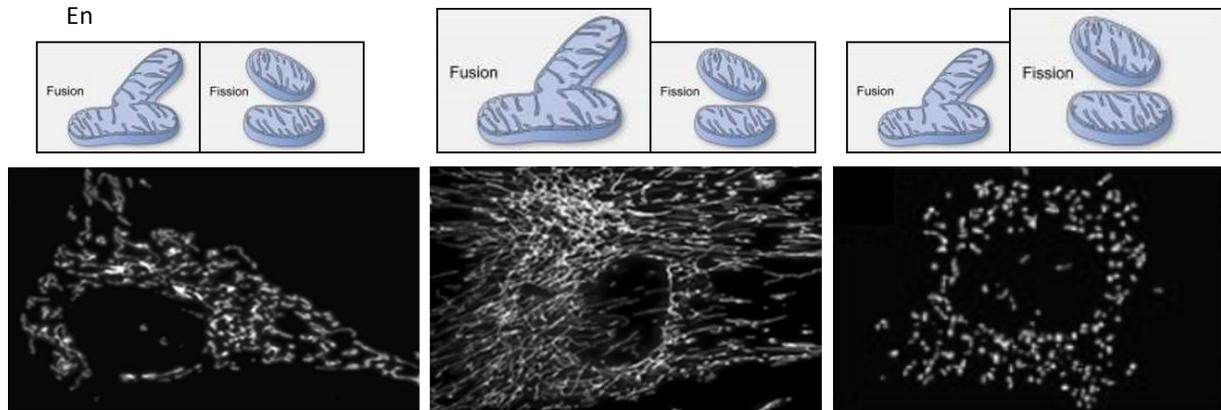
Ces caractéristiques membranaires sont particulièrement exploitées lors des analyses morphologiques et fonctionnelles du compartiment mitochondrial. En effet, la perméabilité passive aux petites molécules permet l'utilisation efficace et rapide de sondes fluorescentes comme le MitoTracker®, pour la visualisation du réseau mitochondrial dans la cellule et le TMRM, pour visualiser une altération fonctionnelle.

## B) La balance mitochondriale

Dans les cellules eucaryotes, les mitochondries forment un réseau tubulaire plus ou moins connecté dont la morphologie varie en fonction du type cellulaire et des conditions métaboliques<sup>84</sup>. Ce réseau est en équilibre constant entre deux mécanismes : la fusion et la

fission mitochondriale<sup>85</sup>. Ces mécanismes déterminent le nombre, la longueur et le diamètre des mitochondries. Lorsqu'il existe une altération de ces processus, le réseau mitochondrial apparaît fragmenté ou au contraire, devient tubulaire et filamenteux (figure 17).

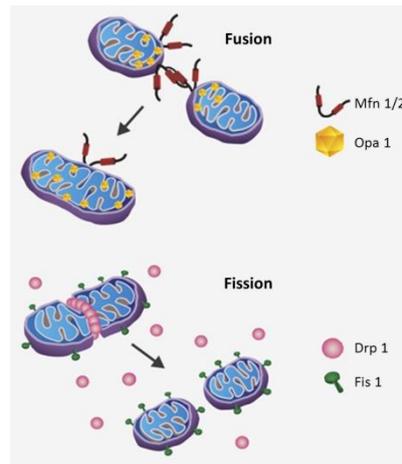
**Figure 17 : Trois états du réseau mitochondrial en fonction de la balance entre la fusion et la fission**



**A** est représentée une cellule normale avec une balance fusion/fission égale. En **B** est représentée un réseau hyper-fusionné et en **C** un réseau hyper-fissionné.

*Images issues de Rambold et al., 2011<sup>86</sup> ; Goizet et al., 2011<sup>87</sup>*

Plusieurs protéines jouent un rôle clé dans ces événements<sup>88</sup>. Les trois protéines majoritairement responsables de la fusion sont les mitofusines (MFN1 et MFN2), impliquées dans la fusion des membranes externes, et la protéine OPA1 qui permet la courbure et la fusion des membranes internes. Les deux principales protéines responsables de la fission sont DRP1, recrutée au niveau des sites de scission de la membrane externe *via* la protéine Fis1, et GDAP1 impliquée dans le phénomène de fission mais de manière encore inconnue (figure 18).



**Figure 18 : Partenaires protéiques essentiels à la dynamique du réseau mitochondrial**

La partie haute concerne le mécanisme de fusion entre deux mitochondries *via* l'intervention des protéines Mfn 1/2 et Opa 1. La partie basse concerne la fission avec la visualisation de l'anneau constitué de protéine DRP1. La protéine Fis 1 permet le recrutement de DRP1 à la mitochondrie.

*Adapté à partir de Powers S. et al., 2012<sup>89</sup>*

A l'image des trois protéines impliquées dans la fusion, les mutations dans les deux gènes codant pour les protéines clés de la fission, DRP1 et GDAP1, ont été associées à des phénotypes neurodégénératifs. Une mutation faux-sens dans *DRP1*, avec un effet dominant négatif drastique, a été identifiée chez un jeune patient associant une microcéphalie, une atrophie optique et un développement cérébral anormal avec décès prématuré<sup>90</sup>. La protéine GDAP1 a été impliquée dans les formes axonales de Charcot-Marie-Tooth (AR-CMT2 et CMT2K)<sup>76</sup> mais aussi dans une forme récessive démyélinisante (CMT4A)<sup>91-93</sup>.

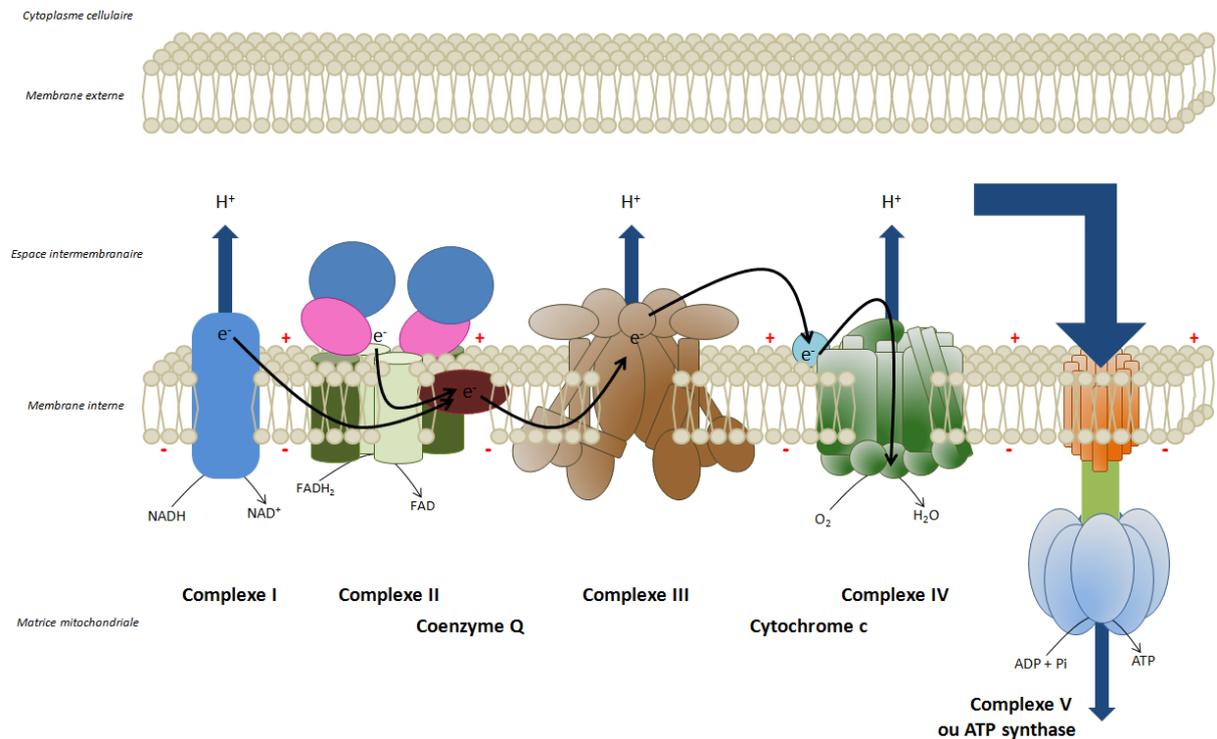
L'altération des processus de fusion et de fission mitochondriales peut affecter de manière significative la fonction neuronale. Les mitochondries se déplaçant le long du cytosquelette à l'aide des kinésines assurent la distribution d'ATP aux sites cellulaires à forte demande énergétique. Une interconnexion existe entre l'état de fusion/fission du réseau mitochondrial et le transport neuronal des organites<sup>94</sup>. Cependant la nature de celle-ci n'est pas encore complètement déterminée. Une anomalie du transport mitochondrial a été observée suite à l'altération de la protéine de liaison Miro qui permet le lien entre les microtubules et la mitochondrie. Cependant, le mutant Miro provoque des anomalies de morphologie mitochondriale sans forcément affecter la balance fusion/fission<sup>95</sup>. Une

anomalie du transport rétrograde des mitochondries due à l'altération de la dynéine, provoque la séquestration de DRP1 dans le cytoplasme et donc l'incapacité de fragmentation du réseau mitochondrial<sup>96</sup>.

### C) Fonctions

La fonction principale de la mitochondrie est la production d'énergie *via* les phosphorylations oxydatives de la chaîne respiratoire qui se déroulent au niveau des membranes mitochondriales.

Quatre complexes de la chaîne respiratoire et l'ATP synthase assurent les phosphorylations oxydatives (OXPHOS) au niveau de la membrane interne et le produit final de cette chaîne est l'ATP (figure 19). Cette production d'ATP est essentielle au fonctionnement de la cellule.



**Figure 19 : Représentation de la chaîne respiratoire insérée dans la membrane interne mitochondriale**

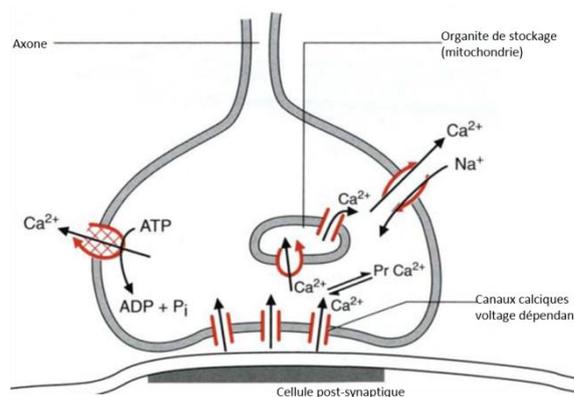
Les flèches bleues indiquent le sens de transport des protons ( $H^+$ ), les flèches noires schématisent le transport d'électrons ( $e^-$ ) entre les complexes. De chaque côté de la membrane interne est symbolisée la charge positive ou négative (+/-) du potentiel de membrane.

Ses propriétés structurales permettent à la mitochondrie de maintenir le gradient de protons créé par la chaîne respiratoire de part et d'autre de la membrane interne. Les crêtes

formées par cette membrane permettent également d'augmenter sa surface d'échange et par conséquent la capacité et l'efficacité des phosphorylations oxydatives.

Au sein de la matrice mitochondriale, nous retrouvons les cycles biochimiques tels que le cycle de Krebs, la  $\beta$ -oxydation, la glycolyse... Ceux-ci fournissent les substrats nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire.

La mitochondrie assure également des fonctions secondaires. L'une d'elles est le stockage du calcium, comme le fait le réticulum endoplasmique, ainsi que la régulation de la concentration calcique intracellulaire<sup>97</sup>. Le calcium joue un rôle important dans la transmission synaptique. L'augmentation de la concentration calcique dans la terminaison axonale va permettre la libération de neurotransmetteur (figure 20). Une perturbation des organites de stockage tels que la mitochondrie va donc se répercuter sur le fonctionnement de la transmission synaptique et par conséquent jouer un rôle dans les pathologies à dégénérescence neuronale.



**Figure 20 : Circuit du calcium dans la terminaison synaptique à la suite d'une dépolarisation**

Au niveau de la cellule pré-synaptique, le calcium est transporté via des canaux calciques voltage dépendant et des pores transmembranaires. L'organite schématisé au centre de la cellule pré-synaptique est une mitochondrie.

*Issu de Peschanski M. 1994<sup>98</sup>*

Une autre de ses fonctions est liée à l'apoptose (ou mort cellulaire programmée)<sup>99,100</sup>. Au cours de l'apoptose, la membrane externe mitochondriale est perforée, ce qui conduit à la libération de calcium dans le cytosol de la cellule ainsi que de molécules apoptogènes mitochondriales (cytochrome c, Apoptosis Inducing Factor...).

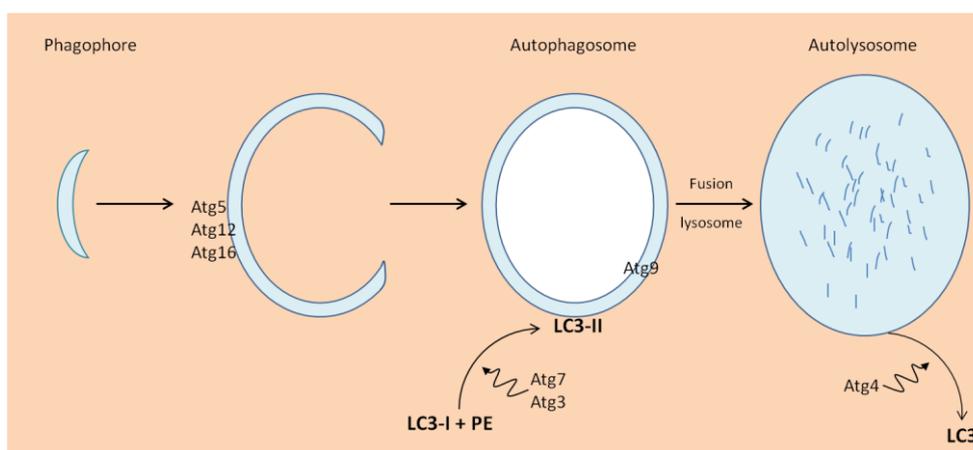
## D) Le système de dégradation

Lorsque les mitochondries sont défectueuses, elles peuvent être très toxiques pour la cellule puisque leur présence entraînent l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et donc le stress oxydatif<sup>101</sup>. La mitophagie assure le recyclage de ces organites et préserve le bon fonctionnement des cellules.

Le terme mitophagie a été officiellement utilisé en 2005 par Lemasters<sup>102</sup>, et décrit le processus sélectif de dégradation des mitochondries par l'autophagie.

### 1. L'autophagie

L'autophagie est un système de dégradation lysosomale. Il est le résultat de la maturation en trois temps d'une vacuole cytosolique, le phagophore. Cette vacuole va s'allonger et se refermer pour former l'autophagosome, assurant l'élimination de tous les organites cellulaires défectueux. Il est alors délimité par une double membrane phospholipidique avec l'implication d'une quinzaine de protéines Atg et de la protéine LC3. Lorsque la protéine LC3-I est liée à un lipide membranaire, le phosphatidyléthanolamine (PE), la protéine devient une forme active (LC3-II) qui se retrouve liée aux membranes de l'autophagosome. Ce flux de LC3 est majoritairement utilisé comme un indicateur d'autophagie. L'autophagosome fusionne ensuite avec le lysosome afin de former l'autolysosome. Le lysosome apporte toutes les enzymes nécessaires à la lyse au sein du compartiment (figure 21).



**Figure 21 : Différentes étapes de la formation de la vésicule lysosomale de l'autophagie**

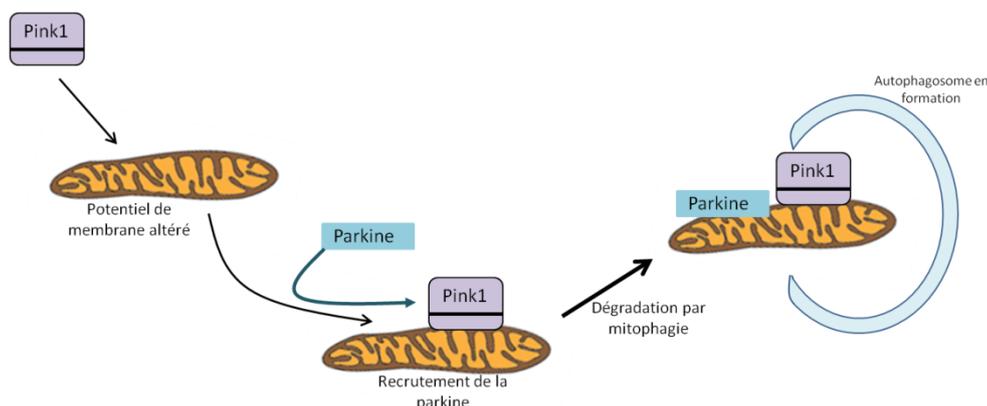
En bleu est schématisé le phagophore et sa maturation dans le cycle de l'autophagie. Les fragments au sein de l'autolysosome représentent la lyse enzymatique effectuée en son sein.

## 2. La mitophagie

La mitophagie est régie par trois mécanismes moléculaires :

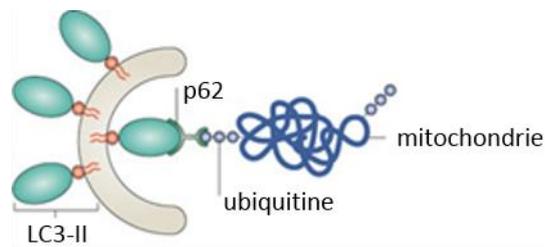
- *via* des protéines adaptatrices (p62)
- *via* la dynamique mitochondriale et le potentiel de membrane
- *via* la protéine MTOR, la modification lipidique de la membrane mitochondriale et des protéines mitochondriales.

Les mitochondries défectueuses sont reconnues par ubiquitinylation. La protéine pink1 est une protéine mitochondriale impliquée dans le contrôle qualité des mitochondries. Elle induit leur dépolarisation si celles-ci sont dysfonctionnelles<sup>103</sup>. Pink1 recrute ensuite la protéine parkine à la surface de la mitochondrie pour l'ubiquitinylation permettant le déclenchement de la mitophagie (figure 22).



**Figure 22 : Action combinée de pink1 et parkine pour l'initiation de la mitophagie**

Une mitochondrie à dégrader va ensuite être identifiée par un complexe protéique constitué par l'ubiquitine, p62 et LC3. La protéine p62, aussi appelée le sequestrosome-1 (SQSTM1), reconnaît d'une part l'ubiquitine à la surface de la mitochondrie défectueuse, et d'autre part, la forme LC3-II associée à l'autophagosome. La mitochondrie défectueuse se trouve alors au niveau de l'autophagosome en formation (figure 23).



**Figure 23 : Recrutement de la mitochondrie à l'autophagosome**

La protéine LC3-II est représentée par la protéine LC3 (en vert) et un lipide membranaire PE (en orange). La protéine p62 va se fixer à l'ubiquitine présente sur la mitochondrie et sur la protéine LC3-II, permettant ainsi le recrutement de la mitochondrie défectueuse au cœur de l'autophagosome en formation.

*Adaptée de Tyedmers et al., 2010<sup>104</sup>*

La mitophagie est particulièrement importante dans les neurones. Une mitophagie défectueuse peut ainsi affecter le développement et la survie des neurones et conduire à des troubles neurologiques<sup>94,105</sup>. Un des exemples les plus détaillés est le cas des formes AR de la maladie de Parkinson où des mutations des gènes *PARK2* et *PINK1* ont systématiquement été associées à un défaut de la mitophagie<sup>106</sup>.

## Problématique de la thèse

La découverte de patients atteints d'ARSACS dans le monde entier en fait la deuxième cause d'ataxie spastique héréditaire. L'hétérogénéité des dégénérescences spinocérébelleuses rend le diagnostic clinique de l'ARSACS difficile. Seule l'analyse moléculaire du gène *SACS* peut permettre de poser un diagnostic certain.

Dans une première partie, le travail de cette thèse a consisté dans l'identification de nouvelles mutations dans le gène *SACS* au sein d'une grande cohorte de patients collectés grâce à des collaborations avec le réseau SPATAX (coordonné par le Pr Alexandra Durr, Hôpital La Salpêtrière, Paris), et le centre de référence Maladies Rares «Malformations et Maladies Congénitales du Cervelet» (coordonné par le Dr Lydie Burglen, Hôpital Trousseau, Paris). Ces analyses génétiques nous ont permis d'identifier de nombreuses mutations essentiellement privées. L'interprétation des variants faux-sens peut s'avérer délicate et rendre difficile la validation d'un résultat en diagnostic de routine. L'utilisation croissante du NGS va inévitablement déboucher sur la découverte de plus en plus fréquente de tels variants. Dans de tels contextes, l'existence d'un bio-marqueur s'avérerait très utile en pratique courante.

Dans une deuxième partie, nous avons réalisé une étude fonctionnelle visant à mieux comprendre le(s) rôle(s) de la saccine. Nous nous sommes intéressés à la fonction mitochondriale de la saccine, qui a été récemment mise en lumière dans deux publications. Nous avons étudié des fibroblastes de patients pour tenter d'identifier un phénotype cellulaire anormal. A la lumière de ces résultats, nous avons tenté d'investiguer plus précisément la mécanique de la fonction mitochondriale de la saccine.

Notre travail a permis, à travers l'identification de 47 sujets atteints d'ARSACS, de mieux préciser le spectre mutationnel et phénotypique de la maladie. Un nouveau phénotype d'ACC a ainsi pu être révélé. Les résultats de l'étude clinique, réalisé par le Dr Sébastien Moutton lors d'une collaboration avec le service de génétique du CHU de Bordeaux, sont présentés en annexe dans l'article soumis pour publication (annexe 3).

Enfin, nous proposons une définition graduelle du diagnostic d'ARSACS reposant sur des critères clinique, moléculaire et cellulaire (pouvant être utilisé comme bio-marqueur).

# Matériels et Méthodes

## *1] Patients*

### 1. SPATAX

Une cohorte de 321 patients a été sélectionnée dans la collection du réseau européen et méditerranéen des dégénérescences spinocérébelleuses (SPATAX), coordonné par le Pr Alexandra Durr (Paris), pour une analyse du gène *SACS*, en fonction des critères d'inclusion suivants :

- présence d'une ataxie cérébelleuse (avec ou sans atrophie du cervelet)
- présence d'une spasticité
- un âge de début avant 45 ans

### 2. ATAXIC

En parallèle, 156 patients atteints d'une ataxie congénitale (âge de début avant 2 ans et non évolutive en date de l'inclusion), ont été testés par séquençage haut débit ou « *Next Generation Sequencing* » (NGS), dans le cadre du projet hospitalier de recherche clinique ATAXIC N°IDRCB 2010-A00715-34, coordonné par le Dr Lydie Burglen (Centre de Référence Maladies Rares «Malformations et Maladies Congénitales du Cervelet» de l'hôpital Trousseau-Paris),. Parmi eux, cinq patients ont été identifiés porteurs de deux mutations dans le gène *SACS*, dont nous avons reçu les prélèvements ADN.

### 3. PATIENTE JAM-001

Enfin, nous avons également inclus dans cette étude, une dernière patiente âgée de 2 ans, présentant une ataxie cérébelleuse très précoce avec retard du développement psychomoteur, chez qui une délétion du chromosome 13q12 emportant intégralement *SACS* a été identifiée par CGH-array pan-génomique dans un cadre de diagnostic de routine (CHU Angers, collaboration avec le Dr Magali Barth).

## II] Etude de l'ADN et de l'ARN

### A) Analyse de l'ADN

#### 1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN, issu du culot cellulaire resuspendu dans 200 µl de DPBS 1X, a été réalisée selon le protocole du kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen).

#### 2. Amorces de PCR

Trente et un couples d'amorces (annexe 1) ont été élaborés à partir du logiciel Primer 3 en utilisant la séquence de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène SACS, ENST00000382292 du site Ensembl.

#### 3. Amplification et séquençage de l'ADN

L'amplification est réalisée sur un thermocycleur VWR R1732-1200 (VWR International) par la Taq Gold polymérase (Applied Biosystems). Le protocole d'amplification utilisé est présenté dans le tableau 4.

Pour 1 échantillon	Volume (µl)	Concentration ou quantité finale	Programme de PCR
10X PCR Buffer	2,5	1X	95°C 10min 94°C 30sec T <sup>hybridation</sup> 30sec 72°C 30sec 72°C 5min x35
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5	1,5 - 2 mM	
dNTPs (5 mM)	1	0,2 mM	
Amorce sens (10 µM)	2	0,8 µM	
Amorce antisens (10 µM)	2	0,8 µM	
Taq Gold polymérase (5 U/µl)	0,2	1 U	
Eau MilliQ	13,8		
ADN (20 ng/µl)	2	40ng	
Volume total	25		

Tableau 4: Réactifs et protocole pour réaliser une PCR à partir d'ADN génomique

Pour chaque couple d'amorces, la concentration de MgCl<sub>2</sub> ainsi que la température d'hybridation ont été optimisées à 60°C pour tous, excepté pour le couple d'amorce 9-S (55°C).

Après vérification de la taille des produits de PCR sur gel d'agarose à 2%, ceux-ci ont été purifiés par des billes magnétiques selon le protocole AMPure (Beckman Coulter) et dosés au Nanodrop (Thermo Scientific).

La séquence est obtenue avec le kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing v1 (Invitrogen). Le protocole de réaction de séquence utilisé est présenté dans le tableau 5.

<i>Pour 1 échantillon</i>	Volume (µl)	Concentration ou quantité finale	Programme de séquence										
5X Big Dye Buffer	1,3	1X	<table style="border: none;"> <tr> <td style="padding-right: 10px;">94°C</td> <td style="padding-right: 10px;">3 min</td> <td rowspan="4" style="font-size: 3em; vertical-align: middle;">}</td> <td rowspan="4" style="vertical-align: middle;">X25</td> </tr> <tr> <td>96°C</td> <td>10 sec</td> </tr> <tr> <td>50°C</td> <td>5 sec</td> </tr> <tr> <td>60°C</td> <td>4 min</td> </tr> </table>	94°C	3 min	}	X25	96°C	10 sec	50°C	5 sec	60°C	4 min
94°C	3 min	}		X25									
96°C	10 sec												
50°C	5 sec												
60°C	4 min												
Amorce sens (10 µM)	0,3	3 pmoles											
Big Dye v1.1	0,75												
Eau MilliQ	11,65												
ADN amplifié	1	10 ng											
Volume total	15												

**Tableau 5: Réactifs et protocole pour réaliser une réaction de séquence**

Les séquences sont passées sur un séquenceur capillaire ABI Prism 3130XL. L'analyse des résultats obtenus est réalisée sur le logiciel SeqScape version 2.7 (Applied Biosystems).

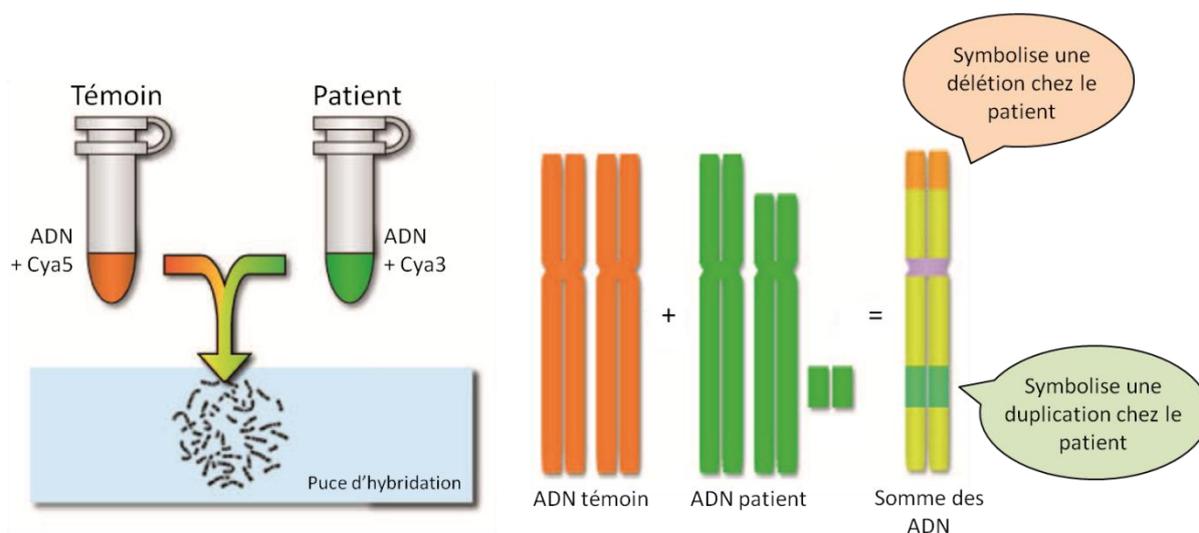
#### 4. Analyse des marqueurs microsatellites

Quatre marqueurs de type microsatellites, sélectionnés à partir du site internet NCBI-UniSTS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>), ont été choisis autour du gène SACS sur le chromosome 13 (D13S232, D13S292, D13S787, and D13S1243). Un marqueur intragénique a été recherché à l'aide du logiciel en ligne Repeat Masker ([www.repeatmasker.org/](http://www.repeatmasker.org/)). Une répétition du type GT a ainsi pu être mise en évidence dans le premier intron du gène SACS. Un couple d'amorces spécifiques a ensuite été choisi à l'aide du logiciel en ligne Primer 3 (msatFSACS 5'-CACACCCTTTTGGCTGAAGG-3' et msatRSACS 5'-CGCATGGCAATATCACAGTC-3' sur [http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)). L'ADN des patients a été amplifié avec ces 5 couples d'amorces, séparément. Les produits fluorescents sont ensuite analysés sur un séquenceur automatisé ABI Prism 3130XL. L'analyse des pics obtenus a été réalisée sur le logiciel Genemapper (Applied Biosystems).

## 5. Puce d'hybridation génomique comparative ou CGH-array

La CGH-array est une technique de cytogénétique utilisée pour l'analyse des variations du nombre de copies dans l'ADN. Cette technique utilise une puce sur laquelle sont fixés des milliers d'oligonucléotides, représentatifs de tout ou partie du génome. Ici, la puce utilisée est une puce à façon permettant l'étude de plusieurs gènes étudiés au laboratoire MRGM, dont le gène *SACS*. Cette puce à façon 44K (Agilent Technologies) a été utilisée pour avoir une cartographie fine des points de cassure des délétions avec une résolution de 240 pb. Cette puce contenant 25 021 amorces couvre 6 Méga bases (Mb) dans la région chromosomique 13q12 comprenant le gène *SACS*.

L'ADN génomique a été extrait à partir du sang périphérique selon des protocoles standard. L'ADN du témoin et du patient ont été marqués en cyanine 3 (Cya3) ou cyanine 5 (Cya5) en utilisant le kit de marquage enzymatique d'Agilent Technologies et hybridés sur la puce selon les instructions du fournisseur (figure 24). Le scan de la puce a été réalisé sur un scanner G2565CA (Agilent Technologies).



**Figure 24: Schématisation du principe de CGH-array pour l'analyse des variations de dosage génique**

*Adaptée de l'unité d'enseignement cytogénétique moléculaire de S. Romana et V. Malan (Hôpital Necker, Paris)*

Les analyses des données ont été effectuées sur le logiciel d'extraction Agilent Genomic Workbench 6.0.130.24 pour la localisation d'anomalies chromosomiques et l'annotation des régions délétées ou dupliquées. Les anomalies sont caractérisées par une valeur du ratio des intensités de fluorescence (cyanine5/cyanine3) en logarithme de base 2 avec un seuil de 5. De ce fait, la valeur 0 correspond à une égalité parfaite entre les intensités. Une valeur

inférieure à -0,5 correspond à une délétion, et une valeur supérieure à +0,3 correspond à une duplication. Les points de cassure des délétions sont cartographiés sur la version hg19 du génome humain d'UCSC genome browser.

## B) Analyse de l'ARN

### 1. Extraction et transcription inverse de l'ARN

Les ARNm ont été extraits à partir des cultures primaires de fibroblastes de témoin et de patients. À partir d'une boîte de Petri confluente, les cellules ont été décollées de façon mécanique avec un grattoir. Le culot a été lysé par ajout de Qiazol (Qiagen) et de Chloroforme (Sigma Aldrich). Après une centrifugation de 15 min à 1200 rpm, l'ARN de la phase aqueuse obtenue a été extrait selon le protocole du kit RNeasy Mini de chez Qiagen. La transcription inverse a été réalisée avec la rétrotranscriptase MuLV et l'inhibiteur de RNases, RNasin (Promega). Le protocole de réaction utilisé est présenté dans le tableau 6.

Pour 1 échantillon	Volume (µl)	Concentration finale	Programme de PCR	
10X PCR Buffer	2	1X		
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4	5 mM		
dNTPs (20 mM)	1	1 mM	20°C	10 min
Amorce polyT (50 µM)	1	2,5 µM	42°C	120 min
RNasin (40 U/µl)	1	40 U	99°C	5 min
MuLV (50 U/µl)	1	50 U		
Eau MilliQ	5		4°C	∞
ARN (200 ng/µl)	5	1 µg		
Volume total	20			

Tableau 6: Réactifs et protocole pour la réalisation de la transcription inverse de l'ARN

### 2. Etude du transcrit

Cinq couples d'amorces ont été utilisés afin d'amplifier l'ARNm de SACS à partir de l'ADNc extraits des fibroblastes de patients (figure 25).



Figure 25: Répartition des amorces pour l'amplification de l'ARNm de SACS

Le programme d'amplification utilisée est similaire à celui utilisé pour l'ADN avec une élongation de 2 min au lieu de 30 sec. Ceci dans l'objectif de visualiser, lors de la migration sur gel d'agarose à 2%, les fragments de plus de 3kb attendus dans le cas d'un événement de rétention d'intron. L'ensemble des tailles attendues des fragments amplifiés sont regroupé dans le tableau 7.

Couple d'amorce utilisé	Séquence des amorces	Taille attendue du fragment
1_bleu	F_TCACAAACAAATATCCCAGGAG	287pb
	R_CCCCCTTTTAAGCCTTTTGA	
2_violet	F_CGCGATGTGAAGGAACGTAT	412pb
	R_AGTCTCTGGGGTGAAAACC	
3_orange	F_CCGCGAGTTATCTGACTGGA	307pb
	R_ATAGAGAGCTGGCCCCTGAT	
4_bordeaux	F_AGACAACGCCACCACTTGTT	1847pb
	R_AGCATCCACATTCCCTGGTA	
5_vert	F_AGCCTACAGTGAGCTGCTTG	867pb
	R_CAACCTTTCAATTTGTATAAGAGGA	

Tableau 7 : Taille attendue pour les amorces utilisées dans le cadre de l'amplification de l'ARNm

## C) Analyse par interférence de la traduction

### 1. Petits ARN en épingle à cheveux (Sh-RNA)

Cinq « short hairpin RNA » (sh-RNA) ont été sélectionnés sur le site de Sigma-Aldrich en fonction de leur efficacité d'interruption de la transcription/traduction (sh 303372, sh 369621, sh 84126, sh 84123, sh 281681).

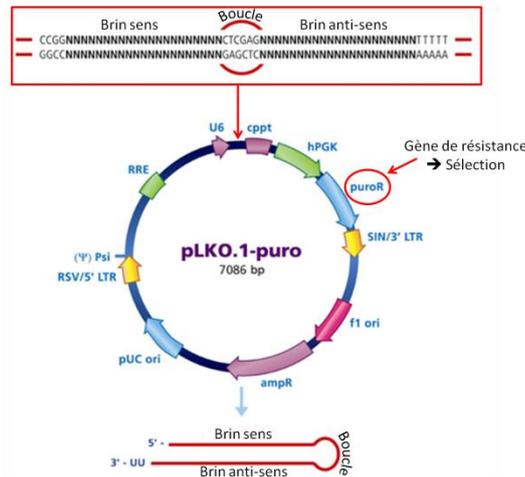
Deux couples d'amorces du gène *SACS* (H7 et C9), en utilisant la même séquence d'ADNc que précédemment, ont été élaborés à partir du logiciel Primer Blast avec des paramètres standards pour une utilisation en PCR quantitative (tableau 8). La séquence H7 a été sélectionnée chevauchante sur les exons 7-8 et la séquence C9 a été sélectionnée dans la région terminale de l'exon 9.

H7-L	AGCCTACAGTGAGCTGCTTG
H7-R	TCCTTCAAGACTTGGGAAAAGG
C9-L	TTCTACACCAACCAGCCCCA
C9-R	CCTTAAGCTTTTGGGGGACTG

**Tableau 8: Séquences des amorces de PCR quantitative dessinées sur la séquence nucléotidique du gène SACS**

## 2. Amplification et extraction du plasmide

Les sh-RNA, intégrés au plasmide pLKO.1 avec une sélection à la puromycine, ont été achetés sous la forme d'un stock glycérol bactérien (Sigma-Aldrich) (figure 26). La mise en culture et l'amplification des bactéries ont été réalisées selon un protocole standard de bactériologie.



**Figure 26: Schéma du plasmide pLKO.1 intégrant la séquence d'un sh-RNA**

Le plasmide contient un gène de résistance à la puromycine permettant la sélection des bactéries qui ont intégré le plasmide. Le cadre rouge symbolise la séquence intégrée dans le plasmide d'un sh-RNA constitué de deux séquences complémentaires (sens et anti-sens) séparées par une séquence de six nucléotides permettant l'hybridation entre les séquences.

*Issu du fournisseur, Sigma Aldrich*

Les plasmides sh-RNA ont ensuite été extraits à partir du protocole du kit midi endo-free de Macherey Nagel puis stockés à -20°C.

### 3. Transfection des cellules

Les plasmides contenant les sh-RNA ou un plasmide pLKO vide ont été transfectés dans des cellules HeLa et des fibroblastes témoins avec un agent de transfection, le Fugene® HD (Promega) à une concentration finale de 0,02 µg/µl. La quantité de plasmide est déterminée selon le protocole data base de Promega avec un ratio Fugene®/ADN 2 :1. Nous avons utilisé deux formats de transfection dans nos expériences, le format boîte de Petri 100mm pour les mises au point et le format Lab-Teck 4 puits pour les expériences d'immunofluorescence. Pour le premier format nous utilisons donc 30 µg d'ADN, et pour le second format, nous utilisons 1 µg/µl d'ADN. La transfection est réalisée pendant 48 h sur les cellules et est suivie d'une sélection sur la nuit avec une dilution au 1/2000° de puromycine à 1 mM.

### 4. Mise au point de l'efficacité des sh-RNA

La PCR quantitative a été réalisée en utilisant IQTM SYBR® Green supermix (Biorad) sur le thermocycler CFX96 Touch Real-Time PCR system (Biorad). Les efficacités de la PCR quantitative pour toutes les paires d'amorces ont été évaluées en utilisant des dilutions sérielles à partir d'un même échantillon d'ADNc extrait de cellules HeLa. L'expression d'un gène cible a ensuite été évaluée sur la base de la comparaison des  $\Delta$ CT et présentée en unité arbitraire, normalisée sur une référence endogène en utilisant le logiciel CFX Manager.

Les amorces du gène *SACS*, H7 et C9, ont été utilisées à une concentration finale de 400 nM et 100 nM respectivement. A cette concentration nous avons obtenu une efficacité de 103,8% pour l'amorce H7 et de 102,6% pour C9.

Deux gènes de référence ont été utilisés, *GusB* (gène codant pour la beta glucosidase) et *RPLP0* (gène codant pour une protéine ribosomique), à une concentration de 200 nM. L'efficacité de *GusB* est de 97,7% et de *RPLP0* est de 102%.

Les efficacités d'interférence par les sh-RNA ont été quantifiées par la PCR quantitative et regroupées sur le tableau 9

	C9	H7
sh 303372	87%	68%
sh 369621	85%	0%
sh 84126	58%	45%
sh 84123	88%	78%
sh 281681	81%	28%

**Tableau 9: Efficacités d'inhibition des différents sh-RNA dirigés contre la sarsine**

L'efficacité d'interférence étant plus importante avec le couple d'amorce C9, nous avons conservé ce couple pour les expériences.

### *III] Culture cellulaire*

#### **A) Cultures primaires**

##### **1. Biopsies de peau**

Le médecin a réalisé un prélèvement d'un fragment de peau d'environ 2mm<sup>3</sup> au niveau de la face interne du bras du patient. Ce fragment cutané doit être suffisamment profond pour prélever plus que de l'épiderme. La zone de prélèvement a été anesthésiée localement. La biopsie a ensuite été mise dans un flacon contenant du milieu de culture stérile complet. Puis le médecin a réalisé une suture cutanée. Dans notre étude, 11 patients et un témoin ont accepté de faire cette biopsie de peau (tableau 10).

Patients	Exon concerné	Mutation	Etat
MAR-7444-007	Exon 9	p.Y3430*	Homozygote
BOR-090711-003	Exon 9	p.L1180Lfs*8 p.K3747*	Hétérozygote composite
AAR-545-003	Exon 9	p.V3545Efs*3 p.R3792*	Hétérozygote composite
AAR-437-014	Exon 7	p.R272H	Homozygote
AAR-242-003	Exon 7	p.I513V	Homozygote
AAR-519-001	Exon 9	p.P2099L	Homozygote
AAR-334-009	Exon 9	p.R961* p.R2703H	Hétérozygote composite
AAR-601-019	Exon 5 Exon 9	p.L143Lfs*10 p.Q4356*	Hétérozygote composite
AFT-068-005	Exon 9	p.F2056Ffs*21 p.P2217Q	Hétérozygote composite
ANG-120054380-003	Exon 9	p.C1285Lfs*8	Hétérozygote
JAM-001	Exon 1 à 9	Del SACS	Hétérozygote
Témoin			

**Tableau 10 : Récapitulatif des individus pour lesquels une biopsie de peau pour une culture de fibroblastes a été réalisée**

## 2. Mise en culture

Les biopsies de peau ont été nettoyées du tissu adipeux restant avant d'être hachées finement. Les petits morceaux sont placés sur le fond d'une boîte de Petri de 10 cm de diamètre. Deux ml de milieu de culture DMEM ont été ajoutés par boîte, puis celles-ci sont placées à l'étuve à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture n'a pas été changé avant 8 jours et les boîtes de Petri ont été manipulées très doucement afin de ne pas décrocher les explants. Après un mois et demi, les fibroblastes présents ont été incubés en présence de trypsine pour les décrocher de la boîte de Petri, et placés dans une flasque T75 cm<sup>2</sup> pour entretien.

## B) Cultures de fibroblastes et de cellules HeLa

### 1. Conditions de culture cellulaire

Les cellules en culture ont été entretenues dans du milieu de culture complet : DMEM (Gibco de Life Technologies) complété par 10% de sérum de veau foetal (SVF, Gibco) et 1% de pénicilline-streptomycine (PS, Gibco).

### 2. Congélation et décongélation

Pour la congélation, les cellules ont été traitées comme pour un passage. Après avoir été centrifugées à 1200 rpm pendant 5 min, les cellules ont alors été resuspendues dans 1 ml de milieu de congélation (DMEM avec 12,5% de DMSO et de SFV), placées dans un cryotube et conservées pendant 24h dans une boîte de congélation à -80°C avant d'être stockées à long terme dans de l'azote liquide. Pour la décongélation, les cryotubes sont placés dans un bûcher d'eau chauffée à 37°C. Le contenu du cryotube repris avec 5 ml de DMEM chaud et centrifugé à 1200 rpm pendant 5 min. Puis le culot a été resuspendu dans 10 ml de milieu et placé dans une flasque T75. Les flasques ont été mises en culture à l'étuve.

### 3. Entretien des cellules

Lorsque les cellules sont arrivées à confluence dans une flasque, un passage a été réalisé. Pour le passage, le milieu de culture a été enlevé et la flasque nettoyée avec du DPBS 1X (Gibco). Les cellules sont alors traitées avec 2 ml de Trypsine-EDTA 1X (Gibco) pendant 3 minutes à 37°C. L'effet de la trypsine qui décroche les cellules de la surface de la flasque a été contrôlé au microscope avant d'ajouter du milieu de culture pour désactiver la trypsine qui est nocive pour les cellules à long terme. Les cellules sont transférées dans un tube de 15 ml pour être centrifugées à 1200 rpm pendant 5 min. Le culot a été repris dans 10 ml de milieu complet et une dilution de 1/10 a été transférée dans une nouvelle flasque pour continuer la culture. Le reste de la suspension cellulaire a été utilisé pour l'ensemencement nécessaire aux expériences ou congelé.

## *IV] Etude des protéines*

### A) Profils protéiques

#### 1. Extraction protéique

Les cellules ont été trypsinées et centrifugées pendant 5 min à 1200 rpm. Le culot cellulaire a été repris avec 1 ml de DPBS 1X + 0,1% d'inhibiteur de phosphatase 100X (Ph, Sigma) + 1% d'inhibiteur de protéase 100X (Pi, Sigma) froid, puis centrifugé à 2500 rpm pendant 5 min. Le culot a ensuite été resuspendu avec 100 µl d'une solution de lyse composée de 350 mM de sucrose + 1 mM d'EDTA + 10 mM de Tris-HCL à pH 7.4 (solution que nous avons nommée par la suite « prep mito ») auxquels ont été ajoutés 0,5% de Pi et 0,1% de Ph. L'échantillon a ensuite été lysé au sonicateur pendant 15 min à 45 % d'amplitude. L'échantillon obtenu a été centrifugé pendant 5 min à 2100 rpm. L'absence de culot indique que la lyse est complète, l'échantillon a été dosé au Nanodrop avant d'être stocké à -20°C.

#### 2. Western blot

Les échantillons protéiques ont été utilisés à une concentration de 20 µg/ml dans du tampon de dénaturation constitué de tampon Laemmli 2X avec 20% de Dithiothréitol (DTT-Sigma). Les volumes prélevés sont équivalents afin d'avoir un tampon Laemmli à 1X. Cette préparation a été chauffée à 96°C pendant 5 min.

Les protéines extraites ont été séparées par migration d'1h environ sur gel pré-coulé 4-20% (Biorad) ou sur un gel pré-coulé NuPAGE 3-8% Bis Acétate (Invitrogen) pour la saccine. Les protéines ont ensuite été transférées pendant 1h30 sur une membrane de PVDF (Fluorure de PolyVinylidène, Biorad). La membrane a ensuite été saturée pendant 30 minutes dans une solution de TBS (Tris Borate Sodium) + 0,05% de Tween + 3% de Blotting Grade Blocker (Biorad), puis incubée sur la nuit à 4°C, avec les anticorps primaires spécifiques dilués dans cette même solution (TBS-T 0,05%). Le lendemain, après plusieurs lavages avec une solution de TBS-T 0,05%, la membrane a été incubée 1h à température ambiante, avec les anticorps secondaires anti-espèce couplés à la HRP (Horse Radish Peroxydase, Biorad). De nouveaux lavages de la membrane ont été réalisés avant la révélation avec le kit ECL pico et/ou ECL femto (Thermo Scientific). Les images obtenues par le Chemidoc (Biorad) ont ensuite été

quantifiées à l'aide du logiciel Image Lab (Biorad) et les mesures ont été normalisées sur celles d'une protéine ubiquitaire de contrôle. Toutes les conditions sont résumées dans le tableau 11.

### 3. Fractionnement Subcellulaire

Les cellules ont étéensemencées dans une boîte de Petri 150 mm et entretenues jusqu'à un état de confluence de 70-80%. Elles ont ensuite été décollées mécaniquement et centrifugées pendant 5 min à 1200 rpm à 4°C. Le culot cellulaire, lavé dans une solution de DPBS 1X + 1% de Pi + 0,1% de Ph, a été centrifugé de nouveau pendant 5 min à 2500 rpm à 4°C. La solution prep mito, additionnée de 0,5% de Pi et 1% de Ph, a été ajoutée à 100 fois le volume du culot. Le culot a ainsi été repris dans une seringue 26G par 17 allers retours. Cinquante microlitres de cette première solution ont été récupérés, correspondant à la fraction de cellules lysées totale. Le reste de la solution a subi une série de centrifugations afin de récupérer la fraction cytosolique et la fraction mitochondriale (figure 27).

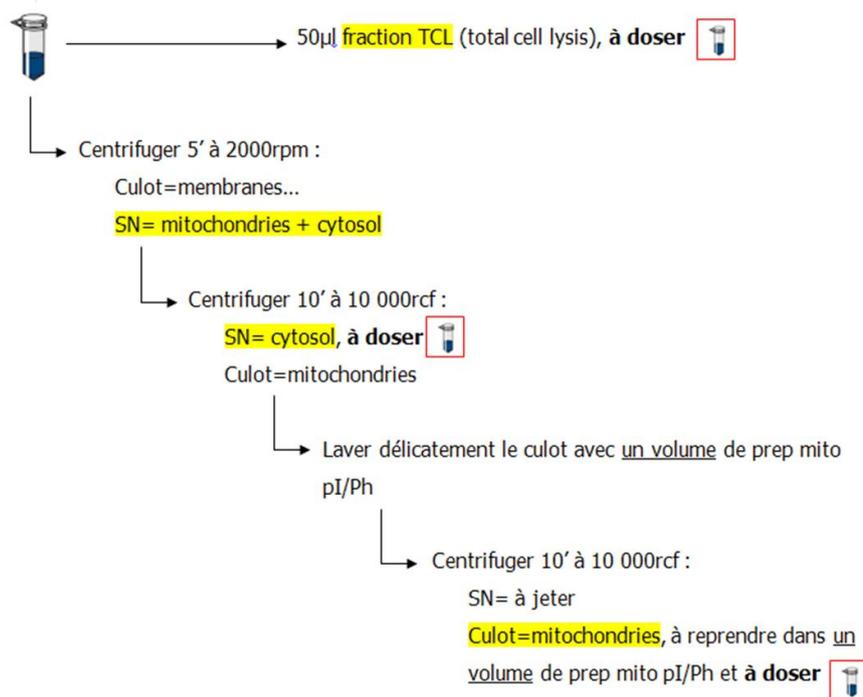


Figure 27: Centrifugation différentielle de fractionnement subcellulaire

## B) Immunofluorescence

Les cellules ont étéensemencées dans une chambre de culture Lab-Tek (Nunc) à raison de 20 000 cellules par chambre de 250 µL grâce à un comptage des cellules sur une cellule de Malassez. Le lendemain, les cellules, fixées pendant 30 minutes dans du DPBS 1X + 3% de PFA (Paraformaldéhyde), ont ensuite été perméabilisées et saturées dans une solution de DPBS 1X + 0,3% de triton + 3% de NGS (Natural Goat Serum). Entre chaque incubation, des lavages ont été réalisés avec du DPBS 1X. Les protéines étudiées ont été marquées grâce à des couples d'anticorps primaires (1 h à température ambiante) et secondaires couplés à un Alexa anti-espèce spécifiques (45 min à température ambiante) dilués dans du DPBS 1X + triton 0,3% + NGS 3%. Les chambres de culture ont ensuite été enlevées et le montage de la lame avec une lamelle a été réalisé avec du milieu de montage Pro Long Gold, avec ou sans Dapi (Invitrogen). Avant l'analyse, les lames doivent rester à plat et à 4°C pendant 12 h. Toutes les concentrations d'anticorps ont été résumées dans le tableau 10. Pour le marquage de la protéine sarsine, la solution au NGS a été remplacée par de la BSA (albumine bovine sérique), et une étape supplémentaire de traitement à l'acide formique 80% pendant 3 min a été réalisée après la perméabilisation.

Protéines	Utilisation	Fournisseurs	Anticorps primaire	Anticorps secondaire	Temps de révélation ECL+ Espèce de l'anticorps primaire
Sarsine N-terminal	WB IF	Santa Cruz sc-49724	1/100 1/50	1/2000 1/250	3 min Chèvre
Sarsine C-terminal	WB IF	Santa Cruz sc-49721	1/100 1/50	1/2000 1/250	3 min Chèvre
Sarsine F1	WB IF	Santa Cruz sc-365585	1/50	1/250	3 min Souris
DRP1	WB IF	Santa Cruz sc-32898	1/500	1/5000 1/500	3 min Lapin
LC3B	WB IF	Abcam ab-51520	1/500	1/5000 1/500	3 min Lapin
Tom20	WB IF	Santa Cruz sc-11415	1/500	1/5000 1/500	3 min Lapin
LDHA	WB	Santa Cruz sc-27230	1/500	1/5000	3 min Chèvre
P62	WB IF	Abcam ab-56788	1/500	1/5000 1/500	3 min Souris
Actine β1	WB	Sigma A1978	1/20 000	1/5000	3 min Souris

**Tableau 11: Conditions retenues pour les expériences de Western blot et d'immunocytochimie**

Les anticorps secondaires utilisés pour le western blot sont des anticorps couplés à la HRP. Ceux utilisés pour l'IF sont couplés à un Alexa (488 pour le vert, 568 pour le rouge et 430 pour le bleu).

## V] Etude des mitochondries

### A) Morphologie mitochondriale

#### 1. MitoTracker®

Les cellules de témoins et des patients ont étéensemencées dans une chambre de culture Lab-Tek 2 puits à raison de 10 000 cellules par puits. Afin de conserver des cellules isolées, le marquage avec la solution de MitoTracker® à 100 nM final a été réalisé sur des cellules non confluentes. Les cellules ont été mises à l'étuve pendant 15 min avant d'être lavées au DPBS 1X. À chaque expérience a été associé un témoin. L'observation des cellules a été faite avec un microscope à fluorescence (ZEISS) et la mesure des mitochondries a été réalisée à l'aide du logiciel Image J. Une vingtaine de photos ont été prises, et l'intensité globale de fluorescence par cellule a été mesurée. L'ensemble des valeurs a été traité sur un tableau Excel. La moyenne permet d'obtenir une mesure de la masse globale du réseau mitochondrial.

#### 2. TMRM

Les cellules de témoins et des patients ont étéensemencées dans une chambre de culture Lab-Tek 2 puits à raison de 10 000 cellules par puits. Le potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) a été mesuré par la quantification de la fluorescence du tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM, Invitrogen) comme décrit par Chazotte *et al.* en 2011<sup>107</sup>. Une concentration finale de 5 nM a été utilisée. Le TMRM est une sonde sensible au potentiel de membrane qui est généré par la phosphorylation oxydative de la mitochondrie et par conséquent utilisé comme un indicateur de la fonction mitochondriale<sup>108,109</sup>. La sonde a été ajoutée dans le milieu de culture sur les cellules, incubée à 37°C pendant 20 minutes. Les cellules ont ensuite été lavées au DPBS 1X et la fluorescence a été quantifiée à l'aide du logiciel Image J.

### B) Analyse de l'ADN mitochondrial

La PCR quantitative a été réalisée en utilisant le même système que celui décrit précédemment (cf : I.C.4). Les amorces ont été sélectionnées à partir de séquences humaines spécifiques (ADN mitochondrial, ENSG00000211459 ; ADN nucléaire, NR\_003286).

Les séquences des amorces utilisées pour l'ADN mitochondrial sont issues de l'ARN ribosomique 12S : mtF3212 (5'-CACCCAAGAACAGGGTTTGT-3') et mtR3319 (5'-TGGCCATGGGTATGTTGTTAA-3'). Celles pour l'ADN nucléaire sont issues de l'ARN ribosomique 18S : 18S1546F (5'-TAGAGGGACAAGTGGCGTTC-3') et 18S1650R (5'-CGCTGAGCCAGTCA-GTGT-3').

Toutes les amorces ont été testées sur gel d'électrophorèse et courbe de fusion afin de confirmer l'amplification correcte d'un seul fragment d'ADNc à la taille attendue. Les efficacités de la PCR quantitative ont été évaluées en utilisant l'ADNc extrait de cellules HeLa et de fibroblastes témoins. La mesure de la quantité d'ADNmt a été réalisée comme décrit par Gianotti *et al.* en 2008<sup>110</sup>.

### C) Respiration mitochondriale

Les cellules en culture ont été trypsinées et comptées. Une solution de  $10^6$  cellules par ml a été utilisée pour une lecture sur l'oxygraphe d'Hansateck *via* le logiciel Oxygraphe+. Trois lectures par expérience de chaque individu testé ont été réalisées. Sur le graphe obtenu, la vitesse de respiration basale des cellules testées en moles d'O<sup>2</sup>/ml/min correspondant à la mesure de la pente.

### VI] Analyses statistiques

Les statistiques ont été réalisées par un test de Student (t-test), avec une distribution unilatérale et de variance égale. Les étoiles indiquent la significativité des données (\*\*\*,  $p < 0,001$  ; \*\*,  $p < 0,01$  ; \*,  $p < 0,05$ ). L'erreur standard de la moyenne (SEM) a été utilisée.

# Résultats

**Partie I :**  
**Identification de nouvelles mutations**  
**dans le gène *SACS***

ARSACS étant une maladie de transmission AR, son diagnostic suppose que le malade doit être porteur de deux mutations dans *SACS*, à l'état homozygote (hm) ou hétérozygote composite (hc). Un variant est appelé mutation lorsqu'il est avéré qu'il a un impact délétère sur la fonction de la protéine codée. Les substitutions d'acides aminés ne conduisent pas toutes à un effet drastique et sont alors appelées des variants de signification clinique incertaine (*Variant of Uncertain clinical Significance, VUS*). Les variants identifiés sont habituellement catégorisés selon la classification des VUS élaborée par Plon et *al.*, en 2008<sup>111</sup>. Cette classification est basée sur les critères de prédiction *in silico*, et différencie les variants selon 5 degrés de pathogénicité<sup>30</sup> :

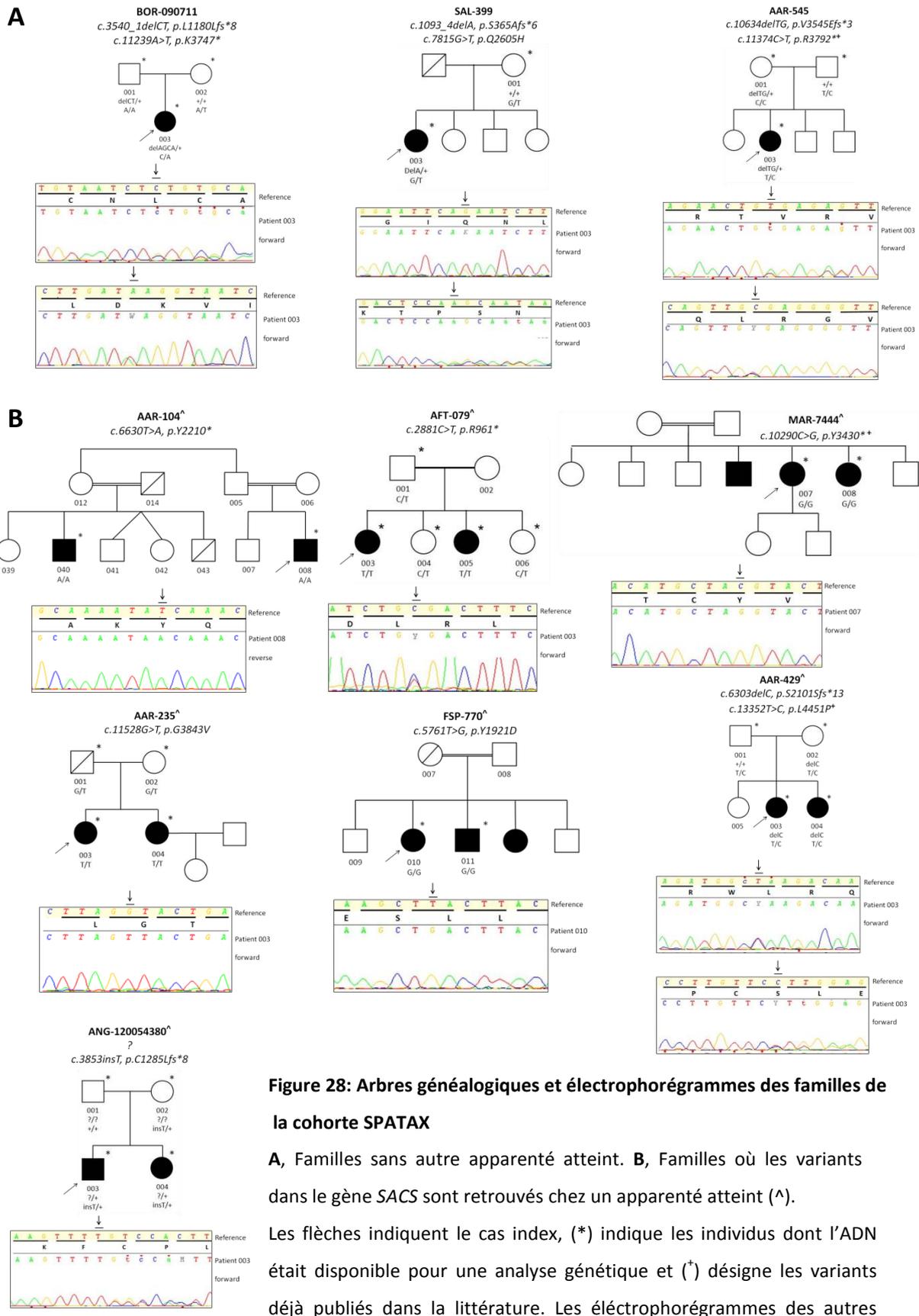
- La classe 1 concerne les variants silencieux (changement nucléotidique sans modification de l'acide aminé)
- La classe 2 rassemble les variants faux-sens (substitution de l'acide aminé) qui ne sont pas prédits pathogènes
- La classe 3 correspond aux variants faux-sens dont la prédiction de pathogénicité est controversée selon les différents logiciels de prédiction
- La classe 4 concerne les variants faux-sens qui sont prédits pathogènes
- La classe 5 concerne les variants tronquants, non sens ou insertion-délétion (création d'un codon stop prématuré)

## A] Projet SPATAX

La collaboration entre le laboratoire MRGM et le réseau européen et méditerranéen des dégénérescences spinocérébelleuses (SPATAX) a permis le recrutement de 321 patients pour une analyse du gène *SACS* au cours des 6 dernières années.

L'ADN de ces 321 patients a été séquencé en utilisant la technique de séquençage direct en Sanger. Nous avons identifié 60 variants différents, non répertoriés comme polymorphismes dans les bases de données, dans *SACS* chez 50 patients soit 15% de la cohorte analysée (50/321). Pour 17 patients, les variants sont à l'état hm, 16 patients présentent des mutations à l'état hc et 17 patients ont un seul variant hétérozygote (ht). Lorsque l'ADN des parents était disponible, la ségrégation familiale a été vérifiée. La figure 28 décrit les 10

familles analysées qui montrent une ségrégation des variants dans la famille et/ou pour lesquelles les variants ont également été retrouvés chez un apparenté symptomatique.



**Figure 28: Arbres généalogiques et électrophorèmes des familles de la cohorte SPATAX**

**A**, Familles sans autre apparenté atteint. **B**, Familles où les variants dans le gène SACS sont retrouvés chez un apparenté atteint (<sup>^</sup>). Les flèches indiquent le cas index, (\*) indique les individus dont l'ADN était disponible pour une analyse génétique et (\*\*) désigne les variants déjà publiés dans la littérature. Les électrophorèmes des autres patients SPATAX ont été présentés en annexe 2.

Parmi les 60 variants retrouvés nous avons identifié :

- 29 variants tronquants
- 1 variant d'épissage
- 25 variants faux-sens
- 5 variants silencieux

### **1) Variants tronquants**

Nous avons identifiés 12 variants non-sens et 17 insertions ou délétions de nucléotide(s), modifiant le cadre de lecture et entraînant l'apparition d'un codon stop plusieurs nucléotides après la mutation.

Ces deux types de variants provoquent l'interruption prématurée de la traduction du fait de la présence d'un codon stop prématuré ou PTC (Premature Termination Codon). Il a été décrit que lorsque le PTC est à plus de 50 nucléotides en amont du dernier intron, l'ARN messenger (ARNm) n'est alors pas traduit car il est dégradé par le système de dégradation NMD (Nonsense Mediated mRNA Decay). Il arrive toutefois qu'une petite quantité de ces ARNm soit traduite. La protéine tronquée produite n'est alors pas fonctionnelle et parfois dégradée par le système du protéasome.

Ces 29 variants tronquants ont été retrouvés :

- chez 8 patients à l'état hm (tableau 12)
- chez 6 patients à l'état hc associé à un autre variant tronquant (tableau 12)
- chez 10 patients à l'état hc associé à un variant non tronquant (tableau 13)
- chez 1 patient à l'état ht (tableau 13)

Deux mutations, R961\* et Y2210\* ont été identifiées à l'état hm et à l'état hc. Tous les variants tronquants sont des VUS classe 5 avec un effet drastique attendu sur la protéine et donc une altération de son fonctionnement. Ils ont donc tous été considérés comme de réelles mutations de SACS. Les 29 mutations identifiées sont réparties sur l'ensemble des domaines protéiques. Pour tous les patients porteurs de deux VUS de classe 5, à l'état hm ou hc, nous avons confirmé moléculairement le diagnostic d'ARSACS (n=14/321). Par contre, l'état hétérozygote du VUS classe 5 identifié chez le patient ANG-120054380-003 ne permet pas de poser le diagnostic d'ARSACS pour lui.

Code famille	Exon	Changement		Protéique	Domaine	Classe de pathogénicité
		Génomique				
Variants tronquants hm						
AAD-366	2	c.106G>T		p.E36*	Ub	Classe 5
AAR-270	7	c.625delG		p.G209Vfs*6	sr1/SRR1	Classe 5
AAR-330	9	c.2850insA		p.L950Lfs*20	srX/SIRPT1	Classe 5
AFT-079	9	c.2881C>T		p.R961*	srX/SIRPT1	Classe 5
AAR-321	9	c.5920G>T		p.E1974*	SIRPT2	Classe 5
AAR-104	9	c.6630T>C		p.Y2210*	SIRPT2	Classe 5
MAR-7444	9	c.10290C>G <sup>+</sup>		p.Y3430*	srX/SIRPT3	Classe 5
AAR-509	9	c.11601delACAA		p.K3867Nfs*1	sr/SIRPT3	Classe 5
Deux variants tronquants hc						
AAR-601	5	c.428delTT		p.L143Lfs*10	sr1/SRR1	Classe 5
	9	c.13066C>T		p.Q4356*	/	Classe 5
AAR-246	9	c.3328insA		p.I1110Nfs*1	srX/SIRPT1	Classe 5
		c.12925G>T		p.E4309*	/	Classe 5
BOR-090711	9	c.3540delCT		p.L1180Lfs*7	SIRPT1	Classe 5
		c.11239A>T		p.K3747*	sr3/SIRPT3	Classe 5
AAR-225	9	c.4933C<T		p.R1645*	sr1/SSR2	Classe 5
		c.5008delTATT		p.Y1671Lfs*20	sr1/SSR2	Classe 5
AUS-553090795	9	c.5764delTTAC		p.L1922Rfs*2	sr2/SSR2	Classe 5
		c.6948delCCAAATGCTGCTACAA		p.T2316Nfs*6	sr3/SIRPT2	Classe 5
AAR-545	9	c.10634delTG		p.V3545Efs*3	srX/SIRPT3	Classe 5
		c.11374C>T <sup>+</sup>		p.R3792*	sr3/SIRPT3	Classe 5

**Tableau 12: Récapitulatif des variants tronquants à l'état homozygote (hm) ou hétérozygote composite (hc)**

Le domaine protéique touché par chaque variant a été identifié suivant la description publiée par Romano *et al.*, 2012<sup>54</sup>. (\*) a été ajouté à un variant lorsque celui-ci a été précédemment publié. Les classes de pathogénicité ont été identifiées suivant la classification de Synofzik *et al.*, 2013<sup>30</sup>.

Code famille	Exon	Changement		Modification d'		Conservation de l'acide aminé substitué	Domaine	Classe de pathogénicité
		Génomique	Protéique	ESE	Epissage			
Variants tronquants hc								
AAR-230	5+	c.457+3A>C	NA	NA	Oui	NA	/	Classe 5
	9	c.6356C<T <sup>+</sup>	p.R2119*	NA	NA	NA	SIRPT2	Classe 5
AAR-410	7	c.826C>T <sup>+</sup>	p.R276C	Oui	Non	Très conservé (11/11)	sr1/SRR1	Classe 4
	9	c.13319C>A	p.S4440*	NA	NA	NA	/	Classe 5
SAL-399	7	c.1093delA	p.S365Afs*6	NA	Non	NA	SIRPT1	Classe 5
	9	c.7815G>T	p.Q2605H	Oui	NA	Très conservé (12/12)	sr1/SRR3	Classe 4
AAR-334	9	c.2881C>T	p.R961*	NA	NA	NA	srX/SIRPT1	Classe 5
		c.8108G>A <sup>+</sup>	p.R2703H	Non	Non	Très conservé (12/12)	sr1/SRR3	Classe 4
AAD-399	9	c.4718T>G	p.M1573R	Oui	Non	Très conservé (11/12)	sr1/SRR2	Classe 2
		c.8227delC	p.H2743Tfs*10	NA	NA	NA	sr1/SRR3	Classe 5
SAL-491	9	c.4749C>G <sup>+</sup>	p.P1583R	Oui	Non	Très conservé (12/12)	sr1/SRR2	Classe 4
		c.6098insT	p.V2033Vfs*5	NA	NA	NA	SIRPT2	Classe 5
AFT-068	9	c.6166delT	p.F2056Ffs*21	NA	NA	NA	SIRPT2	Classe 5
		c.6650C>A	p.P2217Q	Oui	Non	Très conservé (12/12)	SIRPT2	Classe 4
AAR-429	9	c.6303delC	p.S2101Sfs*13	NA	NA	NA	SIRPT2	Classe 5
		c.13352T>C <sup>+</sup>	p.L4451P	Non	Non	Très conservé (12/12)	HEPN	Classe 4
FSP-084	9	c.6630T<A	p.Y2210*	NA	NA	NA	sr2/SRR3	Classe 5
		c.8546C>T	p.P2849L	Oui	Non	Très conservé (12/12)	sr2/SRR3	Classe 4
FSP-1171	9	c.7274G>C	p.R2425P	Oui	NA	Très conservé (12/12)	sr3/SIRPT2	Classe 4
		c.11265delAT	p.I3755Mfs*7	NA	Non	NA	sr3/SIRPT3	Classe 5
Variant tronquant ht								
ANG-120054380	9	c.3853_insT	p.C1285Lfs*8	NA	NA	Très conservé (12/12)	Sr3/SIRPT1	Classe 5

**Tableau 13: Récapitulatif des variants tronquants à l'état hétérozygote composite (hc) et hétérozygote (ht)**

Pour chaque variant faux-sens identifié, une analyse des modifications des ESE, des sites de l'épissage a été réalisée. La conservation de l'acide aminé modifié a été testée sur 12 espèces animales.

## **2) Variant d'épissage**

Un variant d'épissage a été identifié chez le patient AAR-230-005 modifiant le score d'épissage du site donneur de l'exon 5, c.457+3A>C (score à 0,57 contre 1 chez un individu sain, obtenu avec le logiciel Splice Site Prediction). D'après les prédictions de pathogénicité données par le logiciel Mutation Taster, cette modification de l'épissage était délétère, en faisant un VUS de classe 5. Des analyses sur l'ARNm de ce patient auraient permis de déterminer l'effet de la mutation sur l'épissage de l'ARNm (rétention d'un intron ou épissage d'un exon), mais le matériel nécessaire n'était malheureusement pas disponible.

Ce patient étant de plus porteur d'une mutation tronquante (VUS classe 5), le diagnostic d'ARSACS a été retenu.

## **3) Variants faux-sens**

Les 25 autres variants identifiés sont des faux-sens qui entraînent la substitution d'un acide aminé par un autre. Parmi lesquels nous avons trouvé :

- 7 variants à l'état hm (tableau 14)
- 8 variants hc associés à un variant tronquant (tableau 13)
- 10 variants ht (tableau 14)

Code famille	Exon	Changement		Modification d'		Conservation de l'acide aminé substitué	Domaine	Classe de pathogénicité
		Génomique	Protéique	ESE	Epissage			
<i>Variants faux-sens homozygotes</i>								
AAR-456	7	c.815G>A <sup>+</sup>	p.R272H	Non	Non	Très conservé (11/11)	sr1/SSR1	Classe 4
AAR-269	7	c.815G>A <sup>+</sup>	p.R272H	Non	Non	Très conservé (11/11)	sr1/SSR1	Classe 4
AAR-437	7	c.815G>A <sup>+</sup>	p.R272H	Non	Non	Très conservé (11/11)	sr1/SSR1	Classe 4
AAR-242	7	c.1537A>G	p.I513V	Non	Non	Très conservé (9/11)	sr2/SSR1	Classe 2
AAR-1168	9	c.3932T>A <sup>+</sup>	p.M1311K	Non	Non	Très conservé (11/12)	sr3/SIRPT1	Classe 4
AAR-770	9	c.5761T>G	p.Y1921D	Oui	Non	Très conservé (12/12)	sr2/SSR2	Classe 4
AAR-519	9	c.6296C>T	p.P2099L	Oui	Non	Très conservé (12/12)	SIRPT2	Classe 4
AAR-599	9	c.8108G>A <sup>+</sup>	p.R2703H	Non	Non	Très conservé (12/12)	sr1/SRR3	Classe 4
AAR-235	9	c.11528G>T	p.G3843V	Oui	Non	Très conservé (12/12)	sr3/SIRPT3	Classe 4
<i>Variants faux-sens hétérozygotes</i>								
AAD-095	7	c.844C>G	p.L282V	Oui	Non	Très conservé (11/11)	sr1/SRR1	Classe 3
STR-1074	7	c.1257A>G	p.I419V	Oui	Non	Peu conservé (5/11)	sr2/SRR1	Classe 2
AAR-180	9	c.2270G>A	p.G757D	Oui	Non	Très conservé (10/12)	srX/SIRPT1	Classe 2
FSP-626	9	c.2414G>A	p.R805K	Oui	Non	Conservé (8/12)	srX/SIRPT1	Classe 2
AAR-338	9	c.4211A>C	p.K1404T	Non	Non	Très conservé (12/12)	/	Classe 3
FSP-559	9	c.4398T>G	p.N1466K	Oui	Non	Très conservé (12/12)	sr1/SRR2	Classe 2
AAR-092	9	c.9232A>G	p.N3078D	Oui	Non	Très conservé (10/12)	SIRPT3	Classe 2
FSP-039	9	c.9359G>A	p.R3120H	Oui	Non	Très conservé (12/12)	srX/SIRPT3	Classe 2
FSP-1614	9	c.9359G>A	p.R3120H	Oui	Non	Très conservé (12/12)	srX/SIRPT3	Classe 2
AAR-256	9	c.9439G>A	p.E3147K	Non	Non	Très conservé (11/12)	srX/SIRPT3	Classe 3
AAR-211	9	c.13475T>G	p.I4486S	Oui	Non	Très conservé (10/12)	HEPN	Classe 4

**Tableau 14: Récapitulatif des variants faux-sens homozygotes et hétérozygotes**

Les variants faux-sens sont plus difficilement interprétables puisque leurs conséquences au niveau fonctionnel sur la protéine restent incertaines. Les sites de prédiction *in silico* sont des outils incontournables pour obtenir des indications soit sur l'importance fonctionnelle d'une séquence, soit sur le motif régulateur potentiellement perturbé. Le résultat de ces analyses détermine le degré de pathogénicité de chaque variant faux-sens.

Nous avons utilisé en première intention les sites de prédiction Polyphen-2, Mutation taster, SIFT et Provean, qui indiquent le caractère délétère ou toléré du variant. Ces prédictions sont basées sur l'utilisation de banques de données des mutations et polymorphismes publiés et sur les propriétés physico-chimiques des acides aminés substitués.

Ensuite, nous avons utilisé l'alignement de séquence du logiciel CLUSTAL W qui utilise un algorithme de comparaison de séquence global. Il permet d'obtenir un score de similitude et de vérifier la conservation de l'acide aminé impliqué, au cours de l'évolution, dans une douzaine d'espèces sélectionnées du règne animal.

Enfin, nous avons vérifié la modification d'éléments dit activateurs d'épissage (ESE) et des scores d'épissage en utilisant les logiciels ESE finder 3.0 et Splice Site Prediction, respectivement. Brièvement, un site potentiel est défini par une séquence contenant 'n'

nucléotides. Pour chaque position 'n', un poids est donné à chaque nucléotide, basé sur la fréquence du nucléotide et l'importance de sa position au sein de la séquence. La force du site est calculée par la somme des poids de chaque nucléotide<sup>112</sup>. Les résultats obtenus après la comparaison des séquences sauvages et mutées, indiquent la potentielle création ou abolition de sites ESE ou d'épissage.

Dans notre étude, toutes les substitutions sont absentes de la base de données 1000 Génomes, et les résidus sont tous hautement conservés durant l'évolution, sauf les acides aminés p.I419 et p.R805 qui apparaissent faiblement conservés (5/11 et 8/12 respectivement). Aucun de ces variants n'affecte le score d'épissage alors que le score d'ESE est modifié pour 18 VUS de classe 2 à 4 (tableau 13 et tableau 14).

Globalement, parmi les 25 variants faux-sens, 14 sont prédits délétères (VUS de classe 4), 3 sont de pathogénicité incertaine (VUS de classe 3) et 8 sont probablement non pathogènes (VUS de classe 2).

Nous avons identifié un variant faux-sens hm, p.R272H, au sein de 3 familles différentes. Le variant p.R2703H a été identifié une fois à l'état hm et une fois à l'état hc associé à la mutation tronquante R961\*.

Le diagnostic d'ARSACS a été validé chez les patients porteurs d'un variant faux-sens de type VUS classe 4 associé à une mutation tronquante (n=8/321) ou d'un variant faux-sens de classe 4 à l'état hm (n=8/321). Les patients porteurs d'un seul variant faux-sens, toutes classes VUS confondues, ont à ce stade été considérés comme non-atteints d'ARSACS (n=11/321), ainsi que le patient AAR-242-003 porteur d'un variant faux-sens de classe 2 à l'état hm et le patient AAD-399-077 porteur d'une mutation tronquante associée à un variant de classe 2.

#### ***4) Variants silencieux***

Cinq autres variants sont des variants silencieux et appartiennent à la classe 1 de la classification VUS (tableau 15).

Code famille	Exon	Changement		Modification d'		Domaine	Classe de pathogénicité
		Génomique	Protéique	ESE	Epissage		
<i>Variants silencieux ht</i>							
FSP-150	6	c.591C>T	p.V197V	Non	Non	sr1/SIRPT1	Classe 1
AAR-328	7	c.930G>T	p.L310L	Oui	Non	sr1/SIRPT1	Classe 1
FSP-711	7	c.1990G>T	p.L663L	Non	Non	srX/SIRPT1	Classe 1
AAD-796	9	c.7122G>A	p.L2374L	Oui	Non	sr3/SIRPT2	Classe 1
AAR-352	9	c.8142G>A <sup>+</sup>	p.S2714S	Oui	Non	sr1/SIRPT3	Classe 1

**Tableau 15: Récapitulatif des nouveaux polymorphismes identifiés dans SACS**

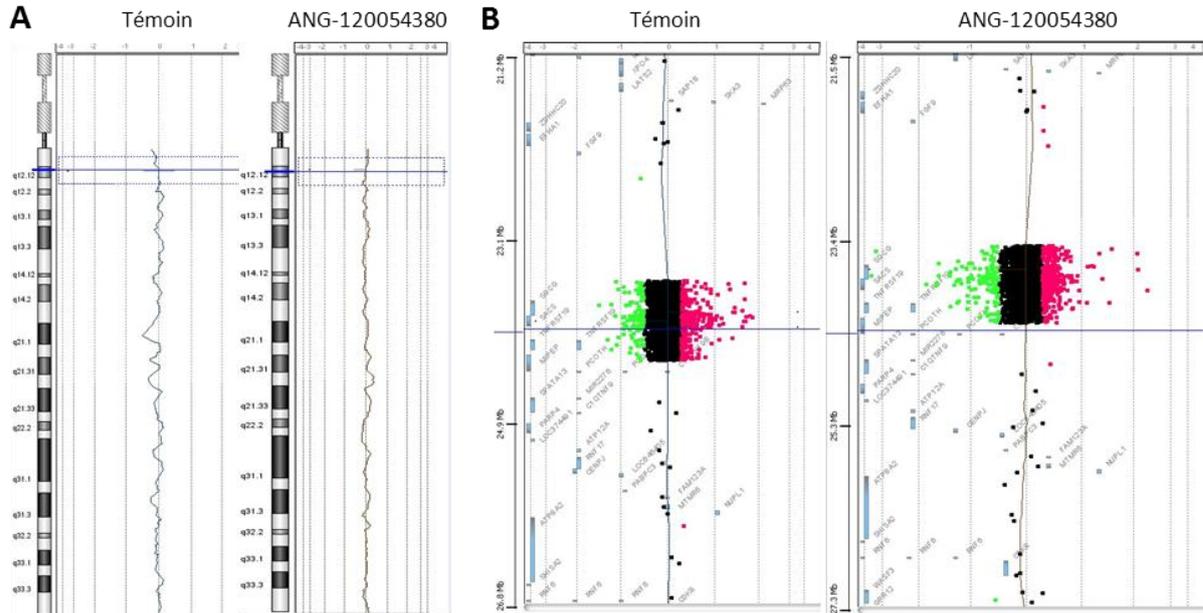
Ce type de variant est généralement considéré comme un polymorphisme. De plus, ils sont présents à l'état ht. Par conséquent, les patients porteurs de ces variants silencieux de SACS ne peuvent pas être classés comme ARSACS. L'analyse des ESE a pourtant indiqué une modification dans le cas de trois variants, p.L310L, p.L2374L et p.S2714S (tableau 15).

## **5) Analyses génétiques complémentaires**

### *5-a) Mutation tronquante ht*

Le patient ANG-120054380-003 a été identifié porteur d'une seule mutation tronquante à l'état ht. Des analyses de dosage génique, utilisant la technique de puce d'hybridation génomique comparative (CGH-array), ainsi que des analyses au niveau de l'ARN par RT-PCR ont été menées afin d'identifier la présence d'une délétion, d'une duplication ou d'une mutation intronique sur l'autre allèle du gène SACS.

Les résultats de CGH-array n'ont montré aucune différence entre le témoin et ce patient, permettant ainsi d'exclure une anomalie de dosage génique (figure 29). D'autre part, les analyses par RT-PCR n'ont là encore montré aucune différence entre témoin et patient, excluant une anomalie d'épissage (résultats non montrés). Lors du séquençage des fragments étudiés, la mutation tronquante a été retrouvée à l'état ht excluant l'hypothèse d'une dégradation de l'ARNm produit par le second allèle. La mutation tronquante unique est héritée de la mère et a également été identifiée chez la sœur atteinte du cas index. Le diagnostic d'ARSACS de cette famille sera rediscuté dans la discussion.



**Figure 29: Analyse par CGH-array sur puce à façon du patient ANG-120054380-003 porteur d'une seule mutation tronquante hétérozygote**

En **A**, la vue chromosomique. En **B**, un agrandissement de la région d'intérêt avec la représentation ponctiforme des différences amorces fixées sur la puce.

#### 5-b) Mutation faux-sens p.R272 récurrente

Au sein de trois familles d'origines géographiques différentes, nous avons identifié le même variant à l'état hm : la substitution du résidu arginine à la position 272 en histidine (c.815G>A ; p.R272H). Un variant affectant le même résidu a été décrit pour la première fois en 2010 dans une famille canadienne maritime : c.814C>T ; p.R272C<sup>41</sup>. En 2013, le variant c.815G>A ; p.R272H a déjà été identifié dans une famille italienne<sup>60</sup> avec la même substitution nucléotidique que dans nos 3 familles. Le fait de retrouver une même mutation dans plusieurs familles suggère un possible effet fondateur.

C'est justement par un effet fondateur que l'origine d'ARSACS a été expliquée dans la région québécoise du lac Saint-Jean. Dans le cas de nos trois familles et afin d'identifier si ce variant est causé par un effet fondateur, nous avons déterminé les haplotypes des trois patients grâce à une analyse des marqueurs microsatellites de la région (tableau 16). Les microsatellites sont des répétitions en tandem d'un motif court de 2 à 6 nucléotides, dispersés dans tout le génome et qui sont le siège de variations du nombre de répétitions à l'origine de polymorphismes multi-alléliques très informatifs. Dans le cas d'un effet

fondateur, tous les individus auraient un haplotype commun. Nous avons donc analysé 4 microsatellites qui encadrent le gène *SACS*, plus un marqueur intragénique localisé dans le premier intron, et constitué de répétitions GT que nous avons identifié.

L'analyse a montré l'absence d'un haplotype commun aux trois cas index, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse d'un effet fondateur lié à une mutation ancestrale.

	AAR-456-005	AAR-437-014	AAR-269-006
D13S232	118-118	106-106	118-118
SACS	233-233	235-235	232-232
D13S292	130-130	134-134	130-130
D13S787	256-256	253-253	256-256
D13S1243	253-253	255-255	250-253

**Tableau 16: Analyse des marqueurs microsatellites proches ou dans le gène *SACS* chez 3 patients présentant le même variant homozygote**

## B] Projet ATAXIC

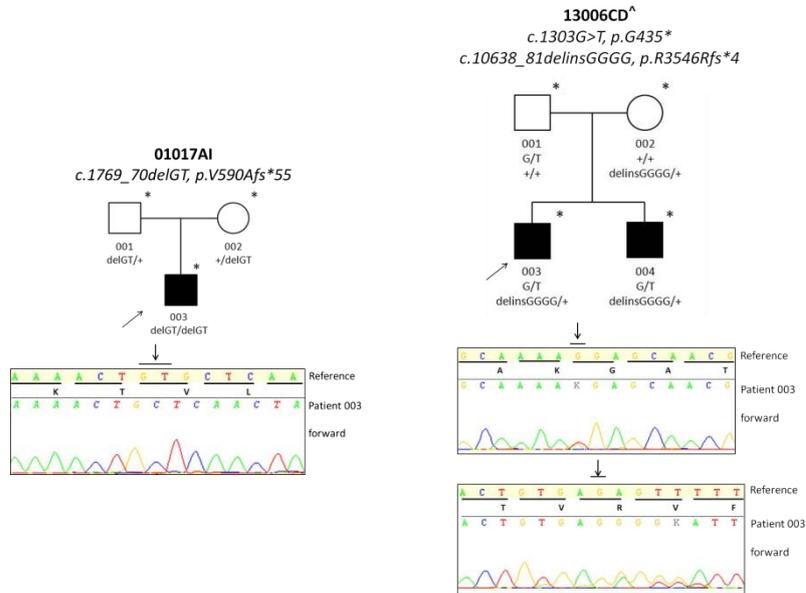
Sur les 156 patients inclus dans le PHRC « ATAXIC » ayant été analysés par NGS (NGS ciblé sur 35 gènes d'ataxie chez 144 patients et analyse d'exome pour les 12 autres), 5 patients se sont avérés porteurs de deux mutations dans le gène *SACS*. Nous avons confirmé les 6 mutations tronquantes (VUS classe 5) et le variant faux-sens p.A4469D (VUS classe 3) par séquençage direct Sanger (tableau 17). Le diagnostic d'ARSACS a été validé chez 4 patients tandis que le diagnostic reste incertain pour le patient 01023MO-003 porteur d'une mutation tronquante associée à un variant faux-sens de classe 3.

Code famille	Exon	Changement		Modification d'		Conservation de l'acide aminé substitué	Domaine	Classe de pathogénicité
		Génomique	Protéique	ESE	Epissage			
<i>Variants hm</i>								
01017AI	7	c.1769_70delGT	p.V590Afs*55	NA	NA	NA	SIRPT1	Classe 5
13003TL	9	c.4692G>C	p.Y1564*	NA	NA	NA	sr1/SIRPT2	Classe 5
<i>Variants hc</i>								
10012RB	7	c.1769_70delGT	c.V590Afs*55	NA	NA	NA	SIRPT1	Classe 5
	9	c.5151delA	c.K1717Nfs*8				sr1/SIRPT2	Classe 5
13006CD	7	c.1303G>T	p.G435*	NA	NA	NA	sr2/SIRPT1	Classe 5
	9	c.10638_681delinsGGGG	p.R3546Rfs*4				srX/SIRPT3	Classe 5
01023MO	9	c.13238_41delAGCA	p.Q4413Hfs*38	NA	NA	NA	/	Classe 5
		c.13406C>A	p.A4469D	Yes		Très conservé (12/12)	HEPN	Classe 3

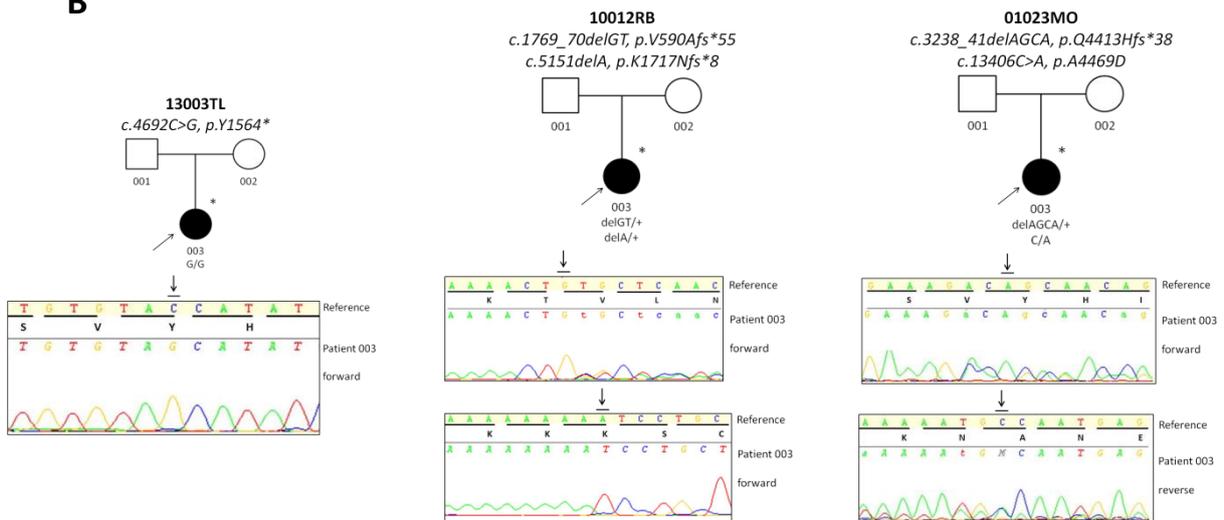
**Tableau 17: Récapitulatif des variants identifiés en NGS chez les 5 patients issus du projet ATAXIC et confirmés par la méthode Sanger**

La figure 30 montre l'étude de co-ségrégation dans les deux familles qui ont pu être analysées, ayant également conduit à poser un diagnostic ARSACS chez un apparenté atteint (13006CD-004).

**A**



**B**

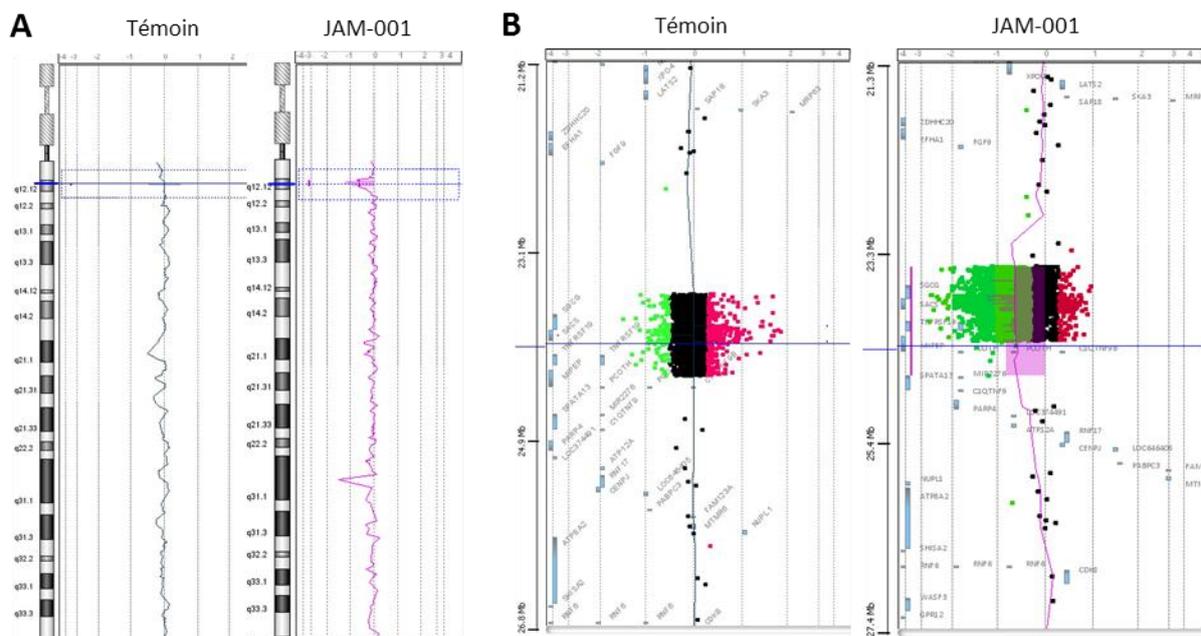


**Figure 30: Arbres généalogiques et électrophorégrammes des patients ATAXIC**

**A**, Familles où la co-ségrégation a été réalisée. **B**, Familles des 3 autres cas index. Les flèches indiquent le cas index et (\*) indique les individus dont l'ADN était disponible pour une analyse génétique.

### C] La patiente JAM-001

La patiente JAM-001 a été identifiée porteuse d'une large délétion ht par CGH-array pan-génomique. Avec notre puce à façon nous avons confirmé cette délétion ht (entre 1,17 et 2,65 Mb) emportant la totalité du gène *SACS* (figure 31). La ligne médiane est la représentation de la valeur égale à 0 et donc signifie qu'aucune anomalie n'est détectée (cas du témoin). Le pic rose encadré en bleu chez la patiente JAM-001 correspond à la détection d'une anomalie avec une valeur -0,5 soit une délétion (figure 10-A). Sur la figure 31-B, le cadre rose et les points verts indiquent la région délétée contenant le gène *SACS*. Chez la patiente JAM-001, aucune autre mutation n'a été mise en évidence par séquençage direct du 2<sup>ème</sup> allèle et aucune anomalie d'épissage de l'ARNm n'a été observée. L'étude de ségrégation familiale n'a pas pu être réalisée.



**Figure 31: Analyse par CGH-array sur puce à façon de la patiente JAM-001**

En **A**, la vue chromosomique montrant uniquement chez le cas JAM-001 une déviation de la ligne médiane correspondant à une délétion dans la région 13q12. En **B**, un agrandissement de la région anormale avec la représentation ponctiforme des différentes amorces fixées sur la puce.

## **Partie II :**

**Le compartiment mitochondrial : siège  
d'une fonction primaire de la saccine ?**

Le compartiment mitochondrial est classiquement étudié selon deux aspects :

- morphologique : en étudiant la forme et la quantité de mitochondries qui constituent le réseau mitochondrial.
- fonctionnel : en étudiant le fonctionnement de la chaîne respiratoire et des protéines impliquées.

Dans cette partie, nous avons essentiellement utilisé des cultures primaires de fibroblastes. Au total, 11 patients de notre étude et un individu contrôle ont accepté une biopsie de peau. Ces patients étaient porteurs de divers types de VUS (tableau 18).

Patients	Exon concerné	Mutation	VUS classe	Etat
MAR-7444-007	Exon 9	p.Y3430*	5	hm
BOR-090711-003	Exon 9	p.L1180Lfs*8	5	hc
		p.K3747*	5	
AAR-545-003	Exon 9	p.V3545Efs*3	5	hc
		p.R3792*	5	
AAR-437-014	Exon 7	p.R272H	4	hm
AAR-242-003	Exon 7	p.I513V	2	hm
AAR-519-001	Exon 9	p.P2099L	4	hm
AAR-334-009	Exon 9	p.R961*	5	hc
		p.R2703H	4	
AAR-601-019	Exon 5	p.L143Lfs*10	5	hc
	Exon 9	p.Q4356*	5	
AFT-068-005	Exon 9	p.F2056Ffs*21	5	hc
		p.P2217Q	4	
ANG-120054380-003	Exon 9	p.C1285Lfs*8	5	ht
Témoins				
JAM-001	Del SACS			ht

**Tableau 18: Biopsies de peau obtenues de 12 individus**

## A] Etude morphologique

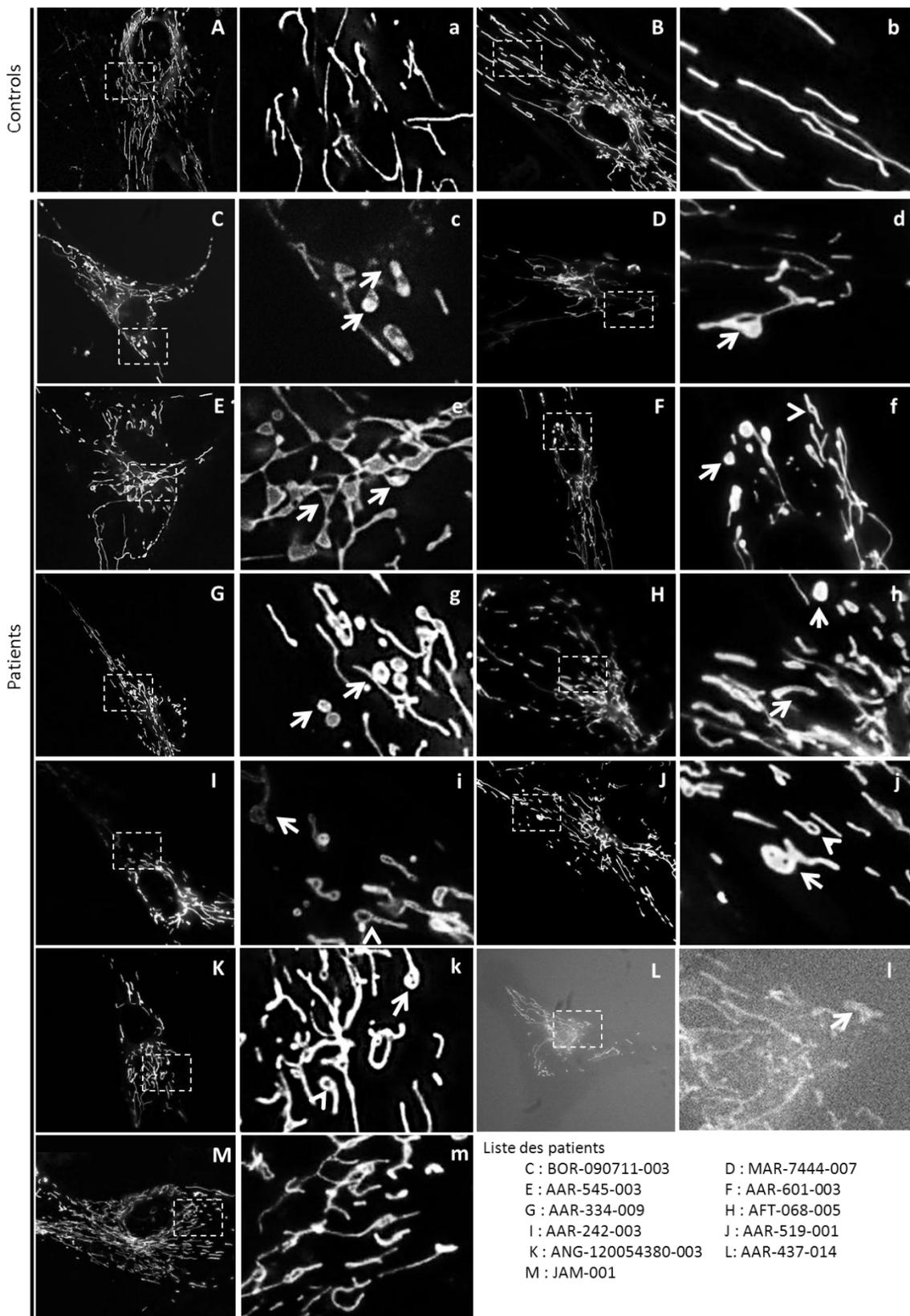
Dans un premier temps, nous avons étudié la morphologie du réseau mitochondrial en utilisant 3 types d'expériences :

- l'observation du réseau mitochondrial
- la quantification globale du réseau
- la quantification d'ADNmt.

### **1) Observation du réseau**

Les mitochondries des fibroblastes en culture ont été marquées par MitoTracker®, une sonde fluorescente. Cette sonde entre passivement dans les mitochondries des cellules,

s'accumule dans les mitochondries fonctionnelles où elle est oxydée pour devenir fluorescente. Après marquage, les cellules sont observées en microscopie. Des fibroblastes témoins ont été utilisés comme référence d'un réseau mitochondrial normal (figure 32-A-B). Pour 10 des patients analysés, le marquage par MitoTracker® indiquait un réseau mitochondrial altéré (figure 32-C-L). En effet, celui-ci semblait plus fusionné que chez le témoin avec la présence de mitochondries en forme de bulles ou de raquettes (figure 32-c-l). Par contre, aucune anomalie de morphologie du réseau n'a été observée sur les fibroblastes de la patiente JAM-001 (figure 32-M). Parmi les 10 patients dont les fibroblastes montraient des anomalies du réseau, une fluorescence extra-cellulaire lors du marquage au MitoTracker® a été remarquée chez le patient AAR-437-014, porteur de la mutation faux-sens récurrente p.R272H à l'état hm (figure 32-L).

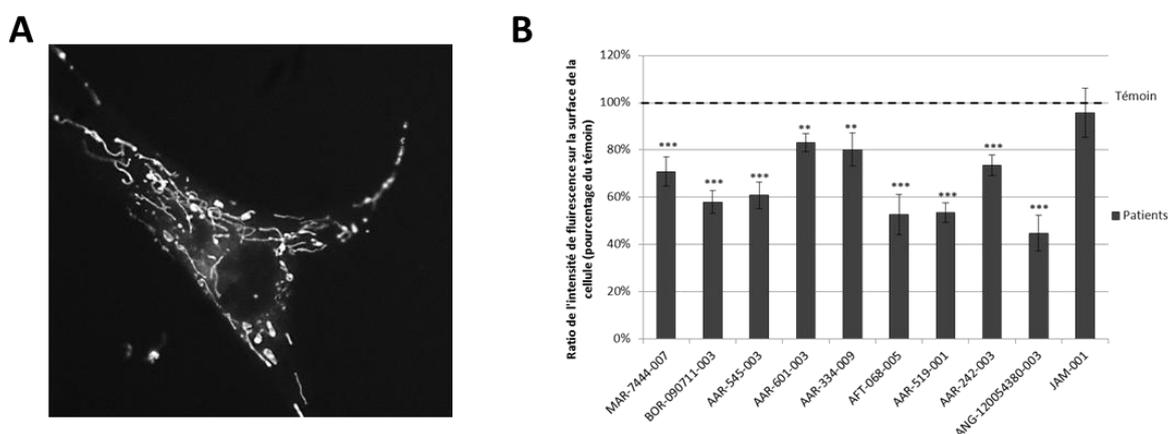


**Figure 32: Etude du réseau mitochondrial marqué par la sonde MitoTracker®**

Le réseau mitochondrial des fibroblastes en culture primaire de témoin (A-B) et des patients (C-M) a été visualisé par microscopie, après marquage au MitoTracker®. Les grossissements des images sont présentés (**a-m**) et des mitochondries « en raquette » et « en bulle » sont respectivement indiquées par une tête de flèche ou une flèche entière (n=3, >100cellules).

## 2) Quantification du réseau mitochondrial

L'analyse du réseau mitochondrial s'effectue par une mesure de la taille des tubules mitochondriaux, classés ensuite en 4 catégories en fonction de leur longueur. La morphologie du réseau mitochondrial étant anormale (hyperfusionnée) chez 10 patients, ce type de quantification n'était pas réalisable. De ce fait, nous avons quantifié la masse globale du réseau *via* la mesure de l'intensité de fluorescence de la cellule entière chez tous les patients, excepté le patient AAR-437-014 du fait de la fluorescence extra-cellulaire décrite précédemment (figure 33). Une diminution de la masse globale mitochondriale allant de 17 à 55% a été observée chez tous les patients en comparaison du témoin, sauf pour la patiente JAM-001.



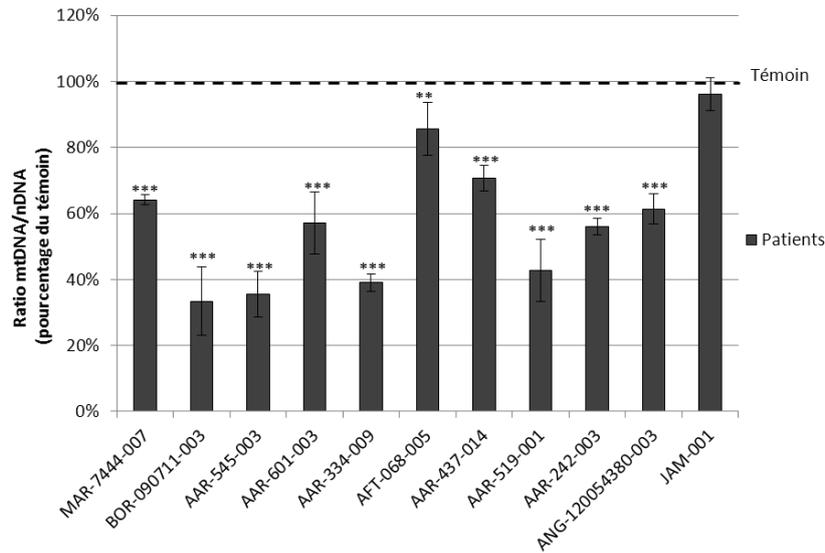
**Figure 33 : Quantification de la masse globale du réseau mitochondrial**

Les cellules du témoin et des patients (A) ont été marquées en utilisant le MitoTracker®. La surface de la cellule et l'intensité de fluorescence ont été mesurées sur dix patients et un témoin. La quantification a été réalisée avec le logiciel Image J. Le graphique (B) représente le pourcentage de la masse mitochondriale rapportée au témoin à 100% (n=3, >100 cellules ; pvalue \*\* < 0,01 ; \*\*\* < 0,001).

## 3) Mesure de la quantité d'ADN mitochondrial

La quantité d'ADN nucléaire a été utilisée comme référence, et nous avons mesuré le ratio ADN mitochondrial / ADN nucléaire (ADNmt/ADNn) chez les 11 patients. Ces deux types d'ADN sont différenciés et amplifiés à l'aide de deux couples d'amorces. L'ADNn et l'ADNmt ont été quantifiés en utilisant des amorces ciblant respectivement l'ARN ribosomique 18S et l'ARN ribosomique 12S (figure 34). Parmi les 11 patients étudiés, une diminution de quantité d'ADNmt allant de 14 à 67% a été mise en évidence chez tous les patients sauf chez la

patiente JAM-001. Ces résultats étaient en accord avec la diminution de masse globale mitochondriale observée en microscopie.



**Figure 34: Quantification de l'ADN mitochondrial par PCR quantitative**

Les rapports d'ADNmt / ADNn mesurés chez les patients sont rapportés au témoin (n=3, pvalue \*\* < 0,01 ; \*\*\* < 0,001).

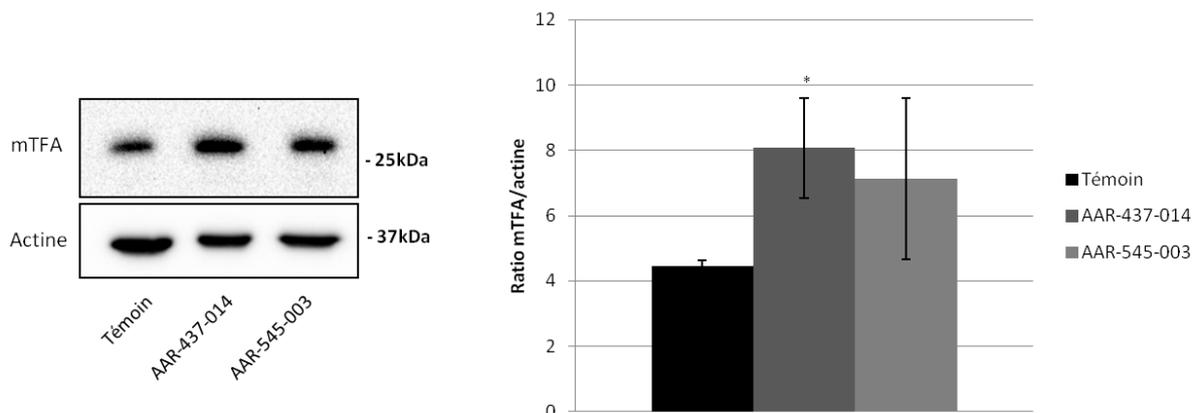
Nous avons observé des différences notables de la quantité d'ADNmt entre les patients. Pour ces expériences d'imagerie et de PCR quantitative, chaque culture de fibroblastes de patient a été comparée individuellement à celle du témoin. Par conséquent les différences observées pourraient s'expliquer par :

- un biais expérimental du aux fluctuations de culture
- l'hétérogénéité entre individus, c'est-à-dire une différence constitutionnelle de la quantité d'ADNmt endogène.

Cependant, il est important de noter que chaque expérience varie dans le même sens : une diminution d'ADN mitochondrial chez tous les patients étudiés sauf la patiente JAM-001.

Le nombre de copies d'ADN mitochondrial est régulé par un ensemble de facteurs de transcription. Un des facteurs primordiaux est le *Mitochondrial Transcription Factor A* (TFAM ou mTFA)<sup>113</sup>. Ce facteur de transcription mitochondrial est codé par le gène *TFAM* et se fixe au niveau des promoteurs de l'ADN mitochondrial pour aider à la transcription du génome mitochondrial. Au vu de son importance et de la diminution d'ADNmt observée en PCR

quantitative, nous avons quantifié cette protéine mTFA par Western Blot chez deux patients (AAR-437-014 et AAR-545-003), représentatifs des diminutions extrêmes d'ADNmt observées en qPCR. Nous avons observé une augmentation peu significative de la quantité de mTFA chez AAR-437-014 ( $50\% \pm 18$ ), et pas significative chez AAR-545-003 (figure 35). L'importance des écart-types nécessite de prévoir d'augmenter le nombre d'expériences avant de conclure sur les variations de ce facteur, même si les augmentations observées nous laissent penser que la diminution d'ADNmt ne serait pas directement liée à la quantité disponible du facteur de transcription.



**Figure 35: Quantification du facteur de transcription mTFA**

La quantité de mTFA est normalisée sur celle de l'actine (n=3, pvalue  $* < 0,05$ ).

## B] Etude fonctionnelle du réseau mitochondrial

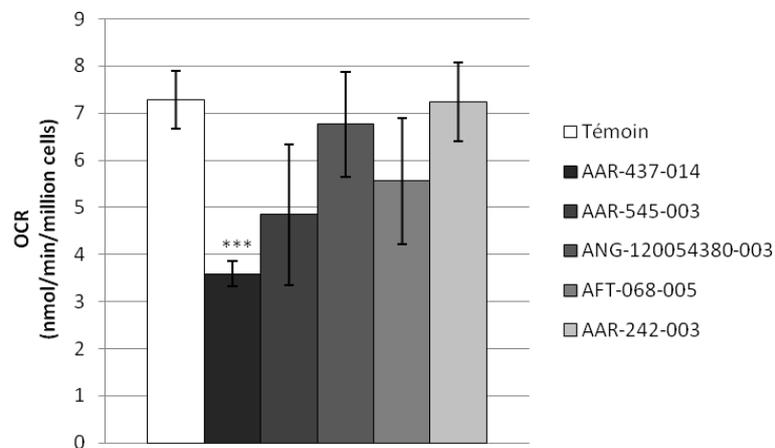
La fonction principale de la mitochondrie implique la chaîne respiratoire qui est dépendante du maintien structurel du réseau mitochondrial. Elle ne fonctionne qu'avec le gradient de protons et d'électrons contenus dans l'espace intermembranaire. Compte tenu des anomalies morphologiques observées, le fonctionnement pouvait être compromis chez les patients. Nous avons donc vérifié si le fonctionnement de la chaîne respiratoire était impacté.

### 1) Etude de la respiration

La respiration est une fonction primaire des mitochondries. Pour l'étudier, nous avons utilisé un système mono-cuve : l'oxygraphe. Pour obtenir une mesure de la respiration basale optimale, pour chaque expérimentation, les cellules d'un même patient sont analysées trois

fois par l'oxygraphe. Etant donné la grande quantité de cellules nécessaires à cette étude, à ce jour, seuls cinq patients ont pu être analysés (figure 35). Presque tous les types de mutations sont représentées : une mutation faux-sens hm récurrente (AAR-437-014) et non récurrente (AAR-242-003), deux mutations tronquantes hc (AAR-545-003), deux mutations hc (tronquante et faux-sens) (AFT-068-005) et une mutation tronquante ht (ANG-120054380-003).

Aucun des patients ne semblait présenter d'anomalie de la respiration mitochondriale, excepté le patient AAR-437-014, porteur de la mutation hm récurrente p.R272H. Cependant des expériences supplémentaires seront nécessaires, à la fois sur ces patients afin de confirmer ces résultats, mais aussi sur les 5 patients restants. Pour le patient AAR-437-014, nous avons observé une diminution de capacité respiratoire de  $51\% \pm 5$  comparée au témoin. Pour rappel, ce même patient présentait également un profil différent lors du marquage au MitoTracker®. Ces résultats suggéraient l'existence d'une anomalie fonctionnelle mitochondriale uniquement chez ce patient.



**Figure 36: Analyse de la respiration mitochondriale chez 5 patients**

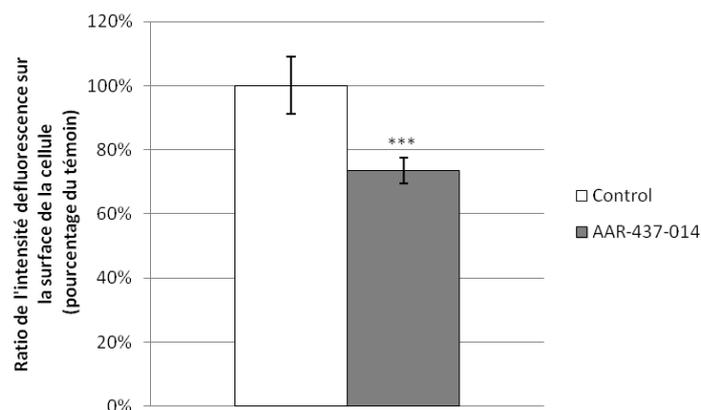
Une concentration cellulaire de  $10^6$ /ml est placée dans la cuve de l'oxygraphe. Au cours d'une expérience, 3 lectures sont réalisées par condition. La vitesse de respiration endogène (oxygen consumption rate, OCR) a été mesurée (n=3 sauf AAR-437-014, n=6, pvalue \*\*\* < 0,001).

Dans le cadre de cette étude, nous n'avons pas eu la possibilité d'explorer plus précisément cette voie respiratoire et notamment de déterminer, chez le patient AAR-437-014, quel(s) complexe(s) de la chaîne respiratoire est (sont) altéré(s). Pour cela des expériences

supplémentaires, avec des drogues inhibitrices spécifiques de chaque complexe de la chaîne respiratoire, telles que le malonate pour le complexe II<sup>114</sup> ou encore l'oligomycine pour le complexe V (l'ATP synthase)<sup>115</sup> par exemple, pourront être menées.

## 2) Etude TMRM

La fluorescence extra-cellulaire remarquée chez le patient AAR-437-014 lors du marquage au MitoTracker® (figure 32-L) pouvant être le signe de la sortie secondaire de la sonde hors des cellules, une anomalie du potentiel de membrane mitochondrial qui régit l'import et l'export de molécules au sein de l'espace inter-membranaire des mitochondries a été recherchée en utilisant une autre sonde fluorescente : le tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM). Contrairement au MitoTracker®, cette sonde entre dans les mitochondries en fonction du potentiel de membrane mitochondrial et y reste séquestrée. En cas de dépolarisation mitochondriale, il est observé une diminution de la fluorescence due à la libération du TMRM hors de la matrice mitochondriale. L'incorporation du TMRM était plus faible de 30%  $\pm$  4 chez le patient AAR-437-014 comparé au témoin (figure 37). Ce résultat était en faveur d'une anomalie du potentiel de membrane et suggérait une anomalie fonctionnelle des mitochondries. Le marquage au TMRM a également été réalisé sur deux autres patients (BOR-090711-003 et AFT-068-005) mais aucune anomalie n'a été mise en évidence (données non montrées).



**Figure 37: Quantification du TMRM chez le patient AAR-437-014**

Mesure en pourcentage de l'intégration de la sonde TMRM dans les fibroblastes du patient AAR-437-014 comparé au témoin (n=3, >100 cellules ; pvalue <0,001).

## C] Mécanistique de la fonction mitochondriale de saccine

Tous les résultats suivants constituent des données préliminaires puisque les expériences sont à répéter, ces travaux ayant débuté récemment.

### **1) Validation des outils d'immunomarquage**

Nous n'avons pas eu accès à l'anticorps dirigé contre la saccine (Ac-Saccine) utilisé dans la publication princeps<sup>40</sup> qui avait été produit par les auteurs, et avons testé trois anticorps commerciaux. Chaque anticorps a un épitope ciblant une zone différente de la saccine : Sacs N-ter est un anticorps polyclonal ciblant un épitope proche de la partie N-terminale de la protéine, tandis que Sacs C-ter est un anticorps polyclonal ciblant la partie C-terminale de la protéine, et enfin Sacs F1 a un épitope au niveau interne de la protéine (acides aminés 781-1080).

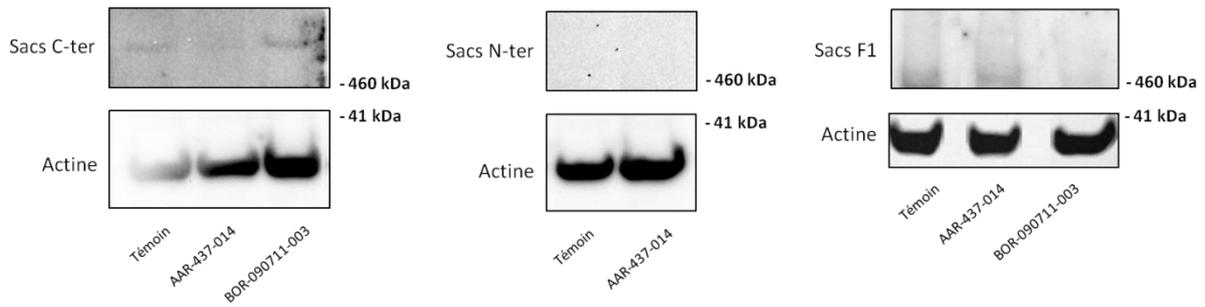
#### 1-a) par Western Blot

Nous avons réalisé un Western blot à partir d'extraits protéiques de fibroblastes en culture. La protéine saccine a un poids moléculaire de 520 kDa. Pour obtenir une résolution suffisante et espérer pouvoir révéler la protéine d'intérêt, nous avons opté pour la technologie NuPage d'Invitrogen avec des gels 3-8% Bis-Acétate.

Nous avons utilisé trois échantillons protéiques différents extraits :

- Des fibroblastes témoins, censés exprimer la protéine saccine native
- Des fibroblastes du patient AAR-437-014, porteur d'une mutation faux-sens homozygote, exprimant a priori une protéine mutée
- Des fibroblastes du patient BOR-090711-003, porteur de deux mutations tronquantes hc.

Un signal correspondant à la taille attendue, *i.e* 520 kDa, a été détecté avec l'anticorps Sacs C-ter. Cependant ce signal est également présent chez le patient BOR-090711-003 porteur d'une mutation tronquante mettant en doute la fiabilité de l'anticorps. Pour les anticorps Sacs N-ter et Sacs F1, aucun marquage n'a été observé (malgré une concentration élevée d'anticorps) (figure 38).

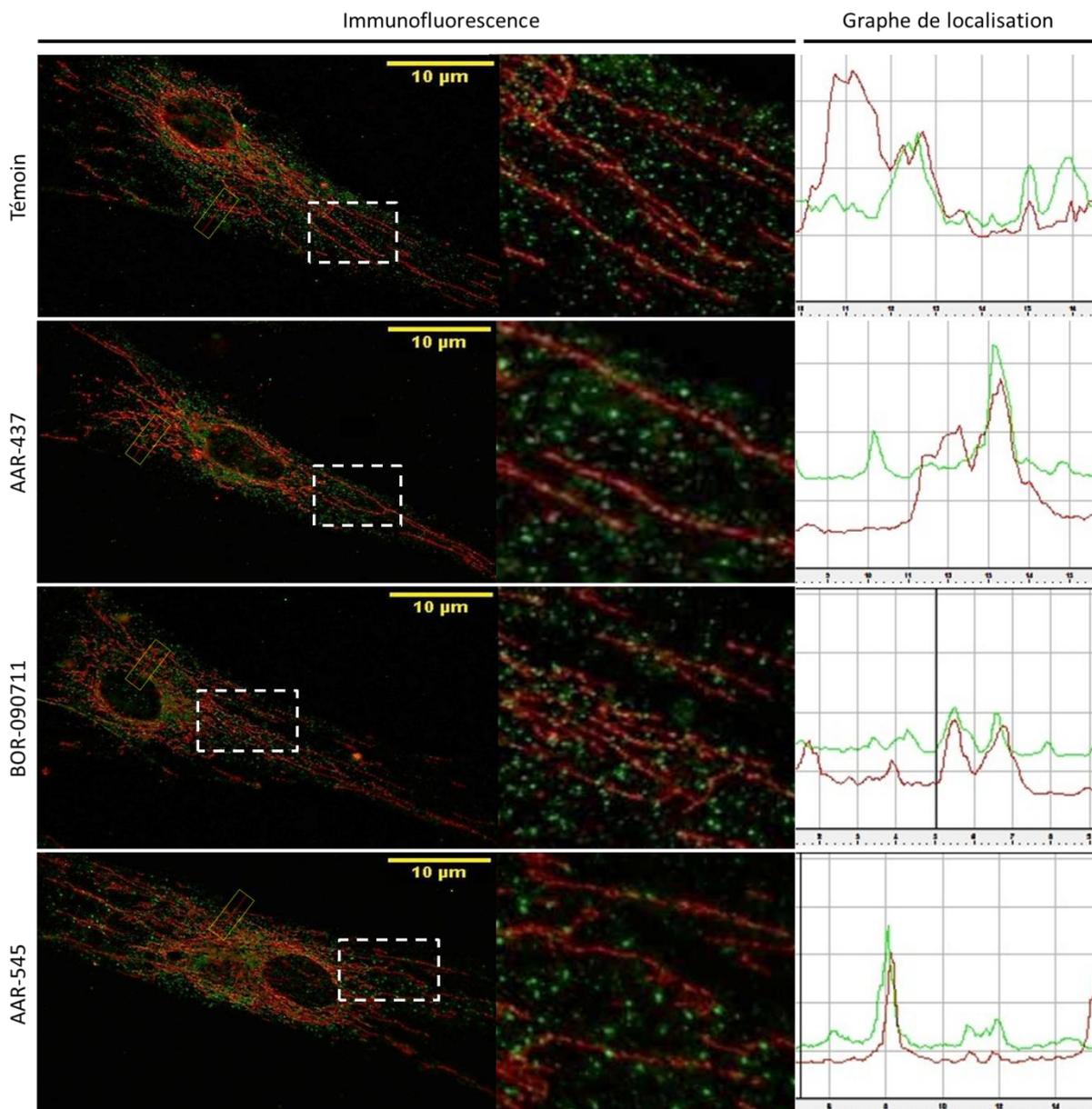


**Figure 38: Western Blot de la saccine avec les trois anticorps commerciaux**

Les trois Western Blot ont été réalisés sur des membranes différentes. La quantité de protéine déposée est de 80 µg par puits. L'actine a été utilisée comme protéine de référence et la saccine a été ciblée par les 3 anticorps commerciaux (C-ter, N-ter et F1).

### 1-b) par Immunofluorescence

Le compartiment mitochondrial a été marqué en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine Tom20, une translocase spécifique de la membrane externe de la mitochondrie. Sur les trois patients testés (AAR-437-0014, BOR-090711-003 et AAR-545-003), nous avons observé une superposition des signaux rouges et verts qui témoignent d'une co-localisation entre la saccine et la mitochondrie (figure 39). Le coefficient de Pearson est un outil mathématique permettant de mesurer la qualité de la co-localisation observé en imagerie. Ce coefficient a une échelle de 0 (pour aucune co-localisation) à 1 (pour une co-localisation parfaite). Les anticorps dirigés contre la saccine (Sacs N-ter et Sacs F1) ont montré une co-localisation partielle avec la mitochondrie (coefficient de Pearson à 0,7). Nous avons reproduit ainsi sur notre modèle les résultats obtenus précédemment<sup>40</sup>.



**Figure 39 : Localisation intracellulaire de la saccine dans les fibroblastes de patients**

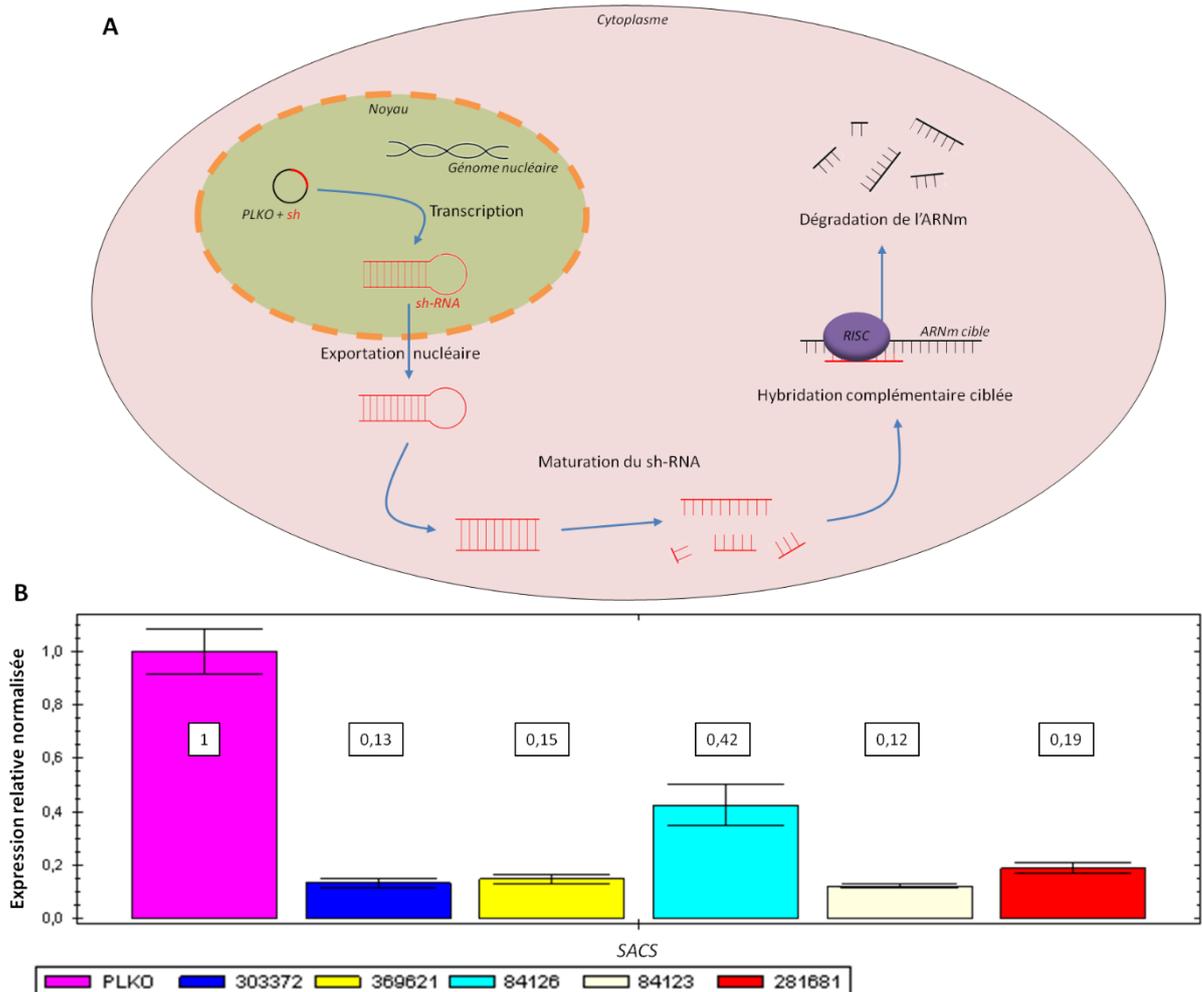
En immunofluorescence, la protéine saccine est marquée en vert (Ac SACS F1) et la protéine mitochondriale Tom20 est marquée en rouge (Ac Tom20). Sur la droite, les graphes de localisation permettent la visualisation de chaque marquage fluorescent par une ligne de couleur (zone observée au niveau du cadre jaune). Lorsque les deux signaux se superposent une co-localisation du signal est démontrée. La co-localisation de la saccine est mesurée *via* Image J (n=3, >100 cellules).

## **2) Production de cellules saccine déficientes**

Des expériences d'inactivation du gène *SACS* par des sh-RNA ont été entreprises. Les sh-RNA possèdent une structure caractéristique en tige-boucle, permettant une interférence avec

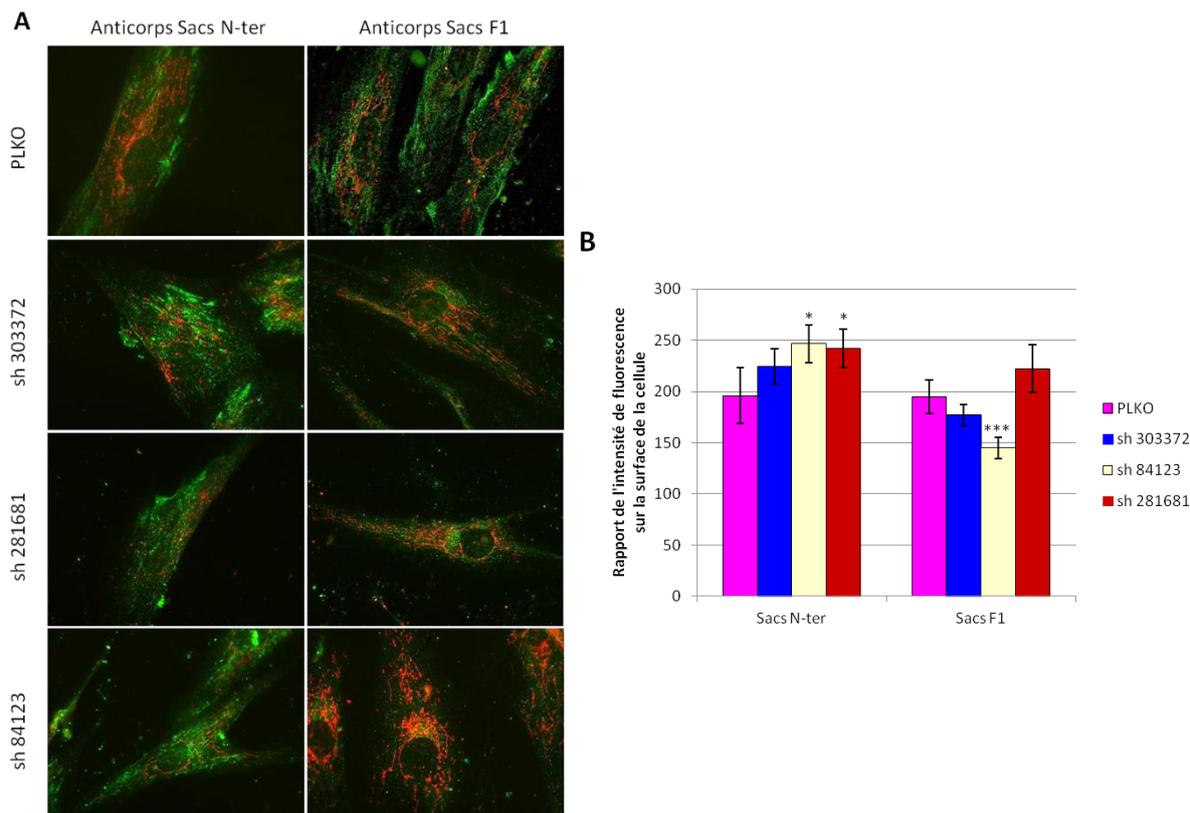
l'ARNm cible. Le sh-RNA est transcrit dans le noyau et s'hybride, dans le cytoplasme, à sa séquence complémentaire cible. Le complexe formé va être détecté par le mécanisme de dégradation des ARN double brin faisant intervenir le système RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) (figure 40-A). Le sh-RNA entraîne donc la dégradation de l'ARNm et la perte d'expression de la protéine.

Cinq sh-RNA ont été sélectionnés et transfectés dans des fibroblastes témoins. Leur efficacité d'inhibition et de dégradation des ARNm cibles ont été testées par PCR quantitative (figure 40-B). Les résultats obtenus démontrent que les 5 sh-RNA sont efficaces, les taux d'inhibition variant de 58 à 88%.



**Figure 40: Inhibition de l'expression du gène SACS via l'utilisation de 5 sh-RNA par PCR quantitative**  
**A**, schématisation de la production et du mode d'action des sh-RNA. **B**, le vecteur vide PLKO a été utilisé comme témoin d'expression de la saccine endogène. Les gènes de référence GusB et RPLP0 ont été utilisés pour normaliser les résultats. Les chiffres encadrés indiquent le niveau d'expression relative du gène en présence du sh-RNA.

Le vecteur vide et les trois sh-RNA présentant parmi les meilleures efficacités d'inhibition, (sh-84123, sh-303372 et sh-281681), ont été utilisés pour la transfection des fibroblastes témoins (figure 41-A). Les plasmides utilisés possèdent un gène de résistance à la puromycine qui permet de sélectionner les cellules transfectées. Nous n'avons pas constaté de diminution du signal de la saccine en présence des sh-RNA 303372, 84123 et 281681 après marquage avec l'anticorps Sacs N-ter. Avec l'anticorps Sacs F1, nous observons une diminution du signal avec les sh 303372 et 84123 (figure 41-B).



**Figure 41: Quantification par immunofluorescence de la saccine dans les fibroblastes témoins transfectés avec le vecteur vide ou un sh-RNA**

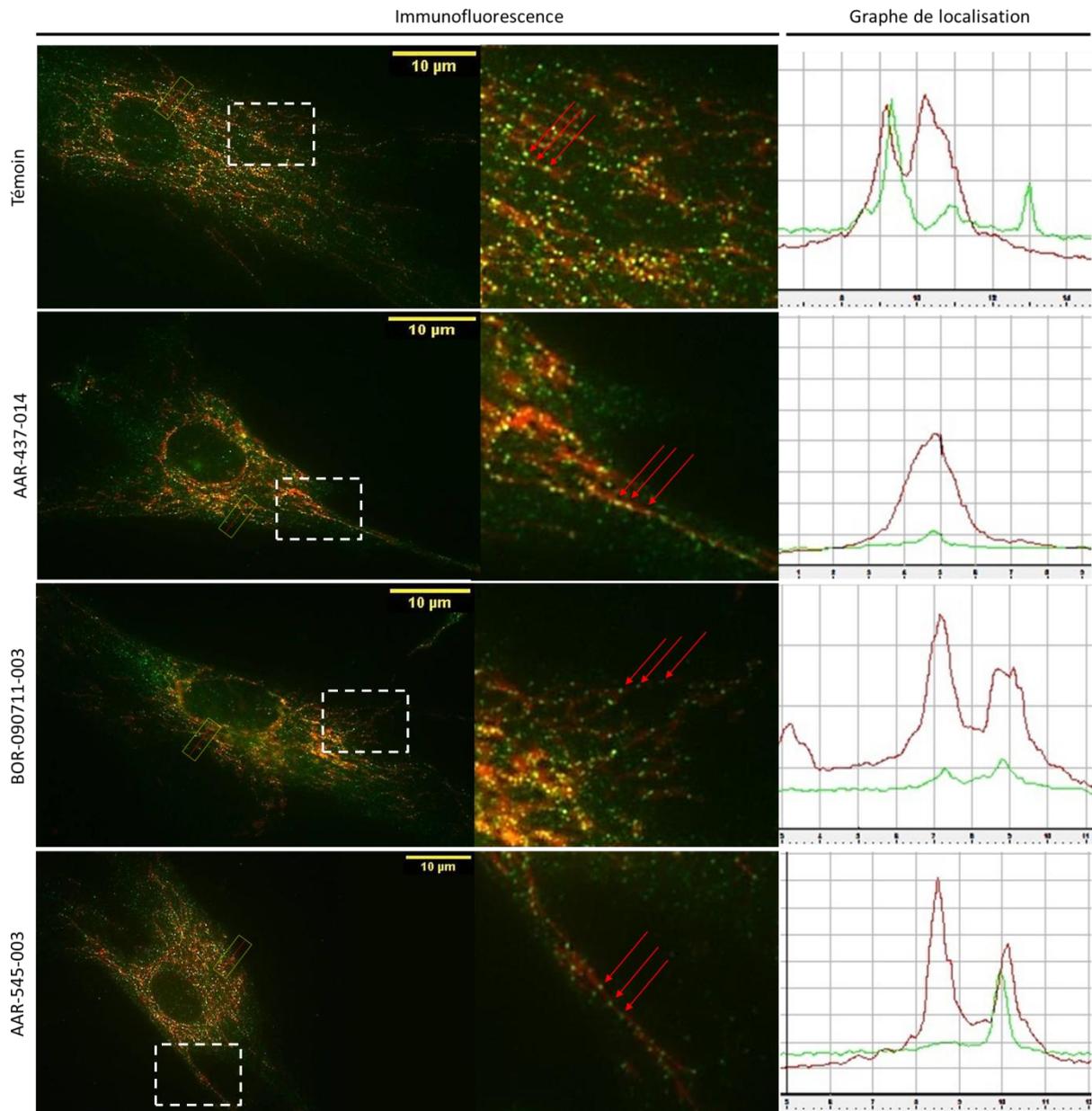
**A**, les anticorps dirigés contre la saccine sont marqués en vert. La mitochondrie, marquée en rouge avec l'anticorps anti-Tom20, est utilisée comme témoin expérimental. Des fibroblastes témoins sans transfection ont été utilisés comme témoins de toxicité de la transfection. **B**, la quantification de l'intensité de fluorescence ramenée à la taille de la cellule a été réalisée avec le logiciel Image J (n=2, >20 cellules pvalue \* < 0,05 ; \*\*\* < 0,001).

Le sh 84123 montrait le plus fort taux d'inhibition en qPCR (88%). Un effet plus important sur la diminution de détection de la saccine par IF a bien été observé. Pour assurer une inhibition plus marquée en IF, un mélange de 5 sh-RNA différents pourra être testé.

L'utilisation de l'anticorps Sacs N-ter n'est pas validée et l'anticorps Sacs F1 semble spécifique. Nos résultats de localisation partielle de la saccine à la mitochondrie avec l'anticorps Sacs F1 ont donc été confirmés et semblent superposables aux données publiées.

### ***3) Anomalie de la fission mitochondriale***

Le recrutement de DRP1 au niveau du réseau mitochondrial est nécessaire à la fragmentation du réseau mitochondrial. Chez nos patients (AAR-437-014, AAR-545-003 et BOR-090711-003) nous n'avons pas mis en évidence d'anomalie de localisation de DRP1 à la mitochondrie par immunofluorescence (coefficient de Pearson à 0,75) (figure 42). Ceci suggérait que l'absence de la saccine ou une saccine mutée n'empêche pas DRP1 d'être recrutée à la mitochondrie.

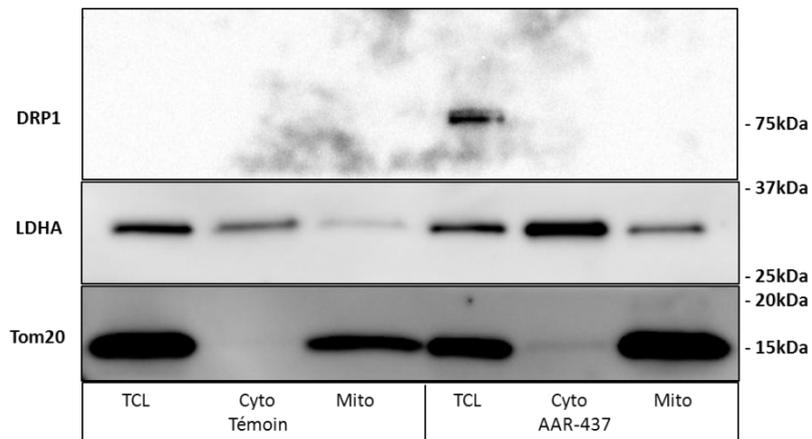


**Figure 42: Analyse par immunofluorescence de la localisation subcellulaire de DRP1**

En immunofluorescence, la protéine DRP1 (Ac DLP1) est marquée en vert et la mitochondrie est visualisée *via* le marquage en rouge de Tom20 (Ac Tom20). Les flèches rouges indiquent 3 signaux de DRP1 localisés sur un tubule mitochondrial. Sur la droite, les graphes de localisation permettent la visualisation de chaque marquage fluorescent par une ligne de couleur. Lorsque les deux signaux se superposent une co-localisation du signal est démontrée. La co-localisation de DRP1 à la mitochondrie a été mesurée *via* Image J (n=3, >100 cellules).

La distribution quantitative de DRP1 entre le cytosol et la mitochondrie est connue dans la littérature pour être environ à 30% au niveau des sites de constriction sur les tubules mitochondriaux<sup>116</sup>. Nous avons voulu tester si le pourcentage de distribution était modifié

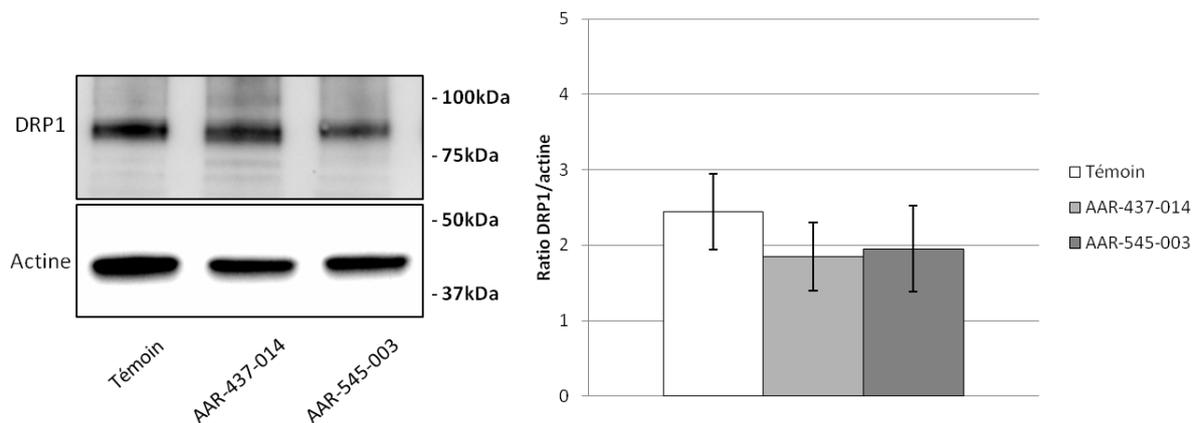
chez nos patients par des études de fractionnement subcellulaire (figure 43). Nous n'avons pas obtenu de signal DRP1 chez le témoin dans les fractions totales, cytoplasmique et mitochondriale.



**Figure 43: Fractionnement subcellulaire sur les fibroblastes des patients**

20 µg de protéines issues de la fraction cellulaire totale (TCL), de la fraction cytosolique (Cyto) et de la fraction mitochondriale (Mito) ont été déposées. Des protéines de référence ont été utilisées, LDHA pour la fraction cytoplasmique et Tom 20 pour la fraction mitochondriale (n=2).

L'absence d'anomalie du recrutement de la protéine DRP1 à la mitochondrie observée en immunofluorescence, et le phénotype hyperfusionné observé avec le MitoTracker® suggéraient un rôle possible de la saccine dans la phase d'action de DRP1 : la scission entre les mitochondries. Si les patients présentent un profil altéré de la protéine nous pourrions supposer que sa fonction l'est également. Le profil protéique de DRP1, en Western blot, ne semble pas être altéré chez les patients testés (AAR-437-014 et AAR-545-003) (figure 44).



**Figure 44: Analyse en Western Blot de DRP1**

Des protéines extraites des fibroblastes témoin ont été utilisées comme contrôle de la protéine DRP1 normale. 20 µg de protéines ont été déposés sur les blots. L'actine a été utilisée comme protéine de référence (n=3).

#### **4) Anomalies du renouvellement mitochondrial**

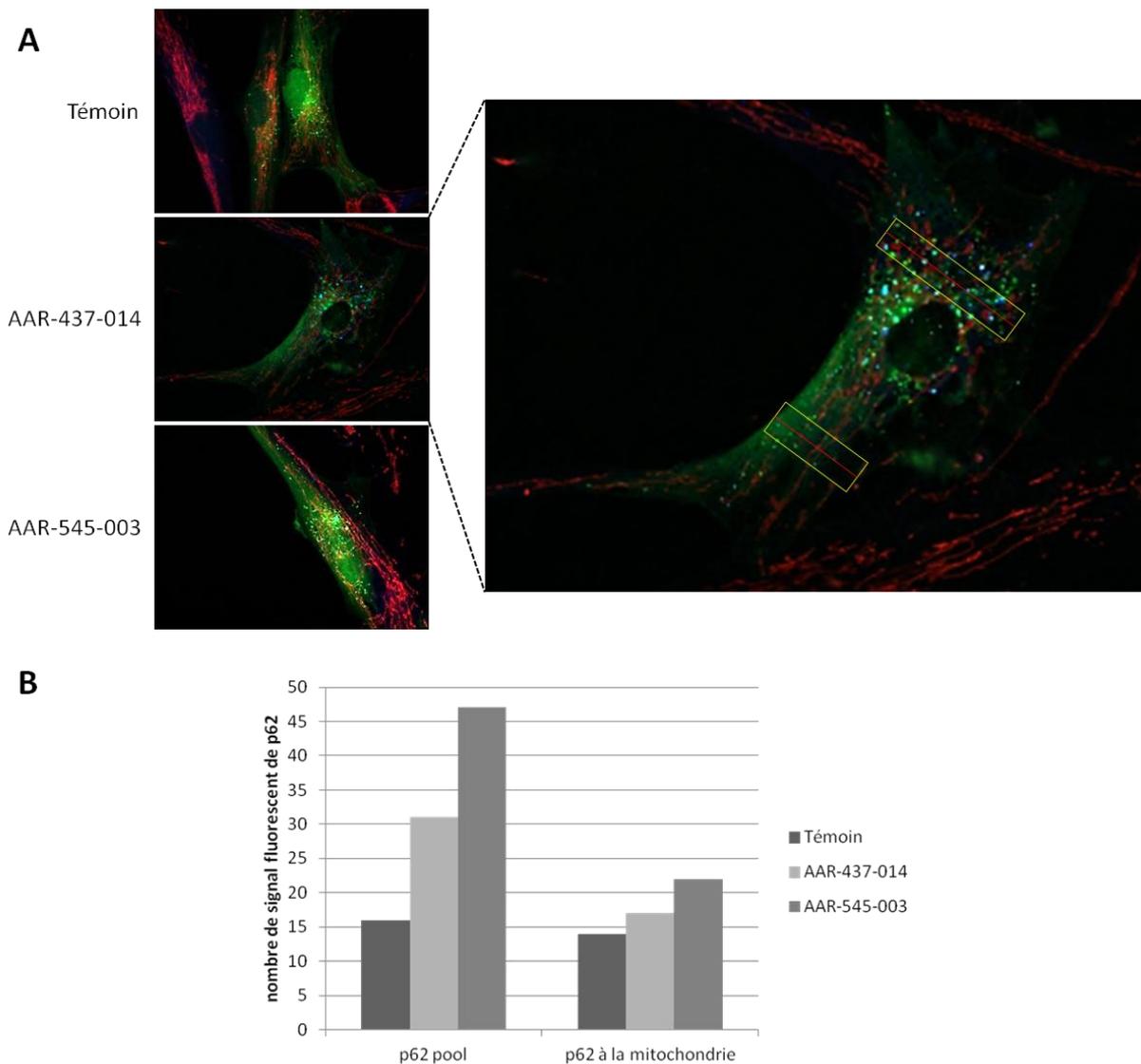
La fragmentation du réseau mitochondrial est également la première des quatre étapes impliquées dans la mitophagie. Nous avons débuté l'étude des trois autres étapes de la mitophagie.

##### 4-a) Phase n°2 de la mitophagie : recrutement de la mitochondrie par la protéine p62

Pour savoir si cette étape pouvait être altérée par une expression modifiée de la saccine, nous avons utilisé l'association d'un marquage fluorescent de p62 et de Tom20 permettant d'analyser le recrutement des mitochondries vers l'autophagosome (figure 45).

Les résultats préliminaires ont mis en évidence deux éléments importants :

- la quantité initiale de p62 chez les patients semblait plus importante que chez le témoin
- la proportion de p62 à la mitochondrie semblait augmentée.



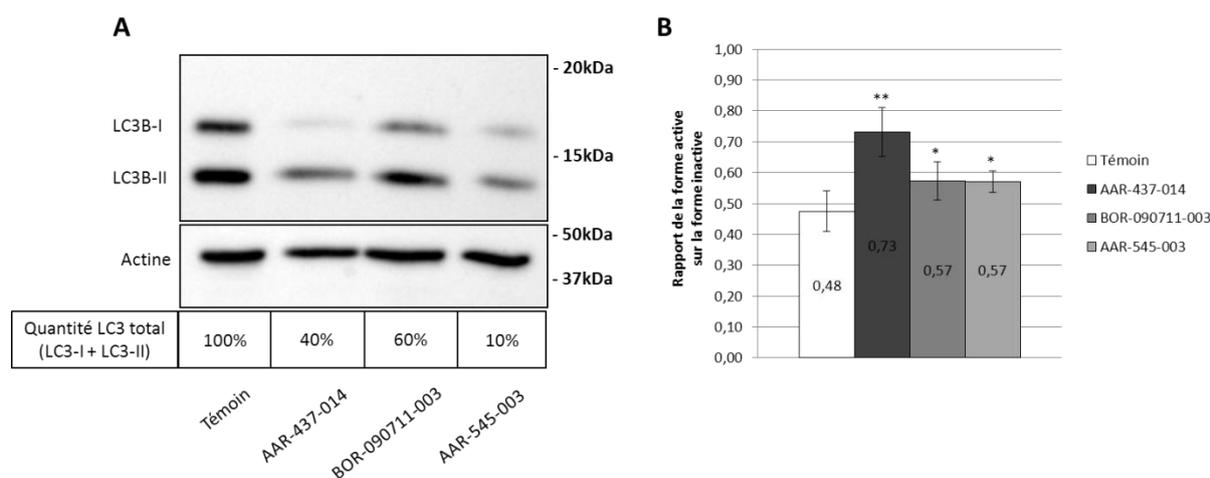
**Figure 45: Quantification relative de p62 localisée ou non à la mitochondrie**

A partir des images obtenues en immunofluorescence lors d'un triple marquage sur des fibroblastes (**A**), nous avons quantifié manuellement sur une vingtaine de cellule ( $n=1$ ), (**B**) le nombre de signaux bleus correspondant à la protéine p62, ainsi que le nombre de signaux bleus associés aux signaux rouges correspondant à la protéine Tom20 pour la mitochondrie.

#### 4-b) Phase n°3 de la mitophagie : formation de l'autophagosome avec la protéine

##### LC3

La protéine LC3 est une protéine nécessaire à la maturation du phagophore en autophagosome. La détection des deux formes de la protéine LC3 permet de mesurer le taux d'autophagie et plus particulièrement la formation de l'autophagosome. Pour étudier l'impact des mutations de *SACS* sur cette étape de la mitophagie, la présence des deux formes de LC3, inactive (LC3-I) et active (LC3-II) a été visualisée par Western Blot (figure 46). La quantification relative par Western blot nous indique une diminution de LC3 total chez les patients ainsi qu'une quantité plus importante de la forme active chez nos trois patients testés. Nous détectons une augmentation significative de la forme active de 50% pour le patient AAR-437-014 et de 18% pour les patients AAR-545-003 et BOR-090711-003. Ces données suggèrent que le flux de renouvellement des mitochondries pourrait être anormal chez les patients ARSACS.



**Figure 46: Quantification par Western Blot de la protéine LC3 chez 3 patients**

**A**, Western blot représentatif du profil obtenu pour LC3 sur un extrait protéique issu des cellules des patients et du témoin. Sous le Western blot, la quantification de la somme totale de protéine LC3 comparée à la protéine de référence, l'actine. **B**, quantification de la protéine LC3-II par rapport à la quantité totale de LC3 (LC3-I + LC3-II) (n=3, pvalue \*<0,05 ; \*\*<0,01).

# **Discussion - Perspectives**

ARSACS est la deuxième plus fréquente forme d'ataxie spastique au monde après l'ataxie de Friedreich<sup>29,30</sup>. La plupart des mutations identifiées chez les patients ARSACS, décrites en dehors du Québec, sont des mutations privées. SACS est un gène très grand (15000 pb) et polymorphe (plus de 500 polymorphismes listés sur le site dbSNP de NCBI), avec une région codante de plus de 12 000 pb. En parallèle, l'émergence des nouvelles technologies de séquençage haut débit exome entier ou ciblé, qui sont de plus en plus utilisées en routine dans les laboratoires de diagnostic des maladies mendéliennes, a conduit inévitablement à l'identification d'un nombre exponentiel de variants faux-sens. Depuis 2004, plus d'une quarantaine de variants faux-sens a été identifiée dans les différentes études génétiques d'ARSACS<sup>29,33,54</sup>. Cependant, les effets délétères de ces variants faux-sens et leur implication directe dans la pathologie ont rarement été prouvés par des études fonctionnelles : seuls 2 variants faux-sens de SACS ont, à notre connaissance, fait l'objet d'une étude fonctionnelle approfondie. Le résidu p.D168 est localisé au niveau du domaine sr1/SIRPT1 de la protéine saccine, et possède une activité ATPase. Une protéine recombinante mutée sur le résidu p.D168 abolie l'activité d'hydrolyse de l'ATP<sup>70</sup>. Le variant p.N4549D est localisé dans le domaine HEPN impliqué dans la dimérisation de la protéine. En utilisant la technique de cristallographie, et un modèle bactérien, cette mutation a été montrée comme bloquant la dimérisation et conduisant à une protéine avec une structure 3D anormale<sup>71</sup>. En l'absence d'analyses fonctionnelles, les variants faux-sens de SACS publiés comme mutations authentiques auraient du être classés comme des variants à signification clinique incertaine (*Variant of clinical Uncertain Significance, VUS*) à l'image des travaux de Synofzik *et al.*<sup>30</sup>. La classification VUS permet d'attribuer, par analyse *in silico*, un degré de pathogénicité aux variants identifiés. Pour déterminer l'impact de ces variants sur la fonction du gène ou sur le phénotype cellulaire, la plupart des directives à visée diagnostique publiées, à ce jour, ont inclus l'utilisation de ces données *in silico* et ont recommandé l'utilisation d'approches expérimentales fonctionnelles, notamment à partir de tissus ou de cellules de patients<sup>117</sup>. Des études fonctionnelles complètes de tous les variants faux-sens étant peu réalisables en routine, l'identification d'un bio-marqueur diagnostique pour ARSACS représenterait un outil majeur permettant de poser un diagnostic définitif dans des situations moléculaires d'interprétation incertaine.

Dans le large groupe des ACH, il existe quelques entités pour lesquelles un bio-marqueur est utilisé pour leur diagnostic. L'ataxie télangiectasie est une ataxie autosomique récessive, causée par des mutations dans le gène *ATM* codant pour une kinase impliquée dans la réparation des cassures double brin de l'ADN et la progression du cycle cellulaire<sup>118</sup>. La conséquence d'une mutation perte de fonction conduit à l'accumulation des lésions de l'ADN qui à leur tour provoquent une activation chronique des systèmes de réparation. Cette activation va épuiser toutes les ressources énergétiques de la cellule et perturber l'homéostasie cellulaire<sup>119</sup>. D'un point de vue biologique, des remaniements chromosomiques ont été observés ainsi qu'une augmentation > à 10 fois le taux sanguin normal d'alpha-fœtoprotéine (AFP)<sup>120,121</sup>. Cette protéine est produite par le fœtus en développement et son taux est inférieur à 6 ng/ml chez l'adulte. L'α-fœtoprotéine est dès lors utilisée comme un marqueur déterminant pour le diagnostic de l'ataxie télangiectasie. Un autre exemple est le cas des ataxies avec apraxie oculomotrice de type 1 ou 2 (AOA1 ou AOA2). Le gène *APTX* code pour une protéine majoritairement impliquée dans la réparation des cassures simple brin de l'ADN, l'aprataxine<sup>122,123</sup>. Les mutations de ce gène sont responsables d'AOA1. Les analyses fonctionnelles ont montré une augmentation des espèces réactives d'oxygène (ROS) associée aux lésions oxydatives de l'ADN<sup>124</sup>. Dans les cellules musculaires des patients atteints, une déficience du co-enzyme Q10 peut être observée<sup>125</sup>. Le tableau clinique est fréquemment associé à une hypoalbuminémie avec hypercholestérolémie LDL<sup>126,127</sup>. Dès lors, ce signe biologique est également utilisé dans les études comme un indice majeur du diagnostic d'AOA1. Dans le cas de l'AOA2, le gène responsable est *SETX* codant pour la senataxine, une ADN/ARN hélicase dont la fonction est encore inconnue. Toutefois, il est observé une augmentation modérée du taux sanguin de l'α-fœtoprotéine, augmentation toujours inférieure à 10 fois la normale (en général entre 5 et 6 fois le taux normal) dans 99% des cas<sup>128-130</sup>. L'ensemble de ces données fait de l'α-fœtoprotéine un bio-marqueur incontesté pour orienter le diagnostic AOA2. De même, dans le groupe des PSH, le type 5 (SPG5) est un autre exemple de l'utilisation d'un élément biologique pour aider au diagnostic. SPG5 est causée par des mutations dans le gène *CYP7B1* codant pour une sous-unité du cytochrome P450 impliquée dans le métabolisme du cholestérol (P450 7-α hydroxylase)<sup>131,132</sup>. La conséquence directe des mutations de *CYP7B1* est une perte de fonction de l'enzyme provoquant l'accumulation de ses deux substrats : le

27-hydroxy-cholestérol (27-OH-Chol) et le 25-hydroxy-cholestérol (25-OH-Chol). Schüle *et al.* ont démontré une augmentation du taux dans le sang et dans le LCR des deux substrats de CYP7B1, chez 4 patients SPG5<sup>133</sup>. Ces augmentations sont compatibles avec les résultats obtenus sur un modèle murin d'extinction du gène *cyp7b1*<sup>134</sup>. Au sein du laboratoire MRGM, nous avons recherché des mutations dans *CYP7B1* au sein d'une cohorte de 250 patients atteints de paraplégie spastique sporadique. Quatre patients ont été identifiés avec des mutations : un porteur d'une mutation tronquante hm (p.R388\*), un porteur d'une mutation faux-sens hm (p.R417C), et deux patients porteurs de deux mutations faux-sens à l'état hc (p.T297A/p.S354N et p.R417/p.R486C). Toutes ces mutations ont été précédemment publiées exceptée p.S354N<sup>131,132</sup>. Tous les patients porteurs de mutations dans *CYP7B1* ont des taux élevés de 25- et 27-OH-Chol dans le sang<sup>135</sup>. Les résultats sont très proches de ceux obtenus par Schüle *et al.*<sup>133</sup>. L'ensemble suggère que le dosage sanguin du 27-OH-Chol et du 25-OH-Chol serait un bio-marqueur très utile au diagnostic de SPG5 en routine hospitalière<sup>136</sup>. L'ensemble de ces études, sur les ataxies et les paraplégies spastiques, soulignent l'importance de l'utilisation d'un bio-marqueur puisqu'il permet de poser un diagnostic clair dans le cas des mutations faux-sens.

Notre étude génétique a été basée sur la recherche de mutations de *SACS* dans une cohorte de patients recrutés au sein du réseau SPATAX (321 patients), avec la présence d'une ataxie, d'une spasticité et d'un âge de début avant 45 ans comme critères d'inclusion obligatoires. En parallèle, nous avons également confirmé par séquençage Sanger la présence de mutations identifiées dans *SACS* par NGS au sein de la cohorte ATAXIC (5 malades avec deux variants dans *SACS* parmi les 156 patients inclus dans ATAXIC) constituée de malades atteints d'une ataxie congénitale. Un total de 67 variants non répertoriés comme polymorphismes (ou SNP) a été identifié chez 55 patients. Parmi ces variants : 36 VUS tronquants donc de classe 5, 14 VUS faux-sens de classe 4, 4 VUS faux-sens de classe 3, 8 VUS faux-sens de classe 2 et 5 VUS silencieux de classe 1.

Tous les variants identifiés ont été listés dans les tableaux 8 à 10 et 13 (1<sup>ère</sup> partie des résultats). Tous sont nouveaux à l'exception de 3 variants tronquants (R2119\*, Y3430\*, R3792\*)<sup>49,56,137</sup>, et de 4 variants faux-sens (R272H, R276C, M1311K et P1583R)<sup>55,58,60,137</sup>. De

plus, 5 variants ont déjà été publiés avec une substitution différente de l'acide aminé (substitution dans notre cohorte/publiée : R272H/C, R1645\*/Q, R2703H/C, A4469D/P et Q4413Hfs\*38/\*)<sup>41,54,61,63,65</sup>. Tous les variants faux-sens, sauf deux, concernent un acide aminé hautement conservé au cours de l'évolution et 71% des variants faux-sens et silencieux modifient un site ESE. La mise en évidence d'un variant au niveau de l'acide aminé p.R272 dans cinq familles différentes (trois dans notre étude, une canadienne et une italienne), suggère la présence d'un point chaud de mutation à cette position du génome. Compte tenu du caractère délétère des mutations tronquantes (VUS classe 5), à l'état hm ou associée à une seconde mutation tronquante, il n'y a pas de doute quant au diagnostic ARSACS pour les patients porteurs de ces mutations. Par contre dès lors qu'il s'agit d'un VUS faux-sens, associé ou non à une mutation tronquante, des interrogations peuvent apparaître sur la fiabilité du diagnostic moléculaire, en particulier pour les VUS de classe < 4. Trois cas index (AAR-242-003, AAD-399-077 et 01023MO-003) sont porteurs de tels VUS faux-sens < 4 et associés, ou non, à un variant tronquant de classe 5. De plus, dans 2 autres familles, une seule anomalie génétique supposée délétère a été identifiée : ANG-120054380-003 porteur d'un VUS tronquant classe 5 ht hérité de sa mère et dont sa sœur est également porteuse ; et JAM-001 identifiée avec une délétion ht au niveau du chromosome 13 emportant tout le gène SACS. Le séquençage en Sanger n'a pas permis de mettre en évidence une seconde mutation ponctuelle. Les analyses complémentaires de dosage génique par CGH-array chez ANG-120054380-003 et de l'ARNm (pour les deux patients) n'ont indiqué aucune anomalie. Par conséquent, sur les bases moléculaires, le diagnostic d'ARSACS est retenu chez 35 malades, 31 SPATAX et 4 ATAXIC. A l'opposé, les résultats moléculaires ne permettent pas de poser un diagnostic formel pour 3 malades issus de SPATAX, un d'ATAXIC et la patiente JAM-001. L'ensemble de nos données moléculaires souligne bien l'importance de développer des techniques d'interprétation plus fiables des VUS de SACS, et notamment illustre l'intérêt de disposer d'un bio-marqueur à visée diagnostique pour ARSACS.

Les observations récentes d'un rôle potentiel de la saccine dans le maintien de la morphologie et de la fonction mitochondriale<sup>40,73</sup>, nous ont conduit à étudier le compartiment mitochondrial chez nos patients. Cette étude a été menée sur des cultures

primaires de fibroblastes obtenus chez 11 patients porteurs de VUS de diverses classes dans *SACS* (tableau 19):

- Huit patients portant des VUS de classe  $\geq 4$  bi-alléliques, et donc pathogènes et considérés comme de vraies mutations, par conséquent diagnostiqués ARSACS à ce stade;
- Trois autres patients, dont le diagnostic d'ARSACS n'avait pas pu être confirmé par les analyses moléculaires, AAR-242-003 porteur de VUS classe 2 bi-alléliques, ANG-120054380-003 porteur d'un VUS classe 5 mono-allélique, et JAM-001 porteuse d'une délétion complète du gène *SACS* à l'état hétérozygote.

MAR-7444-007	p.Y3430*	Homozygote	VUS classe 5
AAR-437-014	p.R272H	Homozygote	VUS classe 4
AAR-519-001	p.P2099L	Homozygote	VUS classe 4
BOR-090711-003	p.L1180Lfs*7 p.K3747*	Hétérozygote composite	VUS classe 5 VUS classe 5
AAR-545-003	p.V3545Efs*3 p.R3792*	Hétérozygote composite	VUS classe 5 VUS classe 5
AAR-601-003	p.L143Lfs*10 p.Q4356*	Hétérozygote composite	VUS classe 5 VUS classe 5
AAR-334-009	p.R961* p.R2703H	Hétérozygote composite	VUS classe 5 VUS classe 4
AFT-068-005	p.F2056Ffs*21 p.P2217Q	Hétérozygote composite	VUS classe 5 VUS classe 4
AAR-242-003	p.I513V	Homozygote	VUS classe 2
ANG-120054380-003	p.C1285Lfs*8 ?	Hétérozygote	VUS classe 5
JAM-001	Délétion <i>SACS</i> entier	Hétérozygote	/

**Tableau 19: Tableau récapitulatif des patients inclus dans l'étude fonctionnelle**

Nous avons mis en évidence une morphologie anormale du réseau mitochondrial, à savoir des mitochondries en forme de « bulle » ou de « raquette » et de longs tubules mitochondriaux, évocateurs d'une hyperfusion, dans les fibroblastes des 8 patients avec un diagnostic moléculaire ARSACS et 2 patients sur 3 non-ARSACS. Une seule patiente, JAM-001, ne présentait pas cette anomalie importante. Ces anomalies sont également associées à une diminution attendue de la quantité globale de mitochondries dans les fibroblastes ainsi qu'à une diminution de la quantité d'ADN mitochondrial (ADNmt). En effet, plusieurs études ont démontré un lien entre la dynamique fusion/fission et la quantité de l'ADN mitochondrial, vraisemblablement *via* une perturbation de la ségrégation des nucléoides. L'ADNmt est localisé dans la matrice de l'organelle et est organisé sous la forme de

nucléoides. Chaque nucléoïde comprenant 2 à 8 molécules d'ADNmt<sup>138</sup> et il y a 500 à 800 nucléoides par cellule. 1) Chez la levure, l'inactivation des orthologues mammifères *OPA1* ou *MFNs* a conduit à une diminution drastique de la quantité d'ADNmt dans les mitochondries<sup>139-141</sup>. D'ailleurs l'orthologue d'*OPA1* chez la levure, *MGM1* (*Mitochondrial Genome Maintenance protein 1*), a été identifié par son incapacité à maintenir l'ADNmt. 2) A partir de biopsies de muscle squelettique de patients atteints de DAO (atrophie optique dominante), des mutations faux-sens d'*OPA1* étaient associées à des délétions multiples de l'ADNmt ainsi qu'à une diminution de la quantité de nucléoides dans les mitochondries<sup>142</sup>. 3) L'inactivation de *Mfn2* ou *Mfn1* dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) a mis en évidence une quantité importante de mitochondries sans nucléoïde sans perte significative d'ADNmt<sup>143,144</sup>. La fusion des mitochondries, régulée par *OPA1* ou *MFNs*, apparaît ainsi cruciale pour le maintien des nucléoides d'ADNmt dans les cellules. Quant à la fission, très peu d'informations sont disponibles à ce jour. 4) Une inactivation de *DRP1* par sh-RNA dans des cellules HeLa a induit une diminution de l'ADNmt mais le processus impliqué reste inconnu<sup>145</sup>. Ainsi, la diminution de la quantité d'ADNmt et l'altération de l'architecture du réseau mitochondrial chez les patients, montrent que la saccine est impliquée dans la régulation de la structure des mitochondries.

L'ensemble de nos données suggère fortement que les anomalies du réseau mitochondrial observées sont un phénotype récurrent et reproductible chez les patients ARSACS susceptibles de ce fait d'être utilisées comme bio-marqueur à visée diagnostique. En effet, tous les fibroblastes des patients avec 2 VUS de classe  $\geq 4$  présentent les mêmes altérations, et 2 des 3 patients chez qui le diagnostic moléculaire ARSACS n'avait pu être prouvé sont également positifs pour ces anomalies. Nous considérons que ces deux derniers malades sont en fait bien atteints d'ARSACS en dépit de leur résultat moléculaire.

Parmi les 11 patients testés, nous observons également un phénotype original sur les fibroblastes du patient AAR-437-014 porteur de la mutation récurrente p.R272H (VUS classe 4). Le marquage avec la sonde MitoTracker® a montré un rejet de la sonde hors de la cellule. Les analyses complémentaires avec le TMRM ont permis d'expliquer ce rejet par l'existence, dans les cellules de ce patient, d'une anomalie du potentiel de membrane. L'étude de la respiration mitochondriale a indiqué que cette anomalie de potentiel de membrane était liée à un défaut de la chaîne respiratoire. La mutation p.R272H est localisée

dans la sous-répétition sr1 de la première région répétée SIRPT1. Les mutations dans cette région seraient associées à une sévérité plus importante du phénotype basé sur le score SPAX (*SPastique Ataxia*) reposant sur des critères cliniques (cervelet, spasticité, nerfs périphériques, rétinopathie et intellectuel). Cette donnée pourrait expliquer le phénotype cellulaire plus sévère observé chez le patient AAR-437-014, et faire évoquer des corrélations phénotype-génotype qui n'ont jamais été établies clairement jusque-là. L'obtention de résultats similaires sur les fibroblastes d'autres patients porteurs de la même mutation serait un argument supplémentaire en faveur de cette hypothèse.

A l'opposé, le potentiel de membrane et la respiration mitochondriale n'ont pas montré d'altération dans les cellules des autres patients étudiés. Nos résultats préliminaires vont dans le sens d'une absence de lien entre la respiration et les anomalies drastiques de la morphologie mitochondriale observées. Des expériences complémentaires sur un plus grand nombre de patients devront être menées pour approfondir l'étude de la fonction respiratoire. La capacité de production d'énergie dans les cellules sera également à explorer en utilisant des techniques d'analyses de quantification de l'ATP.

Des anomalies de morphologie du réseau mitochondrial ont déjà été rapportées dans de nombreuses maladies neurodégénératives. Dès 2003, il a été décrit dans le cas de la maladie de Parkinson, des anomalies de la morphologie mitochondriale incluant une fragmentation du réseau sur le modèle de la drosophile avec des mutants parkine<sup>146</sup>. La fragmentation du réseau a également été rapportée sur des cellules SH-SY5Y transfectées avec un siRNA parkin<sup>147,148</sup>. Le mécanisme physiologique implique le rôle de parkin dans l'ubiquitinylation de Drp1. D'autre part, chez des patients atteints de la maladie de Huntington et un modèle murin, Wang et son équipe montrent que la balance fission/fusion est altérée en faveur de la fission<sup>149</sup>. Les détails mécanistiques entre la huntingtine et la fragmentation mitochondriale sont encore troubles cependant ils impliqueraient une activation excessive de DRP1. D'autres maladies sont causées par des mutations dans les gènes directement impliqués dans le phénomène de fission/fusion. C'est le cas de l'atrophie optique autosomique dominante (ADOA), où 75% des patients sont porteurs de mutations dans le gène *OPA1*. La protéine OPA1 étant impliquée dans la fusion du réseau mitochondrial, ces mutations provoquent une fragmentation mitochondriale qui a été retrouvée sur le modèle murin KO *OPA1*<sup>79,150</sup>. Dans le cas de la maladie de Charcot Marie-Tooth de type 2A (CMT2A) due à des

mutations dans le gène *MFN2*<sup>151</sup>, plus de 60 mutations ont été identifiées dont l'immense majorité sont des mutations faux-sens<sup>152</sup>. Les conséquences de ces mutations peuvent être multiples, rendant difficile la compréhension des mécanismes impliqués<sup>153</sup>. Certaines mutations, exprimées dans des MEFs, ont généré une fragmentation du réseau<sup>154</sup>, tandis que sur un modèle murin KO *MFN2* conditionnel, des anomalies de la distribution des mitochondries dans les dendrites des cellules de Purkinje ont été observées<sup>144</sup>. Une altération de la balance entre la fusion et la fission conduisant à un réseau mitochondrial hyperfusionné dans des fibroblastes de patients a été démontrée dans l'encéphalopathie liée à *DRP1*<sup>90</sup>, dans la paraplégie spastique héréditaire de type 31 (SPG31)<sup>87</sup> et de type 56 (SPG56 ex SPG49)<sup>155</sup>. Dans le premier cas, des cultures primaires de fibroblastes d'un patient ont été utilisées pour étudier la morphologie du compartiment mitochondrial et peroxisomal. Les anomalies observées, phénotype hyperfusionné pour les mitochondries et hyperfissionné pour les peroxisomes, sont similaires à celles observées lors d'une perte de fonction de *DRP1*. Dans le second cas, des fibroblastes d'un patient SPG31 ont révélé un phénotype mitochondrial hyperfusionné. De plus, les fibroblastes et les cellules musculaires de ce patient ont également montré une réduction de la respiration mitochondriale et de l'activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire. Enfin dans le dernier cas, des fibroblastes et lymphoblastes issus d'un patient SPG56 ont montré une diminution de la respiration mitochondriale, de la production d'ATP, et également la présence de mitochondries anormales avec de longs tubules ainsi que des anomalies morphologiques « donut-like ».

Girard *et al.* ont transfecté des cellules SH-SY5Y avec une partie de la séquence N-terminale de la saccine (1368 premiers acides aminés) et ont montré par immunoprécipitation que cette partie de la séquence était capable d'interaction avec *DRP1*<sup>73</sup>. Les auteurs concluaient alors que l'altération de la saccine conduisant à un réseau mitochondrial interconnecté pourrait être liée à l'inactivation de *DRP1*. Nos résultats préliminaires sur l'étude de *DRP1*, mesures de sa localisation à la mitochondrie et de la quantité de protéine dans la cellule, suggèrent qu'il n'y aurait pas d'implication de la saccine sur la synthèse et le recrutement de *DRP1* à la mitochondrie. Si le profil protéique de *DRP1* observé en Western blot semble normal chez les patients, une altération potentielle de sa capacité de fragmentation n'est pas à écarter et devra être investiguée. D'autre part, l'étude des acteurs clés de la fusion,

OPA1 et MFNs, sera également indispensable afin de déterminer une éventuelle augmentation de la synthèse ou du recrutement de ces protéines à la mitochondrie qui pourrait expliquer le phénotype hyperfusionné observé dans les fibroblastes.

Dans une dernière partie de notre travail, nous avons abordé les mécanismes d'action possibles de la salsine sur la physiologie mitochondriale. Outre l'altération de la morphologie du réseau mitochondrial, l'augmentation de la fusion peut également diminuer le taux de renouvellement des mitochondries. En effet, le bon déroulement de la mitophagie nécessite le fractionnement du réseau mitochondrial, qui cependant ne constitue pas le signal initiateur<sup>94,156,157</sup>. La dérégulation de la mitophagie apparaît cruciale dans les mécanismes physiopathologiques de plusieurs maladies neurodégénératives. C'est le cas de certaines formes héréditaires de maladie de Parkinson causées par des mutations des gènes *PINK1* ou *PARK2*, codant pour deux protéines essentielles à l'intégrité mitochondriale, Pink1 et Parkine. Une étude récente sur des cellules HeLa, a montré que ces protéines sont impliquées dans la dégradation des mitochondries par mitophagie. Lorsque les mitochondries ont un potentiel de membrane diminué, Parkine est stabilisée au niveau de la mitochondrie et cette stabilisation favorise l'élimination des mitochondries. En effet, dans les cellules HeLa surexprimant parkine, les mitochondries sont fortement colocalisées dans des structures ponctuelles riches en protéine LC3<sup>156,158</sup>. Cette protéine est un marqueur des autophagosomes qui sont des vésicules encerclant des corps destinés à la dégradation lysosomale/autophagique. En conséquence, le KO d'Atg5 (protéine impliquée dans la formation de l'autophagosome) bloque la dégradation des mitochondries dépendante de la parkine. Ce recrutement de parkine démontre son rôle senseur pour l'intégrité mitochondriale. Ces données font évoquer une anomalie de la mitophagie chez les patients atteints d'une maladie de Parkinson héréditaire causée par les mutations d'un de ces gènes. Dans cette même pathologie, la mutation du gène DJ-1 provoque une réduction de l'activité mitophagique<sup>159</sup>. Sur le modèle MEF KO DJ-1, une diminution de la protéine ERK2 phosphorylée impliquée dans le processus de l'autophagie et le renouvellement des mitochondries<sup>159</sup>. Dans ce sens, il a été démontré que l'inhibition de la fission par utilisation de mutant DRP1, diminue la mitophagie. Les mitochondries présentent alors un potentiel de membrane diminué et une baisse du niveau de recrutement d'OPA1. D'autres études ont

montré que la surexpression de Fis1 ou du mutant constitutionnel de DRP1 induit un mécanisme de mitophagie tandis que l'inactivation de Fis1 ou de DRP1 atténue ce processus<sup>160</sup>.

Le phénotype d'hyperfusion du réseau mitochondrial observé chez nos patients pourrait induire une défaillance du système de mitophagie puisque la fragmentation du réseau en est un élément important. Nous avons du coup débuté l'exploration du 2<sup>ème</sup> mécanisme, la perturbation du renouvellement des mitochondries, pouvant aboutir à l'augmentation de la fusion sur les fibroblastes de trois patients ARSACS. Nos résultats préliminaires ont montré d'une part une diminution importante de la quantité de protéine LC3 (forme inactive et active) chez les patients et d'autre part une présence majoritaire de la forme active. Ceci traduit une anomalie du flux de LC3, marqueur de l'autophagie, suggérant ainsi une altération du renouvellement des mitochondries. Cette hypothèse est soutenue par nos observations préliminaires de la stimulation de ce système par le biais d'une augmentation de la quantité d'autophagosome, représentée par p62, dans les fibroblastes des patients.

Sur la base de l'ensemble de nos résultats, nous confirmons le rôle supposé de saccine dans la régulation de la fonction mitochondriale. Le caractère récurrent des altérations constatées sur fibroblastes de malades ARSACS nous a amené à proposer une nouvelle définition graduelle du diagnostic d'ARSACS (tableau 20). Cette définition pratique graduelle est basée sur des critères cliniques, génétiques et cellulaires. Ces derniers correspondent à la présence d'un réseau mitochondrial hyperfusionné dans les fibroblastes des malades.

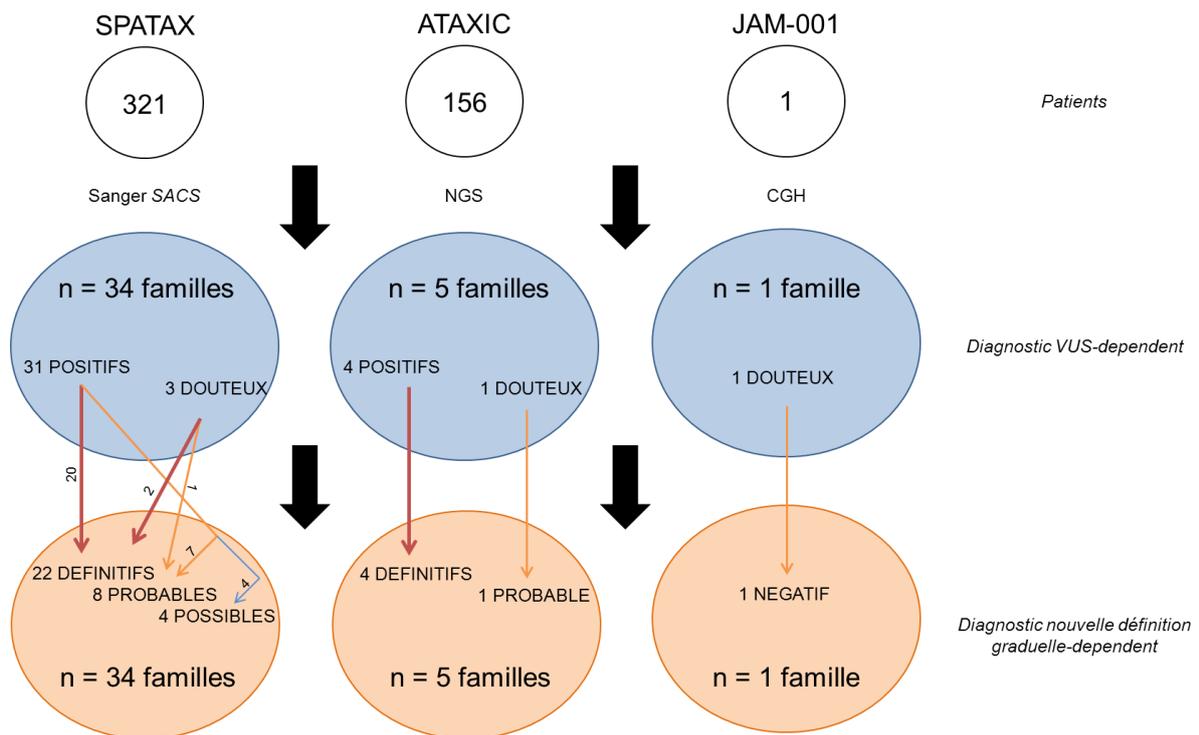
Degré de probabilité d'ARSACS	Critères
ARSACS Possible	Ataxie spastique ou ataxie congénitale ou paraplégie spastique +/- hypo-intensités linéaires dans le tronc cérébral +/- neuropathie avec participation démyélinisante
	ET 2 VUS ≤ classe 4 dans SACS
ARSACS Probable	Ataxie spastique ou ataxie congénitale ou paraplégie spastique +/- hypo-intensités linéaires dans le tronc cérébral +/- neuropathie axonale démyélinisante modérée
	ET 1 VUS classe 5 et 1 VUS ≤ classe 4 dans SACS
ARSACS Définitif	Ataxie spastique ou ataxie congénitale ou paraplégie spastique +/- hypo-intensités linéaires dans le tronc cérébral +/- neuropathie axonale démyélinisante modérée
	ET 2 VUS classe 5
	OU au moins 1 VUS de classe 5 ou 2 VUS ≤ classe 4 dans SACS ET marqueur mitochondrial positif sur fibroblastes (morphologie, ADNmt)

Tableau 20 : Proposition de grade pour diagnostiquer un ARSACS

En se basant sur cette définition, nous arrivons à poser un diagnostic d'ARSACS (figure 47, Annexe 3) :

- définitif chez 22 patients
- probable chez 8 patients
- possible chez 4 patients.

Il sera évidemment très intéressant d'arriver à obtenir une biopsie de peau des cas « probables » et « possibles », en particulier ceux porteurs d'au moins un VUS de classe inférieure à 4, afin de tester le marqueur mitochondrial et permettre de poser un diagnostic définitif.



**Figure 47 : Schématisation du diagnostic selon les critères proposés de notre définition graduelle du diagnostic d'ARSACS**

Enfin, l'ensemble de ce travail a permis d'identifier une très grande série de patients ARSACS. L'étude clinique, menée par le Dr S. Moutton, Service de Génétique, CHU Bordeaux (annexe 4), confirme le large spectre clinique présenté par ARSACS, et qu'au moins un des éléments majeurs de la triade typique (ataxie précoce, spasticité des membres inférieurs et polyneuropathie), peut manquer. Les formes atypiques peuvent se caractériser par un début avec des signes pyramidaux isolés, un début tardif après 25 ans mais aussi, par un début congénital avec une stabilité, voire une amélioration, de la symptomatologie au fil du temps. Dans ces derniers cas, le diagnostic syndromique retenu était celui d'une ataxie congénitale. Notre travail permet donc d'étendre, pour la première fois, le spectre clinique d'ARSACS jusqu'au groupe des ataxies congénitales.

# Références

1. Allan, S. & Hreday, N. *Essential neurosciences*. Book,
2. Joyner, A. L. Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain-hindbrain development. *Trends Genet.* **12**, 15–20 (1996).
3. Kikuchi, Y. *et al.* Ocular and cerebellar defects in zebrafish induced by overexpression of the LIM domains of the islet-3 LIM/homeodomain protein. *Neuron* **18**, 369–82 (1997).
4. Wassarman, K. M. *et al.* Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development* **124**, 2923–34 (1997).
5. Meyers Erik, L. M. and M. G. An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat. Genet.* **18**, 136–141 (1998).
6. Smeyne RJ, Chu T, Lewin A, Bian F, Crisman S, Kunsch C, Lira S, and Oberdick J. Local control of granule cell generation by cerebellar Purkinje Cells. *Mol. cell Neurosci.* **6**, 230–251 (1995).
7. Wechsler-Reya, R. & Scott, M. P. The Developmental Biology of Brain Tumors. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 385–428 (2001).
8. Guessous F, Li Y, A. R. Signaling pathways in medulloblastoma. *J. Cell. Physiol.* **217**, 577–583 (2008).
9. Schmahl, W., Knoedlseder, M., Favor, J. & Davidson, D. Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations are associated with Small eye (Sey) in the mouse, a point mutation at the Pax-6-locus. *Acta Neuropathol.* **86**, 126–35 (1993).
10. Yang, X. W., Zhong, R. & Heintz, N. Granule cell specification in the developing mouse brain as defined by expression of the zinc finger transcription factor RU49. *Development* **122**, 555–66 (1996).
11. Schwartz, P. M., Borghesani, P. R., Levy, R. L., Pomeroy, S. L. & Segal, R. a. Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF<sup>-/-</sup> mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron* **19**, 269–81 (1997).
12. Ye P, Xing Y, Dai Z, D. A. In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **95**, 44–54 (1996).
13. Balázs, R., Hack, N., Jørgensen, O. S. & Cotman, C. W. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells: pharmacological characterization. *Neurosci. Lett.* **101**, 241–6 (1989).
14. Lin, W. W., Wang, C. W. & Chuang, D. M. Effects of depolarization and NMDA antagonists on the role survival of cerebellar granule cells: a pivotal role for protein kinase C isoforms. *J. Neurochem.* **68**, 2577–86 (1997).

15. Romani, M., Micalizzi, A. & Valente, E. M. Joubert syndrome: congenital cerebellar ataxia with the molar tooth. *Lancet. Neurol.* **12**, 894–905 (2013).
16. Budde, B. S. *et al.* tRNA splicing endonuclease mutations cause pontocerebellar hypoplasia. *Nat. Genet.* **40**, 1113–8 (2008).
17. Rudnik-Schöneborn, S. *et al.* Pontocerebellar hypoplasia type 1: clinical spectrum and relevance of EXOSC3 mutations. *Neurology* **80**, 438–46 (2013).
18. Mantuano, E. *et al.* Identification of novel and recurrent CACNA1A gene mutations in fifteen patients with episodic ataxia type 2. *J. Neurol. Sci.* **291**, 30–6 (2010).
19. Schlotawa, L. *et al.* Cerebellar ataxia, mental retardation and dysequilibrium syndrome 1 (CAMRQ1) caused by an unusual constellation of VLDLR mutation. *J. Neurol.* **260**, 1678–80 (2013).
20. Steinlin, M. Non-progressive congenital ataxias. *Brain Dev.* **20**, 199–208 (1998).
21. Friedreich N. Ueber degenerative atrophie der spinalen Hinterstränge. *Virchow's Arch path Anat* **26**, 391–419, 433–459 (1863).
22. Anheim, M. *et al.* Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management. *Neurogenetics* **11**, 1–12 (2010).
23. Finsterer, J. *et al.* Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance. *J. Neurol. Sci.* **318**, 1–18 (2012).
24. Bouchard JP, Barbeau A, Bouchard R, B. R. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Can. J. Neurol. Sci.* **5**, 61–69 (1978).
25. De Braekeleer M, Giasson F, Mathieu J, Roy M, Bouchard J.P. and Morgan K. Genetic epidemiology of Autosomal Recessive Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay in Northeastern Quebec. *Genet. Epidemiol.* **10**, 17–25 (1993).
26. Richter, a *et al.* Location score and haplotype analyses of the locus for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay, in chromosome region 13q11. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 768–75 (1999).
27. El Euch-Fayache, G. *et al.* Phenotypic features and genetic findings in sascin-related autosomal recessive ataxia in Tunisia. *Arch. Neurol.* **60**, 982–8 (2003).
28. Grieco, G. S. *et al.* Novel SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay type. *Neurology* **62**, 103–6 (2004).
29. Vermeer, S. *et al.* ARSACS in the Dutch population: a frequent cause of early-onset cerebellar ataxia. *Neurogenetics* **9**, 207–14 (2008).
30. Synofzik M, Soehn AS, Gburek-Augustat J, Schicks J, Karle KN, Schüle R, Haack TB, Schöning M, Biskup S, Rudnik-Schöneborn S, Senderek J, Hoffmann KT, MacLeod P, Schwarz J, Bender B,

- Krüger S, Kreuz F, Bauer P, Schöls L. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix Saguenay (ARSACS): expanding the genetic, clinical and imaging spectrum. *Orphanet J. Rare Dis.* **8**, 41 (2013).
31. Bouchard, J.-P. in *Handb. Clin. Neurol. 16 Hered. Neuropathies Spinocerebellar Degener.* 451–459 (1991).
  32. Bouchard, J. P. *et al.* Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Neuromuscul. Disord.* **8**, 474–9 (1998).
  33. Bouhlal, Y., Amouri, R., El Euch-Fayeche, G. & Hentati, F. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay: an overview. *Parkinsonism Relat. Disord.* **17**, 418–22 (2011).
  34. Martin, M.-H., Bouchard, J.-P., Sylvain, M., St-Onge, O. & Truchon, S. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay: a report of MR imaging in 5 patients. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* **28**, 1606–8 (2007).
  35. Gerwig, M. *et al.* Characteristic MRI and fundusoscopic findings help diagnose ARSACS outside Quebec. *Neurology* **75**, 2133 (2010).
  36. Baets J, Deconinck T, Smets K, Goossens D, Van den Bergh P, Dahan K, Schmedding E, Santens P, Rasic VM, Van Damme P, Robberecht W, De Meirleir L, Michielsens B, Del-Favero J, Jordanova A, D. J. P. Mutations in SACS cause atypical and late-onset forms of ARSACS. *Neurology* 1181–1188 (2010).
  37. Pyle, A. *et al.* Late-onset saccinopathy diagnosed by exome sequencing and comparative genomic hybridization. *J. Neurogenet.* **27**, 176–82 (2013).
  38. Engert, J. C. *et al.* ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Québec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat. Genet.* **24**, 120–5 (2000).
  39. Ouyang Y, Takiyama Y, Sakoe K, Shimazaki H, Ogawa T, Nagano S, Yamamoto Y, N. I. ( ARSACS ): Expanding the genotype upstream from the gigantic exon. *Neurology* 1103–1104 (2006).
  40. Parfitt, D. a *et al.* The ataxia protein saccin is a functional co-chaperone that protects against polyglutamine-expanded ataxin-1. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1556–65 (2009).
  41. Guernsey, D. L. *et al.* Novel mutations in the saccin gene in ataxia patients from Maritime Canada. *J. Neurol. Sci.* **288**, 79–87 (2010).
  42. Thiffault, I. *et al.* Diversity of ARSACS Mutations in French-Canadians. *Can. J. Neurol. Sci.* **40**, 61–6 (2013).
  43. McMillan, H. J. *et al.* Homozygous contiguous gene deletion of 13q12 causing LGMD2C and ARSACS in the same patient. *Muscle Nerve* **39**, 396–9 (2009).
  44. Kamada, S., Okawa, S., Imota, T., Sugawara, M. & Toyoshima, I. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS): novel compound heterozygous mutations in the SACS gene. *J. Neurol.* **255**, 803–6 (2008).

45. Takado, Y. *et al.* New mutation in the non-gigantic exon of SACS in Japanese siblings. *Mov. Disord.* **22**, 748–9 (2007).
46. S Okawa, M Sugawara, S Watanabe, I. T. A novel saccin mutation in a Japanese woman showing clinical uniformity of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **77**, 279–80 (2006).
47. Yamamoto, Y. *et al.* Novel compound heterozygous mutations in saccin-related ataxia. *J. Neurol. Sci.* **239**, 101–4 (2005).
48. Shimazaki, H., Sakoe, K., Nijima, K., Nakano, I. & Takiyama, Y. An unusual case of a spasticity-lacking phenotype with a novel SACS mutation. *J. Neurol. Sci.* **255**, 87–9 (2007).
49. Hara, K. *et al.* Saccin-related ataxia with neither retinal hypermyelination nor spasticity. *Mov. Disord.* **22**, 1362–3 (2007).
50. Ogawa, T. *et al.* Identification of a SACS gene missense mutation in ARSACS. *Neurology* **62**, 107–9 (2004).
51. K, Hara, Onodera O, Endo M, Kondo H, Shiota H, Miki K, Tanimoto N, Kimura T, N. M. Saccin-related autosomal recessive ataxia without prominent retinal myelinated fibers in Japan. *Mov. Disord.* **20**, 380–382 (2005).
52. Takiyama, Y. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Neuropathology* **26**, 368–375 (2006).
53. Yamamoto, Y. *et al.* Saccin-related ataxia caused by the novel nonsense mutation Arg4325X. *J. Neurol.* **253**, 1372–3 (2006).
54. Romano, A. *et al.* Comparative Analysis and Functional Mapping of SACS Mutations Reveal Novel Insights into Saccin Repeated Architecture. *Hum. Mutat.* (2012). doi:10.1002/humu.22269
55. Prodi, E. *et al.* Supratentorial and pontine MRI abnormalities characterize recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. A comprehensive study of an Italian series. *Eur. J. Neurol.* **20**, 138–46 (2013).
56. H'mida-Ben Brahim, D. *et al.* Molecular diagnosis of known recessive ataxias by homozygosity mapping with SNP arrays. *J. Neurol.* **258**, 56–67 (2011).
57. Yosr Bouhlal, Mourad Zouari, Mounir Kefi, Christiane Ben Hamida, Fayçal Hentati, and Rim Amouri. Autosomal recessive ataxia caused by three distinct gene defects in a single consanguineous family. *J. Neurogenet.* **22**, 139–148 (2008).
58. Ouyang, Y. *et al.* Novel SACS mutation in a Belgian family with saccin-related ataxia. *J. Neurol. Sci.* **264**, 73–6 (2008).
59. Breckpot, J. *et al.* A novel genomic disorder: a deletion of the SACS gene leading to spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Eur. J. Hum. Genet.* **16**, 1050–4 (2008).

60. Dibilio, V. *et al.* Sacsin-Related Spastic Ataxia Caused by a Novel Missense Mutation p.Arg272His in a Patient from Sicily, Southern Italy. *Cerebellum* **12**, 589–92 (2013).
61. Criscuolo, C. *et al.* A novel mutation in SACS gene in a family from southern Italy. *Neurology* **62**, 100–2 (2004).
62. Anesi, L., de Gemmis, P., Pandolfo, M. & Hladnik, U. Two novel homozygous SACS mutations in unrelated patients including the first reported case of paternal UPD as an etiologic cause of ARSACS. *J. Mol. Neurosci.* **43**, 346–9 (2011).
63. Terracciano, A. *et al.* An inherited large-scale rearrangement in SACS associated with spastic ataxia and hearing loss. *Neurogenetics* **10**, 151–5 (2009).
64. Masciullo, M. *et al.* A novel mutation in the SACS gene associated with a complicated form of spastic ataxia. *J. Neurol.* **255**, 1429–31 (2008).
65. Gazulla, J. *et al.* New findings in the ataxia of Charlevoix-Saguenay. *J. Neurol.* **259**, 869–78 (2012).
66. Criscuolo C, Saccà F, De Michele G, Mancini P, Combarros O, Infante J, Garcia A, Banfi S, Filla A, B. J. Novel mutation of SACS gene in a Spanish family with autosomal recessive spastic ataxia. *Mov. Disord.* **20**, 1358–61 (2005).
67. Terracciano, A. & Charlevoix-saguenay, A. O. F. Pseudominant Inheritance of Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Neurology* 1152–1154 (2010).
68. Richter, A. M., Ozgul, R. K., Poisson, V. C. & Topaloglu, H. Private SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) families from Turkey. *Neurogenetics* **5**, 165–70 (2004).
69. Anheim, M. *et al.* [Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay: study of a family and review of the literature]. *Rev. Neurol. (Paris)*. **164**, 363–8 (2008).
70. Anderson, J. F., Siller, E. & Barral, J. M. The saccin repeating region (SRR): a novel Hsp90-related supra-domain associated with neurodegeneration. *J. Mol. Biol.* **400**, 665–74 (2010).
71. Kozlov, G. *et al.* Structural basis of defects in the saccin HEPN domain responsible for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *J. Biol. Chem.* **286**, 20407–12 (2011).
72. Lim, J. *et al.* A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* **125**, 801–14 (2006).
73. Girard, M. *et al.* Mitochondrial dysfunction and Purkinje cell loss in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 1661–6 (2012).
74. Exner, N., Lutz, A. K., Haass, C. & Winklhofer, K. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J.* **31**, 3038–62 (2012).

75. Selak, M. a *et al.* Blood cells from Friedreich ataxia patients harbor frataxin deficiency without a loss of mitochondrial function. *Mitochondrion* **11**, 342–50 (2011).
76. Cassereau, J. *et al.* Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics* **10**, 145–50 (2009).
77. P. Hemachandra Reddy; Peizhong Mao; and Maria Manczak. Mitochondrial Structural and Functional Dynamics in Huntington’s Disease. *Brain Res. Rev.* **61**, 33–48 (2009).
78. Orth, M. & Schapira, a H. Mitochondria and degenerative disorders. *Am. J. Med. Genet.* **106**, 27–36 (2001).
79. Itoh K, Nakamura K, Iijima M, S. H. Mitochondrial Dynamics in Neurodegeneration. *Trends Cell. Biol.* **23**, 64–71 (2013).
80. Chaturvedi, R. K. & Flint Beal, M. Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic. Biol. Med.* **63**, 1–29 (2013).
81. Alexander, C. *et al.* OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.* **26**, 211–5 (2000).
82. Delettre, C. *et al.* Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* **26**, 207–10 (2000).
83. Kijima, K. *et al.* Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum. Genet.* **116**, 23–7 (2005).
84. Griparic, L. & van der Bliek, a M. The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic* **2**, 235–44 (2001).
85. Karbowski, M. & Youle, R. J. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ.* **10**, 870–80 (2003).
86. Rambold, A. S., Kostecky, B., Elia, N. & Lippincott-schwartz, J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *PNAS* **108**, 10190–5 (2011).
87. Goizet, C. *et al.* REEP1 mutations in SPG31: frequency, mutational spectrum, and potential association with mitochondrial morpho-functional dysfunction. *Hum. Mutat.* **32**, 1118–27 (2011).
88. Westermann, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 872–84 (2010).
89. Powers, S. K., Wiggs, M. P., Duarte, J. a, Zegeroglu, a M. & Demirel, H. a. Mitochondrial signaling contributes to disuse muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **303**, E31–9 (2012).
90. Waterham, H. R. *et al.* A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1736–41 (2007).

91. Baxter, R. V *et al.* Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat. Genet.* **30**, 21–2 (2002).
92. Claramunt, R. *et al.* Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J. Med. Genet.* **42**, 358–65 (2005).
93. Cuesta, A. *et al.* The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat. Genet.* **30**, 22–5 (2002).
94. Chen, H. & Chan, D. C. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* **18**, R169–76 (2009).
95. Frederick, R. L., McCaffery, J. M., Cunningham, K. W., Okamoto, K. & Shaw, J. M. Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J. Cell Biol.* **167**, 87–98 (2004).
96. Varadi, A. *et al.* Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J. Cell Sci.* **117**, 4389–400 (2004).
97. Augustine, B. Y. G. J., Charlton, M. P. & Smith, S. J. Calcium entry and transmitter release at voltage-clamped nerve terminals of Squid. *J. Physiol.* **367**, 163–181 (1985).
98. Peschanski, M. Transmission synaptique : le calcium sous haute surveillance. *medecine/sciences* **10**, 106–107 (1994).
99. Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **15**, 2922–2933 (2001).
100. Gulbins, E., Dreschers, S. & Bock, J. Role of mitochondria in apoptosis. *Exp. Physiol.* **88**, 85–90 (2003).
101. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1–13 (2009).
102. Lemasters, J. J. Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Rejuvenation Res.* **8**, 3–5 (2005).
103. Wang, Y., Nartiss, Y., Steipe, B., McQuibban, G. A. & Kim, P. K. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy* **8**, 1462–76 (2012).
104. Tyedmers, J., Mogk, A. & Bukau, B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 777–88 (2010).
105. Ghavami, S. *et al.* Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog. Neurobiol.* **112**, 24–49 (2014).
106. Scarffe, L. a, Stevens, D. a, Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends Neurosci.* 1–10 (2014). doi:10.1016/j.tins.2014.03.004

107. Chazotte, B. Labeling mitochondria with TMRM or TMRE. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2011**, 895–7 (2011).
108. Frank, S. *et al.* The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* **1**, 515–25 (2001).
109. Estaquier, J. & Arnoult, D. Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ.* **14**, 1086–94 (2007).
110. Gianotti, T. F. *et al.* A decreased mitochondrial DNA content is related to insulin resistance in adolescents. *Obesity (Silver Spring)*. **16**, 1591–5 (2008).
111. Plon, S. E. *et al.* Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum. Mutat.* **29**, 1282–1291 (2008).
112. Desmet, F.-O. *et al.* Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* **37**, e67 (2009).
113. Ekstrand, M. I. *et al.* Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 935–44 (2004).
114. Wojtovich AP, B. P. The endogenous mitochondrial complex II inhibitor malonate regulates mitochondrial ATP sensitive potassium channels: implications for ischemic preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 882–889 (2008).
115. Penefsky, H. S. Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin : Relationship to ATP synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 1589–1593 (1985).
116. Bleazard, W. *et al.* The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* **1**, 298–304 (1999).
117. MacArthur, D. G. *et al.* Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature* **508**, 469–76 (2014).
118. Savitsky, K. *et al.* A Single Ataxia Telangiectasia Gene with a Product Similar to P1-3 Kinase. *Science (80-. )*. **268**, 1749–1753 (1995).
119. Stern, N. *et al.* Accumulation of DNA damage and reduced levels of nicotine adenine dinucleotide in the brains of Atm-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **277**, 602–8 (2002).
120. Waldmann, T. A. & McIntire, R. K. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with Ataxia Telangiectasia. *Lancet* **25**, 1112–1115 (1972).
121. Chun, H. H. & Gatti, R. a. Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst)*. **3**, 1187–96 (2004).
122. Date, H. *et al.* Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat. Genet.* **29**, 184–188 (2001).

123. Moreira, M. *et al.* The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT / Zn-finger protein aprataxin. *Nat. Genet.* **29**, 189–193 (2001).
124. Hirano M *et al.* DNA single-strand break repair is impaired in aprataxin-related ataxia. *Ann. Neurol.* **61**, 162–174 (2007).
125. Ber, I. Le *et al.* Muscle coenzyme Q10 deficiencies in ataxia with oculomotor apraxia 1. *Neurology* **23**, 295–297 (2007).
126. Tranchant, C., Fleury, M., Moreira, M. C., Koenig, M. & Warter, J. M. Phenotypic variability of aprataxin gene mutations. *Neurology* **60**, 868–870 (2003).
127. Criscuolo C, Mancini P, Menchise V, Sacca F, De Michele G, B. S. Very late onset in ataxia oculomotor apraxia type I. *Ann. Neurol.* **57**, 777 (2005).
128. Le Ber, I. *et al.* Frequency and phenotypic spectrum of ataxia with oculomotor apraxia 2: a clinical and genetic study in 18 patients. *Brain* **127**, 759–67 (2004).
129. Asaka, T., Yokoji, H., Ito, J., Yamaguchi, K. & Matsushima, a. Autosomal recessive ataxia with peripheral neuropathy and elevated AFP: novel mutations in SETX. *Neurology* **66**, 1580–1 (2006).
130. Anheim, M. *et al.* Ataxia with oculomotor apraxia type 2: clinical, biological and genotype/phenotype correlation study of a cohort of 90 patients. *Brain* **132**, 2688–98 (2009).
131. Tsaousidou, M. K. *et al.* Sequence Alterations within CYP7B1 Implicate Defective Cholesterol Homeostasis in Motor-Neuron Degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 510–515 (2008).
132. Goizet, C. *et al.* CYP7B1 mutations in pure and complex forms of hereditary spastic paraplegia type 5. *Brain* **132**, 1589–600 (2009).
133. Schüle, R. *et al.* Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in SPG5 patients with hereditary spastic paresis. *J. Lipid Res.* **51**, 819–23 (2010).
134. Li-Hawkins, J., Lund, E. G., Turley, S. D. & Russell, D. W. Disruption of the oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice. *J. Biol. Chem.* **275**, 16536–42 (2000).
135. Lavie J, Pilliod J, Durand CM, Durr A, Forlani S, Babin PJ, Tingaud-Sequeira A, KnollGellida A, André M, Arveiler B, Lacombe D, Brice A, Stevanin G, Coupry I, Goizet C. Les mutations de CYP7B1/SPG5 dans les paraplegies spastiques héréditaires sporadiques. in *6ème Assises Génétique Hum. Médicale, Marseille*
136. Julie Lavie, Julie Pilliod, Angele Tingaud, Foudil Lamari, Pharm D, Magali Bordier, Paola Galli, Guillaume Banneau, Christelle Durand, Cécile Cazeneuve, Fanny Mochel, Perrine Charles, Sylvie Odent, Amir Boukhris, Christelle Thauvin, Sylvie Forlani, C. Goizet. Molecular and biochemical characterization of SPG5 patients and development of a zebrafish model. *en Prep.*
137. Bouhlal, Y., El Euch-Fayeche, G., Hentati, F. & Amouri, R. A novel SACS gene mutation in a Tunisian family. *J. Mol. Neurosci.* **39**, 333–6 (2009).

138. Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombès, A. & Rojo, M. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J. Cell Sci.* **117**, 2653–62 (2004).
139. Guan, K., Farh, L., Marshall, T. K. & Deschenes, R. J. Normal mitochondrial structure and genome maintenance in yeast requires the dynamin-like product of the MGM1 gene. *Curr. Genet.* **24**, 141–148 (1993).
140. Jones, B. a & Fangman, W. L. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev.* **6**, 380–389 (1992).
141. Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. & Westermann, B. Fzo1p Is a Mitochondrial Outer Membrane Protein Essential for the Biogenesis of Functional Mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 20150–20155 (1998).
142. Amati-Bonneau, P. *et al.* OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy “plus” phenotypes. *Brain* **131**, 338–51 (2008).
143. Chen, H. *et al.* Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* **160**, 189–200 (2003).
144. Chen, H., McCaffery, J. M. & Chan, D. C. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* **130**, 548–62 (2007).
145. Parone, P. a *et al.* Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One* **3**, e3257 (2008).
146. Greene, J. C. *et al.* Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4078–83 (2003).
147. Lutz, a K. *et al.* Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *J. Biol. Chem.* **284**, 22938–51 (2009).
148. Wang, H. *et al.* Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease. *J. Biol. Chem.* **286**, 11649–58 (2011).
149. Wang, H., Lim, P. J., Karbowski, M. & Monteiro, M. J. Effects of overexpression of huntingtin proteins on mitochondrial integrity. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 737–52 (2009).
150. Williams, P. a, Morgan, J. E. & Votruba, M. Mouse models of dominant optic atrophy: what do they tell us about the pathophysiology of visual loss? *Vision Res.* **51**, 229–34 (2011).
151. Verhoeven, K. *et al.* MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain* **129**, 2093–102 (2006).
152. Cartoni, R. & Martinou, J.-C. Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp. Neurol.* **218**, 268–73 (2009).

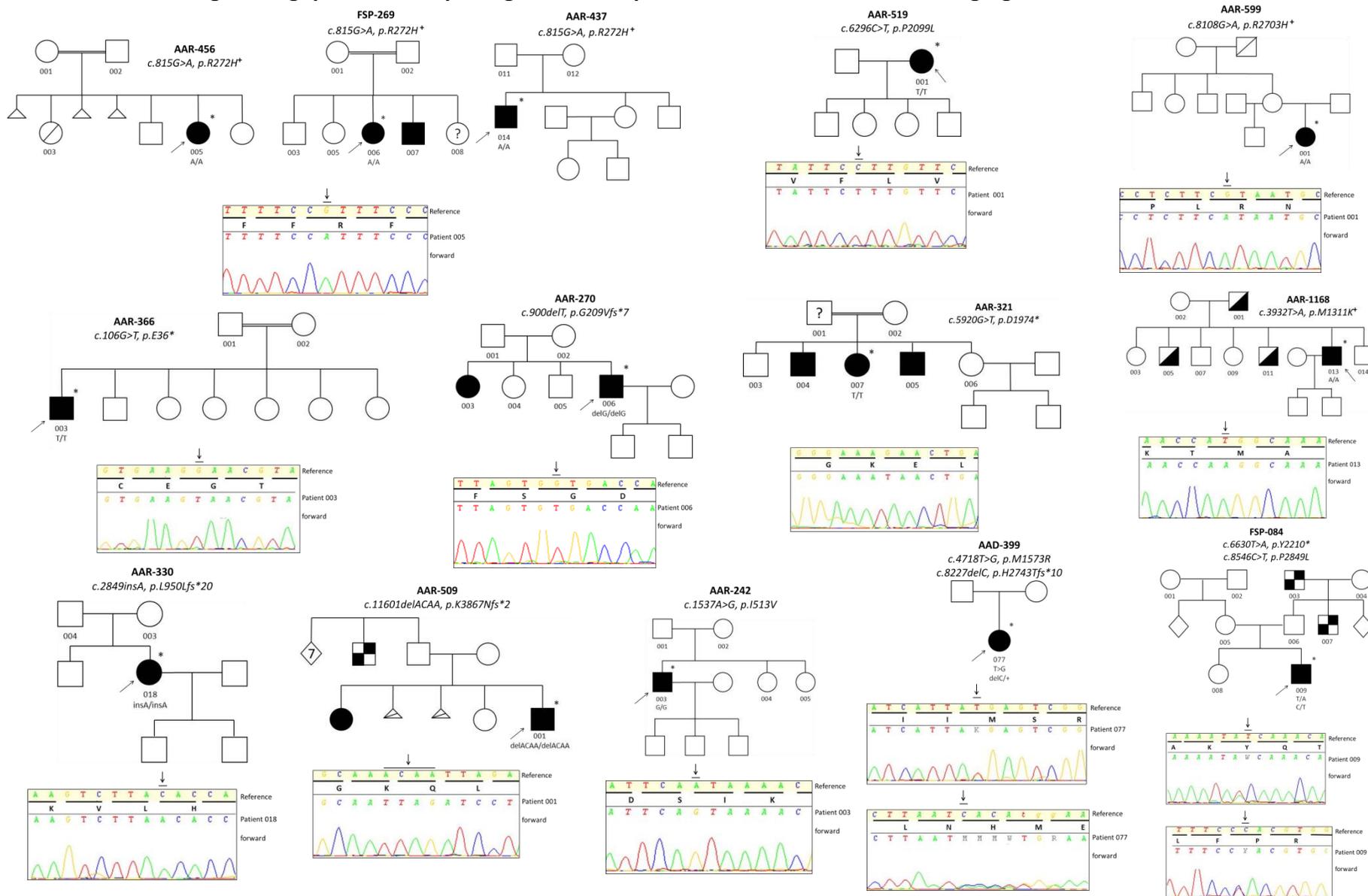
153. Ranieri, M. *et al.* Mitochondrial fusion proteins and human diseases. *Neurol. Res. Int.* **2013**, 293893 (2013).
154. Detmer, S. a & Chan, D. C. Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J. Cell Biol.* **176**, 405–14 (2007).
155. Tesson, C. *et al.* Alteration of fatty-acid-metabolizing enzymes affects mitochondrial form and function in hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 1051–64 (2012).
156. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F. & Youle, R. J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* **183**, 795–803 (2008).
157. Twig, G. *et al.* Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* **27**, 433–46 (2008).
158. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. & Youle, R. J. Parkin-induced mitophagy in the pathogenesis of Parkinson disease. *Autophagy* **5**, 706–708 (2009).
159. Krebiehl, G. *et al.* Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson’s disease-associated protein DJ-1. *PLoS One* **5**, e9367 (2010).
160. Marc Liesa, Manuel Palaci, and A. Z. Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease. *Physiol. Genomics* 799–845 (2009). doi:10.1152/physrev.00030.2008.

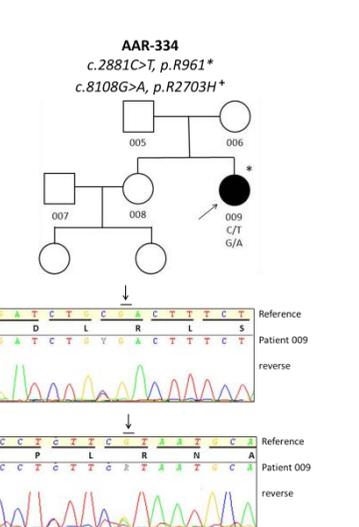
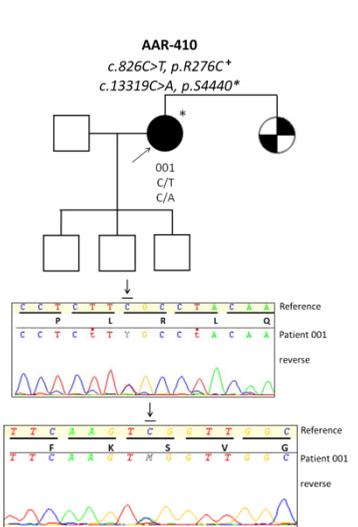
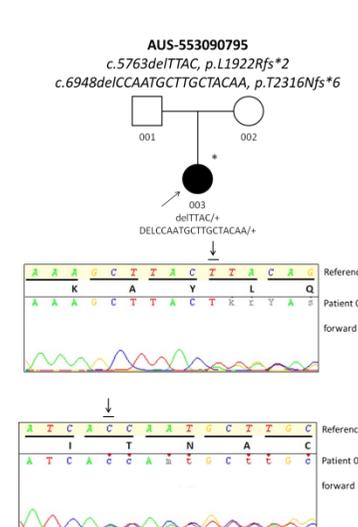
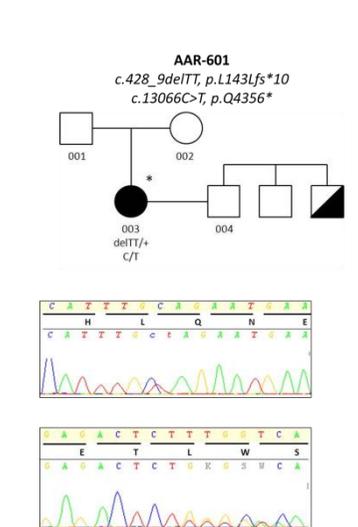
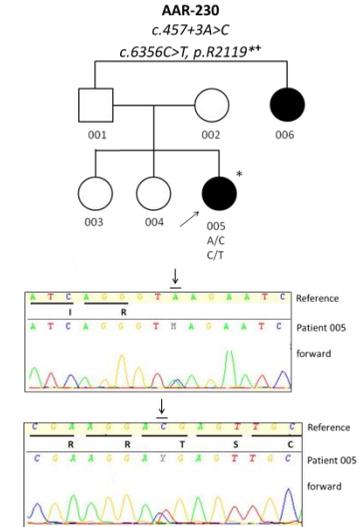
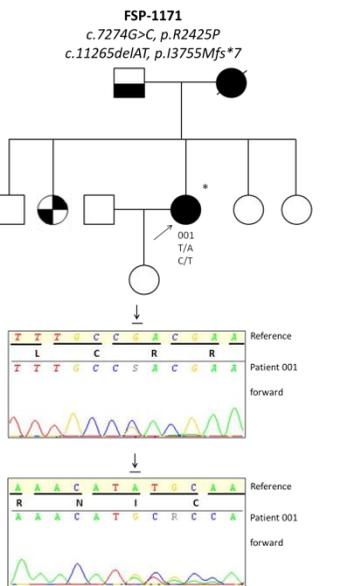
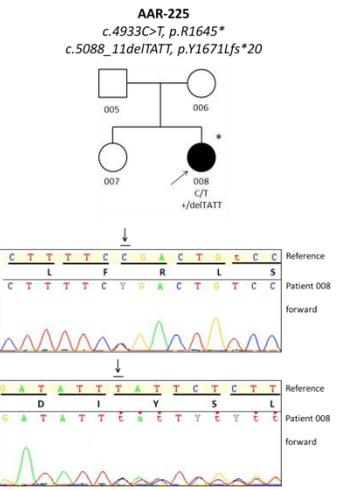
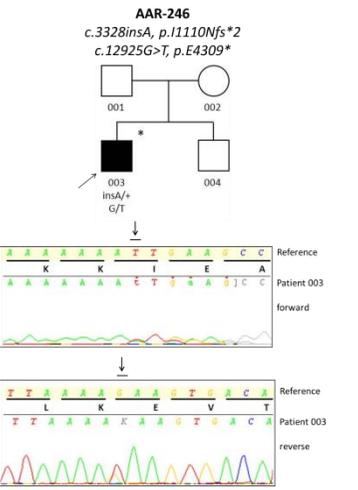
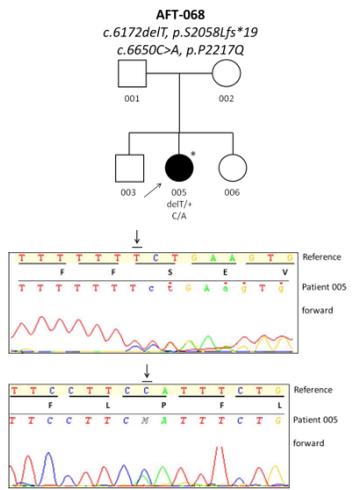
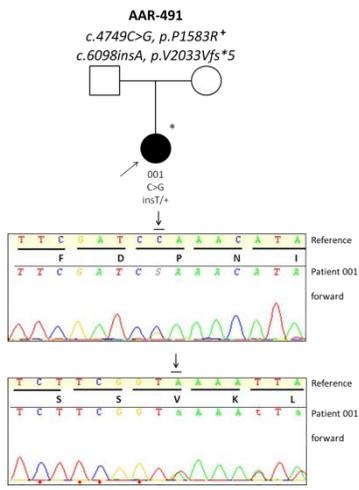
# Annexes

### Annexe 1 : Amorces de PCR utilisées pour l'amplification du gène SACS

Exon	Sous-groupe	Amorce sens 5'-3'	Amorce antisens 5'-3'	Taille attendue
<b>1 +5'-UTR</b>		GGCCCTCTCAATGAGGAAT	TCATTTGGGAAAATCCAACAA	687
<b>2</b>		CGATGTGGGAGAGGTAACG	ACGCTGCCGGAGTCATTC	380
<b>3</b>		CAGTATTAGAGACTGTATTGCTTTTCA	TTGTGCAACCCAACATGGTA	188
<b>4</b>		TGGTGACAATTCATGGGATTT	CACAGAGGTATAATACAGCTATTTGAA	278
<b>5</b>		TGTTGCAAATAGTGGGTTTCC	TCATTA AAAACTGCCTGTTAGTGC	297
<b>6</b>		GATCTCCTTGAGATAGAACAGAACACC	CACCTCTGAAGTTAACCAAATACA	300
<b>7</b>	A	TTTAATGGCTCATGCTTTTTCA	TGGGACAAATTTTCAGTTCATCA	747
	B	GGTTGGTGTGTAACAGTGTGG	AGCATCCACATTCCTGGTA	656
	C	AGCTGTGACTGGGTCAGGTT	AAAATCGACATAGAAAACCATTGA	505
<b>8</b>		TCGGCTTAACTGACTTGAAAA	GCTTGAGCCATAAGAAATTGTTG	299
<b>9</b>	A	CAACCTTCAATTTTGTATAAGAGGA	CCTTCCAGTACTGTATTATTGTGA	742
	B	ACACAAAGATGCCCTGAGGA	AGATGATTGCAACAGTGTGTGA	742
	C	CCTTACAGGTCGGTGCTTGT	TGTTTGCTTTCTTGTTCACTGAG	727
	D	AAACCATGGCAAAAATCCAC	CAAAGCAGGTCCATGACAAG	641
	E	ATGCAAATGCAACAGAATGC	AATGCTTTGGAAGAGCAGGA	712
	F	ACCAACCCAGTTTAGCACA	TAAATCAGGATCGGGCCATA	747
	G	CTGAGTGTCTTACGGGACCTG	TGACACTGCACGTTCTAGCAT	735
	H	TGGGAGATTCCCTTATGGTTC	CCGCCTCAAAATTTAAATGAA	719
	I	TGAAGCCTTGATGCAAAATG	CAGATTTCTGTGCCTTTGC	714
	J	GGGCAGAAAGAAAAATTGACC	CCATCTGTGATTTTGCCCTTT	749
	K	GCTCAGATGGGGCAGAACT	CGGTAACTGGGAAAAACGA	709
	L	CGGTATTTCCCTGGTTCTGA	AACTGGGTCGTTTTGCATC	725
	M	GAGATTGAAGTTGAGGGATTGC	TGAAATACATCAAAAGTGCCTCA	736
	N	TAGAGAGCCCCACAAGCATC	GAATTCACCCAGGATGTCA	692
	O	GCTTCCTGAAAAATTGTTTATTCC	ACCCCTCGCAACTGAAAAAC	729
	P	ATGCAACATAACGACGTTGG	CAACGCTCCAAACTGACAAA	721
	Q	GGAAAGACCATGGATTTACA	TCACCACCTTCAGCATCAAC	721
R	GCACACCATTCTGTCTGA	TCGTTGCTTCTTGATTCCAT	750	
S +3'-UTR		TCCAGACGAACATTTTCAACC	TCTCCAAGAACAATCTGCAATG	741
T1 +3'-UTR		GCACGAATAAATTGCTGTACTTC	GAAAATAACGCATCCAAGAGG	428
T2 +3'-UTR		GGAGCTAATGAAACACTGGACA	CACACAAACATAAAGCAAGTGTCT	426
U +3'-UTR		CAGGCTTCTGTTTGTATGAAG	TTGATTTCCAATGAACTATTTCTCA	704

## Annexe 2 : Arbres généalogique et électrophorégammes des patients SPATAX sans étude de ségrégation familiale.





### Annexe 3 : Récapitulatif des patients en fonction du grade de diagnostic

Patients	Classes	Diagnostic
AAD-366	5 + 5	DEFINITIF
AAR-104	5 + 5	DEFINITIF
AAR-104	5 + 5	DEFINITIF
AAR-270	5 + 5	DEFINITIF
AAR-509	5 + 5	DEFINITIF
AFT-079	5 + 5	DEFINITIF
AFT-079	5 + 5	DEFINITIF
AAR-321	5 + 5	DEFINITIF
AAR-330	5 + 5	DEFINITIF
MAR-7444	5 + 5	DEFINITIF
MAR-7444	5 + 5	DEFINITIF
AAR-246	5 + 5	DEFINITIF
AAR-225	5 + 5	DEFINITIF
BOR-09711	5 + 5	DEFINITIF
AAR-545	5 + 5	DEFINITIF
AAR-601	5 + 5	DEFINITIF
AUS-553090795	5 + 5	DEFINITIF
01017AI	5 + 5	DEFINITIF
13003TL	5 + 5	DEFINITIF
10012RB	5 + 5	DEFINITIF
13006CD	5 + 5	DEFINITIF
13006CD	5 + 5	DEFINITIF
FSP-084	5 + 4	PROBABLE
AAR-230	5 + 4	PROBABLE
AAR-410	5 + 4	PROBABLE
AAR-429	5 + 4	PROBABLE
AAR-429	5 + 4	PROBABLE
AAD-399	5 + 2	PROBABLE

Patients	Classes	Diagnostic
AAR-491	5 + 4	PROBABLE
FSP-1171	5 + 4	PROBABLE
SAL-399	5 + 4	PROBABLE
01023MO	5 + 3	PROBABLE
AAR-334	5 + 4	PROBABLE → DEFINITIF
AFT-068	5 + 4	PROBABLE → DEFINITIF
ANG-120054380	5	POSSIBLE → DEFINITIF
ANG-120054380	5	POSSIBLE → DEFINITIF
AAR-235	4 + 4	POSSIBLE
AAR-235	4 + 4	POSSIBLE
FSP-770	4 + 4	POSSIBLE
FSP-770	4 + 4	POSSIBLE
AAR-599	4 + 4	POSSIBLE
FSP-1168	4 + 4	POSSIBLE
AAR-456	4 + 4	POSSIBLE → DEFINITIF
AAR-437	4 + 4	POSSIBLE → DEFINITIF
FSP-269	4 + 4	POSSIBLE → DEFINITIF
AAR-519	4 + 4	POSSIBLE → DEFINITIF
AAR-242	2 + 2	NEGATIF → DEFINITIF

En gris sont indiqués les apparentés malades et en orange sont indiqués les patients diagnostiqué avec le bio-marqueur mitochondrial

## **A practical grading definition for the diagnosis of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay**

Julie Pilliod<sup>1</sup>, Sébastien Moutton<sup>1,2</sup>, Julie Lavie<sup>1</sup>, Elise Maurat<sup>1</sup>, Christophe Hubert<sup>3</sup>, Nadège Bellance<sup>1</sup>, Mathieu Anheim<sup>4,5,6</sup>, Sylvie Forlani<sup>8</sup>, Fanny Mochel<sup>7,8</sup>, Karine N’Guyen<sup>9</sup>, Christel Thauvin-Robinet<sup>10</sup>, Christophe Verny<sup>11</sup>, Dan Milea<sup>12</sup>, Gaëtan Lesca<sup>13</sup>, Michel Koenig<sup>14</sup>, Diana Rodriguez<sup>15,16,18</sup>, Nada Houcinat<sup>2</sup>, Julien Van-Gils<sup>2</sup>, Agnès Guichet<sup>19</sup>, Magalie Barth<sup>19</sup>, Dominique Bonneau<sup>19</sup>, Philippe Convers<sup>20</sup>, Elisabeth Maillart<sup>21</sup>, Lucie Guyant-Marechal<sup>22</sup>, Didier Hannequin<sup>22</sup>, Guillaume Fromager<sup>23</sup>, Alexandra Afenjar<sup>15,17</sup>, Sandra Chantot-Bastaraud<sup>15,17</sup>, Stéphanie Valence<sup>15,18</sup>, Perrine Charles<sup>7</sup>, Patrick Berquin<sup>24</sup>, Caroline Rooryck<sup>1,2</sup>, Julie Bouron<sup>2</sup>, Alexis Brice<sup>7,8</sup>, Didier Lacombe<sup>1,2</sup>, Rodrigue Rossignol<sup>1</sup>, Giovanni Stevanin<sup>7,8,25</sup>, Giovanni Benard<sup>1</sup>, Lydie Burglen<sup>15,16,17</sup>, Alexandra Durr<sup>7,8</sup>, Isabelle Coupry<sup>1</sup>, and Cyril Goizet<sup>1,2\*</sup>

1 Université de Bordeaux, Laboratoire Maladies Rares: Génétique et Métabolisme, EA4576, Bordeaux, France

2 CHU Pellegrin, Service de Génétique Médicale, Bordeaux, France

3 Université de Bordeaux, Centre de Génomique Fonctionnelle, Bordeaux, France

4 Service de Neurologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

5 IGBMC, INSERM U964/CNRS-UMR7104, Université de Strasbourg, Illkirch, France

6 Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, France

7 APHP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Service de Génétique, Paris, France

8 Institut du Cerveau et de la Moelle, INSERM U1127, CNRS UMR7225, Sorbonne Universités – UPMC Université Paris VI UMR\_S1127, Paris France,

9 Hôpital de la Timone, Département de Génétique Médicale, Marseille, France

10 CHU Dijon, Centre de Génétique, Dijon, France

11 Université LUNAM, UMR CNRS 6214 – INSERM U1083 and Service de neurologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

12 CHU d’Angers, Service d’Ophtalmologie, Angers, France and Singapore National Eye Centre, Singapore Eye Research Institute, Duke-NUS, Singapore

- 13 CHU de Lyon, Service de Génétique, Lyon, France
- 14 INSERM U827, Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHRU Montpellier, Montpellier, France
- 15 Centre de Référence Maladies Rares “malformations et maladies congénitales du cervelet”, APHP, Hôpital Armand Trousseau, Paris, France
- 16 INSERM U1141, Hôpital Robert Debré, Paris, France
- 17 APHP, Hôpital Armand Trousseau, Service de Génétique, Paris, France
- 18 APHP, Hôpital Armand Trousseau, Service de Neuropédiatrie et Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, Paris, France
- 19 Université LUNAM, UMR CNRS 6214 – INSERM U1083 and Département de Biochimie et Génétique, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France
- 20 CHU Saint-Etienne, Service de Neurophysiologie Clinique, Saint-Etienne, France
- 21 APHP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Service de Neurologie, Paris, France
- 22 CHU de Rouen, Unité de Génétique Clinique, Rouen, France
- 23 Neurologue, Caen, France
- 24 CHU Amiens, Centre d’activité de neurologie pédiatrique, Amiens, France
- 25 Ecole Pratique des Hautes Etudes, Laboratoire de Neurogénétique, Paris, France

\*Corresponding author: Cyril Goizet, Laboratoire Maladies Rares: Génétique et Métabolisme (MRGM), EA4576, 2ème étage Ecole de Sages-Femmes, Hôpital Pellegrin, 33076 Bordeaux cedex, France

E-mail: [cyril.goizet@chu-bordeaux.fr](mailto:cyril.goizet@chu-bordeaux.fr)

Running title: Grading definition for ARSACS diagnosis

## **ABSTRACT**

Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) is a recessive autosomal neurodegenerative disorder characterized by cerebellar ataxia, spastic paraplegia, and demyelinating sensitivo-motor polyneuropathy. ARSACS is caused by mutations in the *SACS* gene, which was identified in 2000. Since then, an increasing number of cases have been reported worldwide. *SACS* encodes sascin, a protein whose function remains unknown, despite the description of numerous protein domains and of the recent focus on its potential role in the regulation of mitochondrial physiology. This study aimed to identify new mutations in a large population of ataxic patients and then to functionally analyze their cellular effects in the mitochondrial compartment. We identified two variants of *SACS* in 10% of analyzed cases (n=321), collected through the international SPATAX network. We also found biallelic *SACS* mutations in five non-progressive ataxia patients of the ATAXIC project (n=156), and studied another case harboring a large deletion encompassing the entire *SACS* gene identified by pan-genomic CGH array. For functional analyses, primary cultures of fibroblasts were obtained from 11 patients. A drastic and recurrent alteration of the mitochondrial network was observed in all patients except one. These anomalies could be used as a trait biomarker for the diagnosis of ARSACS when molecular results are difficult to interpret (i.e., missense variants). Based on our findings, we propose a grading diagnostic definition using clinical, genetic, and cellular criteria for ARSACS.

**Keywords: Ataxia, ARSACS, mitochondrial network, biomarker**

## INTRODUCTION

First described 40 years ago in the regions of Charlevoix and Saguenay-Lac-St-Jean in Quebec, Canada, autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) (MIM# 270550) is classically characterized by a triad of slowly progressive early-onset cerebellar ataxia, lower limb pyramidal tract features (spasticity and Babinski's signs) and axonal-demyelinating sensorimotor peripheral neuropathy (Bouchard, 1991; Yamamoto *et al.*, 2005; Takiyama, 2006; Vermeer *et al.*, 2008; Synofzik *et al.*, 2013). The clinical spectrum of typical features also includes retinal changes, urinary symptoms, progressive cerebellar atrophy, and linear hypo-intensities in the pons on brain magnetic resonance imaging (MRI), which are considered as hallmarks of the disease (Martin *et al.*, 2007; Garcia-Martin *et al.*, 2013; Yu-Wai-Man *et al.*, 2014). Studies have revealed that ARSACS is present worldwide with variable prevalence and phenotypic expression (Vermeer *et al.*, 2008; Bouhlal *et al.*, 2011; Synofzik *et al.*, 2013).

ARSACS is caused by mutations in *SACS*, a large gene with a coding region >12 kb, located on chromosome 13q12.12 (Bouchard *et al.*, 1998; Engert *et al.*, 2000). More than 100 mutations have been described to date, essentially leading to a premature stop codon (Bouhlal *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2012). The encoded protein saccin is composed of several domains: Ubiquitin-like, Hsp90-like, XPCB, DnaJ, HEPN, and the Saccin Repeating Region (Engert *et al.*, 2000; Parfitt *et al.*, 2009; Anderson *et al.*, 2010; Romano *et al.*, 2012). The precise function of saccin remains largely unknown, but its partial localization to mitochondria has been demonstrated (Parfitt *et al.*, 2009). More recently, hyperfused morphology of the mitochondrial network was observed in immortalized fibroblasts of two ARSACS patients and in cell models (Girard *et al.*, 2012), as well as in a *Sacs* knockout mice model (Larivière *et al.*, 2014), emphasizing a potential role of saccin in mitochondrial physiology.

We report here a large series of 47 ARSACS patients from 39 families. In addition to the extended description of their clinical and mutational spectrum, we also observed recurrent mitochondrial network anomalies in primary cultures of skin fibroblasts obtained from 10 of them. Considering these anomalies, we propose a practical diagnostic grading definition aimed at validating variants of uncertain clinical significance (VUS) as pathogenic mutations to establish a definite diagnosis of ARSACS.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Subjects**

A cohort of 321 patients with spastic ataxia was selected through the collection of the European and Mediterranean network for spinocerebellar degenerations (SPATAX, <http://spatax.wordpress.com>). Clinical criteria for inclusion of the patients were the presence of cerebellar ataxia and lower leg pyramidal tract involvement with an age at onset younger than 45 years and the absence of ataxia in the parental generation. In all cases, Friedreich ataxia was previously excluded.

In parallel, 156 patients suffering from congenital ataxia were investigated through the “ATAXIC” research project. Clinical criteria for inclusion of the patients were early-onset ataxia before age 2 years and absence of impairment of ataxia at the time of inclusion.

One final patient, 12436B-JAM-001, a 12-year-old girl suffering from congenital ataxia diagnosed at age 1.5 years was included. Examination revealed severe ataxia with very slow ocular saccades. She had no intellectual deficiency. Brain MRI was normal. The course of neurological anomalies was stable over years. Walking without support was possible, but running was impossible. A genomic 13q12.12 deletion of approximately 1.5 Mb encompassing the whole *SACS* gene was identified on routine pan-genomic CGH-array analysis (Human660-Quad v1.0 DNA Analysis BeadChip, Illumina). The diagnosis of ARSACS was then suspected.

All patients gave written informed consent to participate in genetic studies, according to the Declaration of Helsinki. The investigations fulfilled our institutions’ ethical rules for human studies (RBM 01-29, RBM 03-48 for SPATAX and patient 12436B-JAM-001 and Ile de France IX ethics committee approval No. IDRCB 2010-A00715-34 for ATAXIC)

### **Cell cultures**

Fibroblasts were obtained from skin biopsies in 11 patients. Primary culture cells (patient and control fibroblasts) were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in glucose medium consisting of DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 U/ml penicillin/streptomycin.

### **Mutation screening**

*SACS* direct sequencing

The coding sequence and exon-intron boundaries of the nine coding exons of *SACS* (Genbank accession number NM\_014363) were amplified by PCR. The amplicons were sequenced in both directions using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v1 (Applied Biosystems) in an ABI Prism 3130XL automated sequencer. The electrophoretic profiles were analyzed with Seqscape v2.7 (Applied Biosystems). Primers sequences and conditions for PCR and sequencing are available from the authors upon request. After identification of a variant, reamplification and resequencing were systematically performed in a new DNA aliquot, and segregation with the disease was verified by direct sequencing of the mutated amplicons in additional family members when available. Variant nomenclature was based on the *SACS* transcript reference NM\_014363.5. Mutation numbering system was based on cDNA or protein sequence as suggested by the internationally agreed mutation nomenclature ([www.hgvs.org/](http://www.hgvs.org/)).

### *Next generation sequencing*

To search for disease-causing mutations in patients presenting with congenital ataxia, either targeted (144 patients) or whole-exome (12 patients born from consanguineous parents) sequencing was used.

Targeted sequencing aimed to search for mutations in 35 genes involved in various forms of ataxia was performed by using the Access Array device from Fluidigm (PCR multiplex method using a microfluidic support) optimized by Integragen to increase the level of multiplexing. Thus, 48 pools of 48 PCRs for 48 samples were designed, allowing us to obtain 110,592 amplifications by Access Array and 2304 amplicons per sample. PCR products from each sample corresponding to the different libraries were sequenced on a MiSeq Sequencer (Illumina).

Whole-exome sequencing was performed using Agilent in-solution enrichment methodology to capture 50-Mb exons (SureSelect Human All Exon v5 kit, Agilent), followed by 75 paired-end bases massively parallel sequencing on an HiSEQ 2000 (Illumina).

Variants were initially filtered to search for nonsynonymous variants, canonical splice acceptor and donor site mutations, and coding insertions/deletions (indels) with a frequency below 1% in the databases (Integragen in-house exomes, dbSNP132, HapMap, 1000 Genome Project, Exome Variant Server), assuming that synonymous and frequent variants were far less likely to be pathogenic.

### **mRNA and cDNA analysis**

Extraction of total RNA from primary culture cells was performed using the RNeasy Mini kit (Qiagen), using the separation method with Qiazol-chloroform following the manufacturer's instructions. Reverse transcription of 1 µg of total RNA was performed with the SuperScript double-strand kit (Invitrogen) to obtain double-strand cDNA. cDNA was amplified by PCR in a thermocycler VWR R1732-1200 (VWR International). Primer sequences and conditions for PCR are available from the authors upon request. PCR products were separated on a 3% agarose gel.

### **Mitochondrial morphology analysis**

The analysis of mitochondrial morphology was performed on living cells stained with MitoTracker Green (Invitrogen). Briefly, the cells were stained with MitoTracker Green 150 nM for 20 min at 37°C, and Z-stack imaging (1000 µm) was performed on a Zeiss microscope (AxioVision) with a 63× objective. The number of images was adapted to the width of each cell determined individually. Cells were grown in glucose medium on a 4-well Lab-Tek plate. One hundred cells per experimental condition (ARSACS patients vs. control) were selected randomly, and the global mass of the mitochondrial network was evaluated. The fluorescence intensity of the mitochondrial network was measured with morphometric software (ImageJ, National Institutes of Health). This allowed the region of interest to be manually selected and the area occupied by the selected pixels to be calculated.

### **Measuring mitochondrial membrane potential**

Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was measured by quantification of tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM, Invitrogen) fluorescence as described by [Chazotte \(2011\)](#). TMRM is a potential-sensitive dye used to measure  $\Delta\Psi_m$ , which is generated by oxidative phosphorylation and is thus an indicator of mitochondrial function ([Frank \*et al.\*, 2001](#); [Estaquier \*et al.\*, 2007](#)). The probe, used here at a concentration of 5 nM, was added in the cell medium and incubated for 20 min at 37°C. Cells were washed in PBS and fluorescence was quantified with MorphoPro software (Safran Morpho).

### **Measuring mitochondrial respiration**

The rate of mitochondrial respiration was measured on skin fibroblasts by polarography (OXY1, Hansatech). The routine (endogenous) respiration was measured on 1 million cells

placed in DMEM. The inhibition of the respiration was performed by the addition of two drugs, antimycin (5  $\mu$ M) and rotenone (0.1 mM).

### **Real-time qPCR**

Extraction of DNA from primary culture cells was performed using a blood and tissue kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions.

The measurement of mitochondrial DNA content by real-time qPCR was performed using IQTM SYBR Green supermix (Bio-Rad) on a thermocycler CFX96 Touch Real-Time PCR system (Bio-Rad), as described by [Gianotti \*et al.\* \(2008\)](#).

Detailed information regarding mutation screening by next-generation sequencing, *in silico* interpretation of genetic variants, detection of gene dosage anomalies, and microsatellite marker analysis is provided in the Supporting Information Methods.

## **RESULTS**

### **Identification of point mutations**

Direct sequencing of *SACS* performed in 321 index patients from the SPATAX network allowed us to identify 60 variants not referred as polymorphisms in the databases (dbSNP, [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/), 1000 Genomes) in 50 patients (15.6%,  $n=50/321$ ) and in seven of their relatives also included in this study (Table 1, Supplementary Table 1, Supplementary Fig. 1). According to earlier recommendations on variant classification graded to a five-class system ([Plon \*et al.\*, 2008](#)), 29 nonsense or indel variants expected to product a premature termination codon were classified as VUS class 5 (definitely pathogenic), all of them novel except p.R2119\*, p.Y3430\*, and p.R3792\* ([Hara \*et al.\*, 2007](#); [Bouhlal \*et al.\*, 2008](#); [H'mida-Ben Brahim \*et al.\*, 2011](#)). One variant was a new splicing mutation in intron 5 (c.457+3A>C) that dramatically decreased the score of the donor splice site of exon 5 (0.57 vs. 1 for the wild type), when analyzed with Splice Site Prediction by Neural Network. Moreover, Mutation Taster analysis predicted this variant as pathogenic, leading us to classify it as a VUS class 5. The remaining 30 variants were 25 missense variants (including 14 classified as VUS class 4 [likely pathogenic], three variants as VUS class 3 [uncertain pathogenicity], and eight as VUS class 2 [likely not pathogenic]) and five synonymous variants classified as VUS class 1 (not pathogenic). Four of the VUS class 4 were reported previously: p.R272H, p.R276C, p.M1311K, and p.P1583R ([Ouyang \*et al.\*, 2008](#); [Romano \*et al.\*, 2012](#); [Prodi \*et al.\*, 2012](#); [Dibilio \*et al.\*, 2013](#)). In our series, p.R272 appeared substituted in three unrelated index

patients from different geographical origins (AAR-456, AAR-437, and AAR-269). Analyses of microsatellite markers located in or close to *SACS* revealed three different haplotypes (Supplementary Fig. 2). In 17 patients, variants were in the homozygous state, whereas 16 patients were compound heterozygous (Table 1). In addition, we noted a single heterozygous variant in 17 patients, missense variants in 11 patients, and synonymous variants in five patients (Supplementary Table 1). The last one (ANG-120054380-003) was carrying a single heterozygous frameshift of VUS class 5, with normal customized CGH-array (Supplementary Fig. 3) and mRNA analyses (data not shown). This truncating mutation was maternally inherited and also present in his affected sister. The segregation of mutations was demonstrated in all seven available families, in whom index cases carried two VUS class 4 and 5, adding six affected relatives to our large series of patients (Supplementary Fig. 1).

Next-generation sequencing in 156 patients with congenital ataxia from the ATAXIC project led to identify seven mutations in five index patients (3.2%,  $n=5/156$ ) and in one relative (Table 1, Supplementary Fig. 1). All mutations were confirmed by Sanger direct sequencing and included six truncating mutations, either nonsense or ins/del, and one missense VUS class 3. The substituted residue was highly conserved during evolution, and *in silico* prediction showed modification of ESE scores. Mutations were demonstrated to segregate in the two available families (Supplementary Fig. 1).

Sanger direct sequencing of patient 12436B-JAM-001 DNA and cDNA, carrying the genomic deletion (Supplementary Fig. 3), failed to find a second point mutation.

### **Characterization of the mitochondrial network morphology**

Primary culture of skin fibroblasts were obtained from 11 patients carrying different types of variations: eight patients carrying biallelic VUS exclusively of class 5 and 4 (MAR-7444-007, BOR-090711-003, AAR-545-003, AAR-601-003, AAR-437-014, AAR-519-001, AAR-334-009 and AFT-068-005), one patient (AAR-242-003) with a homozygous VUS class 2 (mutation p.I513V), patient ANG-120054380-003 with a cosegregating monoallelic VUS class 5, and patient 12436B-JAM-001 with a genomic deletion. Skin fibroblasts of all patients but one (12436B-JAM-001) displayed altered mitochondrial morphology, with bulbed mitochondria as compared to controls (Fig. 1). Furthermore we performed a relative quantification of the global mass of the mitochondrial network using fluorescence intensity measurement of the MitoTracker labeling, except on patient AAR-437-014 (Fig. 2A). Each patient, except 12436B-JAM-001, displayed a decrease of the mitochondrial mass ranging

from 17% to 55% (Fig. 2B). To confirm this decrease, we quantified the mitochondrial and nuclear DNAs using quantitative PCR assays. The mtDNA/nDNA ratio analysis revealed a decrease of mtDNA quantity ranging from 14% to 67%, concordant with the results of fluorescence experiments (Fig. 2C).

We observed a defect in MitoTracker incorporation in fibroblasts of patient AAR-437-014 (Fig. 2E). The abnormal fluorescence in these fibroblasts possibly was related to  $\Delta\Psi_m$  anomalies. To measure  $\Delta\Psi_m$ , the potential-sensitive dye TMRM is classically used (Fig. 2E). Fibroblasts of patient AAR-437-014 revealed a decrease of  $30\% \pm 4\%$  in TMRM fluorescence (Fig. 2F). This result suggests an impaired mitochondrial energetic function in this patient.

In order to verify any mitochondrial energetic deficiency, we analyzed mitochondrial oxygen consumption in five patients (AAR-242-003, AAR-437-014, AAR-545-003, AFT-068-005, and ANG-120054380-003) carrying different classes of VUS. No modification of basal oxygen consumption rate was observed in four of them, but the mitochondrial oxygen consumption was strongly reduced ( $51\% \pm 5\%$ ) in the fibroblasts of AAR-437-014 (Fig. 2D), in agreement with the observed alteration of  $\Delta\Psi_m$ .

### **Clinical and paraclinical characteristics of ARSACS patients**

The diagnosis of ARSACS was finally established in 34 index patients included from SPATAX (10.6%,  $n=34/321$ ) and in five index patients included from the ATAXIC cohort (3.2%,  $n=5/156$ ). In addition, eight affected relatives (including the sister of patient ANG-120054380-003) were also included in our clinical study. Overall, a total of 47 ARSACS patients from 39 families were included (Supplementary Table 2). Twenty-two probands were from France, including two patients with origins associated with either Maghreb or Poland; nine were from Algeria; two from Morocco; two from Portugal; one each from Australia, Italy, and Turkey; and one of unknown origin. Consanguinity was reported in 27% ( $n=10/37$ ); 62% of affected individuals ( $n=29/47$ ) were females and 38% ( $n=18/47$ ) were males.

The mean age at onset was  $5.1 \pm 7.4$  years, ranging from birth to age 30 years; 83% had onset before age 10 years and 72% before 5 years (Table 2 and Supplementary Table 2). Notably, five index patients and one relative displayed a phenotype of congenital ataxia and two patients presented an atypical late onset after 25 years. Unsteadiness was the most frequent feature at onset (96%;  $n=43/45$ ) either isolated (80%;  $n=36/45$ ) or associated with stiff legs (11%;  $n=5/45$ ). Only two patients complained of isolated stiff legs at onset (5%,  $n=2/42$ ). The mean age of patients was  $29.7 \pm 12.9$  (8–53) years and the mean disease

duration was  $24.3 \pm 12.5$  years. According to the Spinocerebellar Degeneration Functional Score (SDFS), which rates the disability stages from 0 (asymptomatic) to 7 (bedridden) (Anheim *et al.*, 2010), 17% of our patients ( $n=7/42$ ) were mildly (SDFS=1–2) affected (mean age  $21.3 \pm 14.6$ ), 28% ( $n=12/42$ ) were moderately (SDFS=3) affected (mean age  $27.7 \pm 12.0$ ), and 55% ( $n=23/42$ ) were severely (SDFS=4–7) affected (mean age  $35.2 \pm 10.5$ ) including eight wheelchair bound and one bedridden (mean age  $36.5 \pm 12.6$ , range 16–53). After age 30, 25% of the patients ( $n=6/24$ ) were wheelchair bound. Frequencies of the different features are presented in Table 2. All patients had static and kinetic ataxia. Spasticity was present in 63% in lower limbs and 12% in upper limbs. Hearing loss, abnormal auditory evoked potentials and epilepsy were rarely noted. Difficulties at school possibly related to mild intellectual disability were noted in 51% of patients, but neuropsychological evaluations were very rarely available (Supplementary Table 2). Fundus examination was available for 16 patients and detected retinal nerve fiber layer hypertrophy of axonal fibers in only three of them (19%). In these patients, retinal nerve fiber hypertrophy was more pronounced close to the optic disk in its superior and inferior parts rather than the nasal and temporal regions (Fig. 3). In two of them (patients ANG-120054380-003 and AUS-553090795-003), these clinical data were confirmed by optical coherence tomography. Brain MRI was performed in 41 patients and was considered as normal in two of them (AAR-491-001 and AAR-321-007, but performed at age 7 in the last case). Vermis atrophy with upper predominance was found in 39 patients, while cerebellum hemispheres were affected in 23. T2/FLAIR linear hypointensities were detected in the pons in 19 patients, and lateral hyperintensities and enlargement of middle cerebellar peduncles were present in seven and nine patients, respectively. Perithalamic T2/FLAIR hyperintensities were noted in five patients (Fig. 4). Electromyoneurography revealed sensorimotor polyneuropathy in 97% of patients ( $n=36/37$ ), either axonal ( $n=9/36$ , 25%), demyelinating ( $n=19/36$ , 53%), or both ( $n=5/36$ , 14%); no precise data were available for the three remaining patients.

Among the six patients with a phenotype of congenital ataxia, mean age at onset was  $1.1 \pm 0.1$  years and mean age at evaluation was  $10.7 \pm 2.3$ . The mean disease duration was  $9.6 \pm 7.4$  years, leading to a mild disability score (SDFS=2/7) in the three patients for whom the data were available. The oldest patient from this group was a 14-year-old boy (10012RB) who manifested only a very early non-progressive mild static and kinetic ataxia (SARA evaluated at 6/40 at age 14) associated with partial epilepsy that occurred at age 10, demyelinating

sensorimotor neuropathy, and linear hypointensities in the pons and upper vermis atrophy on brain MRI.

## DISCUSSION

ARSACS is currently considered as one of the most frequent spastic ataxia worldwide after Friedreich ataxia and Ataxia Telangiectasia (Vermeer *et al.*, 2008; Bouhlal *et al.*, 2011; Anheim *et al.*, 2012; Synofzik *et al.*, 2013). Most of the SACS mutations described from Quebec are private, with an increasing number of missense variants described since 2008 (Vermeer *et al.*, 2008; Bouhlal *et al.*, 2011; Synofzik *et al.*, 2013). As a deleterious effect of these missense variants has rarely been demonstrated through functional assays (Anderson *et al.*, 2010; Kozlov *et al.*, 2011), they would have been classified as VUS rather than pathogenic mutations (Plon *et al.*, 2008, Synofzik *et al.*, 2013). Because false assignments of pathogenicity can bring about serious consequences for patients, in terms of prognostic, therapeutic, and/or reproductive advice, most of the guidelines for implicating sequence variants in human disease more often advise experimental approaches to investigate the impact of a sequence variant on gene function, cell or organism phenotype. Moreover, they strongly suggest that evidence derived directly from patient tissue or cells, rather than model systems, could be particularly informative (MacArthur *et al.*, 2014). The main goal of our work consisted of searching for a trait biomarker specific of ARSACS after the identification of a large series of ARSACS patients from two separate cohorts of ataxic patients.

In the first step, we identified biallelic SACS variants in 38 families, 33 of 321 index cases (10.2%) presenting with sporadic or autosomal recessive ataxia and spasticity with onset <45 years, and in five of 156 probands with congenital ataxia (3.2%), that is, patients presenting with very early onset nonprogressive ataxia or with a tendency to improve with age (Table 1). Importantly, half of these variants were VUS  $\leq$  class 4 leading to uncertain interpretation. A great majority were novel, although we also found some recurrent ones including p.R272H identified in three unrelated families. The different haplotypes in our three cases argue against a founder effect related to an ancestral mutation, and there are previous reports of p.R272C in four Canadian families (Guernsey *et al.*, 2010, Thiffaut *et al.*, 2013) and p.R272H in an Italian family (Dibilio *et al.*, 2013). Thus, p.R272 appears to be a mutational hot-spot in SACS. Alternatively, we also identified some patients who carried a single heterozygous SACS variant (Supplementary Table 1). Notably, a unique patient (ANG-

120054380-003) was demonstrated to carry a heterozygous nonsense mutation (VUS class 5) inherited from his mother and by his affected sister (Table 1). Finally, patient 12436B-JAM-001, carrying a heterozygous genomic deletion encompassing the whole *SACS* gene, had no additional point mutation on the second allele.

Sacsin was first shown to be cytoplasmic, with 30% localized at or near the cytoplasmic face of the mitochondria in SHSY-5Y cells (Parfitt *et al.*, 2009). A colocalization with mitochondrial markers was confirmed in cultured hippocampal neurons, COS-7, and HeLa cells (Girard *et al.*, 2012). The presence of balloon-like or bulbed mitochondria indicative of a hyperfused mitochondrial phenotype was also observed in immortalized fibroblasts of two patients homozygous for the truncating mutation c.8844delT, the major founder mutation in Quebec. In SHSY-5Y and using 3D confocal reconstructions coupled to fluorescence recovery after photobleaching, sacsin knockdown led to a more interconnected mitochondrial network. Moreover, a moderate decrease in TMRM fluorescence intensity and a slower MitoTracker fluorescence recovery compared to control suggesting impaired mitochondrial energetic functions were observed. Finally, knockdown of sacsin in primary hippocampal cultures revealed aberrant clustering and accumulation of mitochondria in the soma and proximal dendrites as well reduced density of dendrites. Very recently, spinal cord motor neurons cultured from *Sacs*<sup>-/-</sup> knockout mice exhibited abnormal accumulation of non-phosphorylated neurofilament bundles with significant reduction in mitochondrial motility and elongated mitochondria (Larrivière *et al.*, 2014). According to the suggested role of sacsin in the maintenance of mitochondrial morphology and function, we analyzed whether morphological and functional alterations of mitochondria may occur in primary cultures of fibroblasts. We found a drastic altered mitochondrial network with numerous balloon-like or bulbed mitochondria in 10 of the 11 studied patients, including eight patients harboring two VUS of class 4 or higher, patient AAR-242-003 carrying a homozygous VUS class 2, and patient ANG-120054380-003 harboring a single heterozygous VUS class 5 (Tables 1 and 2). Conversely, in patient 12436B-JAM-001, carrying a heterozygous genomic deletion comprising the *SACS* gene, we did not find any mitochondrial abnormalities. These results confirm previous observations in other cell types (Parfitt *et al.*, 2009; Girard *et al.*, 2012) and strongly suggest that an abnormally fused mitochondrial network is a distinctive phenotype in primary culture of fibroblasts of ARSACS patients.

Together with the alteration of mitochondrial morphology, we also measured a concomitant decrease of mitochondrial mass. Yet, these alterations had no impact on the

global mitochondrial respiratory function. Girard *et al.* (2012) reported that saccin is required for normal mitochondrial function but not for mitochondrial respiratory function. However, we observed that fibroblasts carrying the p.R272H homozygous missense mutation (AAR-437-14) displayed altered mitochondrial respiration, membrane potential, and morphology. This mutation is located in the sub-repeat 1 (sr1) domain of saccin. Saccin contains three sr domains (sr1–3) (Anderson *et al.*, 2010), which form the Saccin Internal RePeaTs (SIRPTs) (Romano *et al.*, 2012). This sr1 contains a histidine kinase-like ATPase and mutations in this domain display higher SPAX score, which evaluates phenotype severity (Romano *et al.*, 2012). These data support our findings that p.R272 might play an important role in the saccin-dependent mitochondrial phenotype. It would be interesting to analyze whether the two other families carrying this mutation display the same severe mitochondrial phenotype.

Specific disruptions of mitochondrial dynamics and transport lead to severe neurodegenerative diseases (Orth *et al.*, 2001; Liesa *et al.*, 2009; Chaturvedi and Flint Beal, 2013; Ranieri *et al.*, 2013). For instance, a direct alteration of the balance caused by complete inactivation of the dynamin-like protein 1 (DLP1 or DRP1), the central actor for regulating mitochondrial fission, is implicated in a severe form of encephalopathy with microcephaly, abnormal brain development, optic atrophy, and hypoplasia (MIM# 603850) (Waterham *et al.*, 2007). Although similar abnormalities have also been demonstrated in hereditary spastic paraplegia type 31 (SPG31) (OMIM#610250) (Goizet *et al.*, 2011) and in SPG56 (OMIM #615030, named SPG49 by the HUGO nomenclature) (Tesson *et al.*, 2012), the potential direct or indirect roles in the dysregulation of fission or fusion of the mutated proteins REEP1 and CYP2U1, respectively, are still unknown. However, the clinical spectrum of these latter conditions, dominated by a pyramidal syndrome of the lower legs with progressive spasticity, is clearly distinguishable from ARSACS clinical presentation. A mild cerebellar ataxia has only been reported in a few patients with SPG31 after long duration of the disease (Goizet *et al.*, 2011).

Regarding the clinical data, our study clearly confirm in a large series that most ARSACS patients manifest with the typical presentation following a slowly progressive course with unsteadiness as a sign at onset, sometimes responsible for mild motor milestones delay, associated with spasticity during childhood and neuropathy during the teenage years (Table 2) (Duquette *et al.*, 2013). Alternatively, we also highlight that atypical ARSACS with late onset, with atypical features (such as hearing loss, increased auditory evoked potential latencies, and epilepsy), or with at least one of the core features missing may be found (Table

2) (Baets *et al.*, 2010; Bouhjalal *et al.*, 2011; Synofzik *et al.*, 2013). Notably, the disease of two patients (AAR-334-009 and AAR-519-001) initiated with early-onset lower limb spasticity that remained isolated for 16 and 8 years, respectively, before the occurrence of ataxia. We also extend the spectrum of atypical ARSACS to congenital ataxia (Supplementary Table 2). The course of the disease was dramatically stable for all these latter patients, with the longest disease duration of 14 years. Patients with congenital ataxia may display brain MRI abnormalities generally observed in typical ARSACS. In such atypical cases, the diagnosis of ARSACS, even in the presence of two mutations in *SACS* may be particularly challenging, illustrating the interest of a trait biomarker that can help lead to the diagnosis.

In summary, the classical triad associating early-onset ataxia, lower limb spasticity, and peripheral polyneuropathy is frequently but not systematically found in all ARSACS patients (Synofzik *et al.*, 2013). We have expanded the spectrum of ARSACS-related phenotypes, which now encompass congenital ataxia, and mutations in *SACS*, highlighting potential difficulties of interpreting molecular results facing atypical presentations in a routine diagnosis practice. We thus recommend analyzing *SACS* facing ataxia, spastic ataxia and spastic paraplegia, independently of the age at onset and the course of the disease. However VUS class  $\leq 4$  are frequently identified in *SACS*, leading to inconclusive molecular diagnosis in routine practice. Moreover, brain MRI and ENMG anomalies, even highly, but not exclusively, suggestive features of ARSACS, may be missing in some patients, and for this reason cannot be used as trait biomarker. We therefore propose a practical grading definition integrating the presence of an altered mitochondrial network in primary culture of fibroblasts as a major criterion helping to definitely establish the diagnosis of ARSACS (Fig.5). Based on this grading definition, we retained the diagnosis of definite ARSACS in 31 patients (from 26 families), probable ARSACS in 10 patients (from nine families), and possible ARSACS in six patients (from four families) (Fig. 6). Specifically, the presence of an altered mitochondrial network prompted us to validate the diagnosis of definite ARSACS in two families (AAR-242 carrying a homozygous VUS class 2, and ANG-120054380 carrying only one VUS class 5), and to exclude it in patient 12436B-JAM-001, for whom molecular results would have been highly difficult to conclude in a routine diagnosis practice. It is credible that those families would have been diagnosed as not having ARSACS at all. Since next generation sequencing will become the most common molecular diagnosis tool, leading to the identification of increasing number of VUS class  $\leq 4$  variants, it will be very appealing to link our proposed grading to it.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to the family members who generously contributed their time and materials for this research. We would also like to thank Fabien Lesne for his technical contribution, and Anne Richer, Frédéric Sedel, Alina M. Tataru, Andre Troiano and Shekeeb Mohammad for their collaboration.

## **FUNDING**

This work was financially supported by the Agence Nationale de la Recherche (Projects ANR-09-MNPS-032/SPAX and ANR 13-ISV1-0002-01/SPATAX-QUEST), the Ministère de la Santé (PHRC 2009, AOM 09178), the VERUM Foundation, the Fondation Roger de Soelberg, the Fondation Maladies Rares, the Association Strumpell-Lorrain (2011-0135), the Association Connaître les Syndromes Cérébelleux, and the Union Nationale des Aveugles et Deficients Visuels.

## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

### **Mutation screening**

#### *Next-generation sequencing*

Illumina pipeline used for bioinformatics analysis included CASAVA1.8.2 allowing alignment of reads to a reference genome (hg19), calls of SNPs based on the allele calls and read depth, and detection of variants (SNPs and indels). The alignment algorithm used was ELANDv2 (performs multiseed and gapped alignments). Only the positions included in the bait coordinates were conserved. Genetic variations annotation was realized from IntegraGen in-house pipeline. It consists of gene annotations (RefSeq), known polymorphisms (dbSNP 132, 1000 Genome, EVS), followed by a mutation characterization (exonic, intronic, silent, nonsense, etc.). For each position, the exomic frequencies (homo and heterozygotes) are determined from all the exomes already sequenced at IntegraGen, and the exome results provided by 1000G Project, EVS, and HapMap. Results were provided per sample in tabulated text files. We also performed a coverage/depth statistical analysis for the whole exome and exon per exon. Minimum average depth on the exome is around 50×. All the data could be visualized and filtered in ERIS (Exome Resequencing Intelligent Sorter), the web interface developed by IntegraGen (<http://eris.integragen.com/>).

#### ***In silico* interpretation of genetic variants**

Synonymous, missense, and splice site variations were systematically evaluated for modifications of exonic splicing enhancer (ESE) (ESE Finder 3.0 algorithm available at <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>) or splicing consensus sequences (Splice Site Prediction by Neural Network at [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) and Splice Score Calculation at [http://rulai.cshl.edu/new\\_alt\\_exon\\_db2/HTML/score.html](http://rulai.cshl.edu/new_alt_exon_db2/HTML/score.html)). Multiple alignments of orthologs of *SACS* in various species were performed using ClustalW software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) for the analysis of the conservation of affected amino acids. The possible impact of missense variations were predicted with Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), SIFT ([http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_enst\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html)), and PROVEAN software ([http://provean.jcvi.org/genome\\_submit.php](http://provean.jcvi.org/genome_submit.php)).

### **Detection of gene dosage anomalies**

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using standard protocols. We used a custom targeted 44K Agilent array to fine map the breakpoints of the deletions. Custom arrays comprised 40582 probes, with 2939 probes covering 800 Kb of the 13q12 region including the *SACS* gene (median resolution of 270 bp between two probes). DNA was labeled (cyanine 3 or cyanine 5) using the Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (Agilent Technologies) and hybridized onto the microarrays according to the manufacturer's instructions. Scanning of the microarrays was performed using a G2565CA scanner (Agilent Technologies). Data analysis was carried out with Feature Extraction 10.7.3.1 for the fluorescence ratio calculation and Agilent Genomic Workbench 6.0.130.24 for the localization of chromosomal imbalances and annotation of the deleted regions (both Agilent Technologies). Deletions and duplications in the heterozygous state were characterized by values of the log<sub>2</sub> ratio of fluorescence intensities (cyanine5/cyanine3) below -0.5 and above +0.3, respectively, with the statistical algorithm ADM2 used at a threshold of 5. Deletion breakpoints were mapped to the UCSC genome browser, hg19.

### **Microsatellite markers analysis**

Haplotypes of three patients carrying the same p.R272H missense homozygous mutation were defined using four microsatellite markers flanking *SACS* on chromosome 13 (D13S232, D13S292, D13S787, and D13S1243), and one intragenic marker. This latter was searched for in the complete *SACS* genomic sequence using the Repeat Masker software ([www.repeatmasker.org/](http://www.repeatmasker.org/)). We found a GT repeat in the first intron. Specific primers were then designed with primer3 (msatFSACS 5'-CACACCCTTTTGTGCTGAAGG-3' and msatRSACS 5'-CGCATGGCAATATCACAGTC-3' at [http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)). These markers were selected from the NCBI-UniSTS website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>). Following amplification by PCR, fluorescently labeled products were analyzed on ABI Prism 3730 automated sequencer. Peak analysis was performed by Genemapper Analysis Software (Applied Biosystems).

## REFERENCES

- Anderson JF, Siller E, Barral JM. The sarsin repeating region (SRR): a novel Hsp90-related supra-domain associated with neurodegeneration. *J Mol Biol* 2010; 400(4): 665-74.
- Anheim M, Fleury M, Monga B, Laugel V, Chaigne D, Rodier G, *et al.* Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, eastern France: implications for clinical management. *Neurogenetics* 2010; 11(1): 1-12.
- Anheim M, Tranchant C, Koenig M. The autosomal recessive cerebellar ataxias. *N Engl J Med* 2012; 366(7): 636-6.
- Baets J, Deconinck T, Smets K, Goossens D, Van den Bergh P, Dahan K, *et al.* Mutations in SACS cause atypical and late-onset forms of ARSACS. *Neurology* 2010; 75: 1181-8.
- Bouchard JP. Recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. In: de Jong JMBV, editor. *Hereditary neuropathies and spinocerebellar atrophies. Handbook of clinical neurology*, vol. 16. Amsterdam: Elsevier; 1991. p. 451-9.
- Bouchard JP, Richter A, Mathieu J, Brunet D, Hudson TJ, Morgan K, *et al.* Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Neuromuscul Disord* 1998; 8: 474-9.
- Bouhlal Y, Zouari M, Ben Hamida C, Hentati F, Amouri R. Autosomal recessive ataxia caused by three distinct gene defects in a single consanguineous family. *J Neurogenet* 2008; 22: 139-48.
- Bouhlal Y, Amouri R, El Euch-Fayeche G, Hentati F. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay: an overview. *Parkinsonism & Related Disorders* 2011; 17: 418-22.
- Chaturvedi R, Flint Beal M. Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic Biol Med* 2013; 63: 1-29.
- Chazotte B. Labeling mitochondria with TMRM or TMRE. *Cold Spring Harbor Protoc.* 2011; 7: 895-7.
- Dibilio V, Cavalcanti F, Nicoletti A, Mostile G, Bruno E, Annesi G, *et al.* Sarsin-related spastic ataxia caused by a novel missense mutation p.Arg272His in a patient from Sicily, southern Italy. *Cerebellum* 2013; 12: 589-92.
- Duquette A, Brais B, Bouchard J-P, Mathieu J. Clinical presentation and early evolution of spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Mov Disord* 2013; 28(14): 2011-4.

- Engert JC, Bérubé P, Mercier J, Doré C, Lepage P, Ge B, *et al.* ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Québec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat Genet* 2000; 24: 120-5.
- Estaquier J, Arnoult D. Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1086-94.
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, *et al.* The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 2001; 1: 515-25.
- Garcia-Martin E, Pablo LE, Gazulla J, Vela A, Larrosa JM, Polo V, *et al.* Retinal segmentation as noninvasive to demonstrate hyperplasia in ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(10): 7137-42.
- Gianotti TF, Sookoian S, Dieuzeide G, García SI, Gemma C, González CD, *et al.* A decreased mitochondrial DNA content is related to insulin resistance in adolescents. *Obesity* 2008; 16: 1591-5.
- Girard M, Larivière R, Parfitt DA, Deane EC, Gaudet R, Nossova N, *et al.* Mitochondrial dysfunction and Purkinje cell loss in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 1661-6.
- Goizet C, Depienne C, Benard G, Boukhris A, Mundwiller E, Solé G, *et al.* REEP1 mutations in SPG31: frequency, mutational spectrum, and potential association with mitochondrial morpho-functional dysfunction. *Hum Mutat* 2011; 32: 1118-27.
- Guernsey D-L, Dubé MP, Jiang H, Asselin G, Blowers S, Evans S, *et al.* Novel mutations in the saccin gene in ataxia patients from Maritime Canada. *J Neurol Sci* 2010; 288: 79-87.
- Hara K, Shimbo J, Nozaki H, Kikugawa K, Onodera O, Nishizawa M. Saccin-related ataxia with neither retinal hypermyelination nor spasticity. *Mov Disord* 2007; 22: 1362-3.
- H'mida-Ben Brahim D, M'zahem A, Assoum M, Bouhlal Y, Fattori F, Anheim M, *et al.* Molecular diagnosis of known recessive ataxias by homozygosity mapping with SNP arrays. *J Neurol* 2011; 258: 56-67.
- Koslov G, Denisov AY, Girard M, Dicaire MJ, Hamlin J, McPherson PS, *et al.* Structural basis of defects in the saccin HEPN domain responsible for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *J Biol Chem* 2011; 286(23): 20407-12.

- Larivière R, Gaudet R, Gentil BJ, Girard M, Conte TC, Minotti S, *et al.* [Sacs knockout mice present pathophysiological defects underlying autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay.](#) Hum Mol Genet 2014 Sep 26. pii: ddu491. [Epub ahead of print]
- Liesa M, Palacín M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. Physiol Rev 2009; 89: 799-845.
- MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, Rehm HL, Shendure J, Abecasis GR, *et al.* Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. Nature 2014; 508: 469-76.
- Martin M-H, Bouchard J-P, Sylvain M, St-Onge O, Truchon S. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay: a report of MR imaging in 5 patients. Am J Neuroradiol 2007; 28: 1606-8.
- Orth M, Schapira A. Mitochondria and degenerative disorders. Am J Med Genet 2001; 106(1): 27-36.
- Ouyang Y, Segers K, Bouquiaux O, Wang FC, Janin N, Andris C, *et al.* Novel SACS mutation in a Belgian family with sascin-related ataxia. J Neurol Sci 2008; 264: 73-6.
- Parfitt D, Michael GJ, Vermeulen EG, Prodromou NV, Webb TR, Gallo JM, *et al.* The ataxia protein sascin is a functional co-chaperone that protects against polyglutamine-expanded ataxin-1. Human Mol Genet 2009; 18: 1556-65.
- Plon S, Eccles M, Easton D, Foulkes WD, Genuardi M, Greenblatt MS, *et al.* Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. Hum Mutat 2008; 29(11): 1282-91.
- Prodi E, Grisoli M, Panzeri M, Minati L, Fattori F, Erbetta A, *et al.* Supratentorial and pontine MRI abnormalities characterize recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay: a comprehensive study of an Italian series. Eur J Neurol 2012; 20(1): 138-46.
- Ranieri M, Brajkovic S, Riboldi G, Ronchi D, Rizzo F, Bresolin N, *et al.* Mitochondrial fusion proteins and human diseases. Neurol Res Int 2013; 2013: 293893.
- Romano A, Tessa A, Barca A, Fattori F, de Leva MF, Terracciano A, *et al.* Comparative analysis and functional mapping of SACS mutations reveal novel insights into sascin repeated architecture. Hum Mutat 2012; 34(3): 525-37.
- Synofzik M, Soehn A, Gburek-Augustat J, Schicks J, Karle KN, Schüle R, *et al.* Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS): expanding the genetic, clinical and imaging spectrum. Orphanet J Rare Diseases 2013; 8: 41.

- Takiyama Y. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Neuropathology* 2006; 26(4): 368-75.
- Tesson C, Nawara M, Salih M, Rossignol R, Zaki MS, Al Balwi M, *et al.* Alteration of fatty-acid-metabolizing enzymes affects mitochondrial form and function in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet* 2012; 91: 1051-64.
- Thiffault I1, Dicaire MJ, Tetreault M, Huang KN, Demers-Lamarche J, Bernard G, *et al.* Diversity of ARSACS mutations in French-Canadians. [Can J Neurol Sci](#). 2013; 40(1): 61-6.
- Vermeer S, Meijer RP, Pijl BJ, Timmermans J, Cruysberg JR, Bos MM, *et al.* ARSACS in the Dutch population: a frequent cause of early-onset cerebellar ataxia. *Neurogenetics* 2008; 9: 207-14.
- Waterham HR, Koster J, van Roermund CW, Mooyer PA, Wanders RJ, Leonard JV. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *New Engl J Med* 2007; 356: 1736-41.
- Yamamoto Y, Hiraoka K, Araki M, Nagano S, Shimazaki H, Takiyama Y, *et al.* Novel compound heterozygous mutations in sarsin-related ataxia. *J Neurol Sci* 2005; 239(1): 101-4.
- Yu-Wai-Man P, Pyle A, Griffin H, Santibanez-Korev M, Horvath R, Chinnery PF. Abnormal retinal thickening is a common feature among patients with ARSACS-related phenotypes. *Br J Ophthalmol* 2014; 98(5): 711-3.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1** Mitochondrial network using MitoTracker labeling. The mitochondrial network of the ARSACS patient's skin cells was observed by fluorescence microscopy (**C–K**) and revealed hyperfused tubules as compared to control skin fibroblasts (**A, B**). Magnified images are presented (**a–k**) and show the balloon-like (arrows) and the bulbed mitochondria (arrowheads) characteristic of a hyperfused phenotype.

**Figure 2** Mitochondrial abnormalities in skin fibroblasts. Cells obtained from the patients (**A**) and the control, were labeled using the MitoTracker Green to measure the whole cell surface. (**B**) The measure of fluorescence intensity was realized for 10 ARSACS patients and one control. The quantification was realized with ImageJ ( $n=3$ ;  $>100$  cells). (**C**) The mtDNA was quantified by qPCR for 11 ARSACS patients and the control ( $n=3$ ). (**D**) The mitochondrial respiration (oxygen consumption rate, OCR) was quantified by oxygraphy for five patients ( $n=3$ ). (**E**) Following the abnormal fluorescence observed with the MitoTracker labeling, control and patient AAR-437-014 fibroblasts were incubated with TMRM, (**F**) the fluorescence intensities were quantified by ImageJ software ( $n=3$ ;  $>100$  cells). Mean  $\pm$  SEM;  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ .

**Figure 3** Ophthalmological findings in patient ANG-120054380-003. Retinal fundus images in the right (**A**) and left (**B**) eye, disclosing abnormally visible retinal axons, due to ganglion cell and retinal nerve fiber hyperplasia, detectable close to the optic disc. Optical coherence tomography (OCT), macular scans in the right (upper case, **C**) and the left (upper case, **D**) eye, showing abnormal thickening of the inner retinal layers, close to the optic disc (in red and pink). Transversal black and white sections (lower cases, **C** and **D**), showing the focal, inner retinal thickening (arrow), visible close to the optic disc. Peripapillary OCT images (**E**), showing increased retinal nerve fiber layer (RNFL) thickness, predominantly at the superior and inferior parts of the optic disc.

**Figure 4** Brain MRI of several ARSACS patients exhibiting characteristic features. T1 sagittal cross-sections demonstrating predominant upper vermis atrophy in patients 01017AI at age 6 (**A**) and BOR-090711-003 at age 45 (**B**). T2 axial cross-sections showing linear pons hypointensities in patients BOR-090711-003 at age 42 (**C**), and 10012RB at age 14 (**D**). We

can also note mild enlargement of the middle cerebellar peduncles (MCP) in BOR-090711-003 (C) and mild hyperintensity of the MCP in 10012RB (D). E, T2 axial cross-section at the level of basal ganglia showing peripheral hyperintensities surrounding thalami in 10012RB at age 14.

**Figure 5** New grading definition for ARSACS diagnosis.

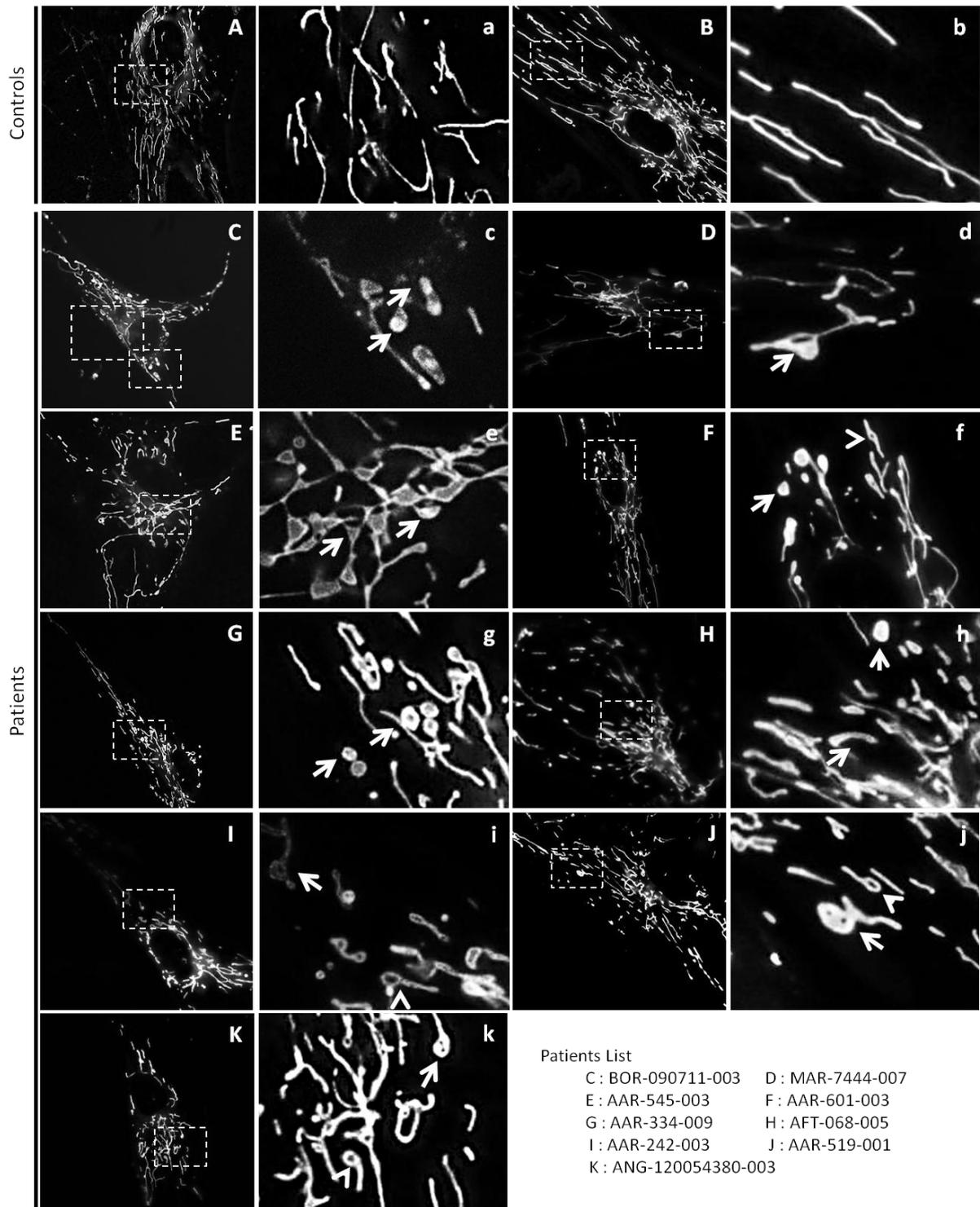
**Figure 6** Summary of ARSACS diagnosis in this study.

**Table 1** SACS variants identified in 39 families.

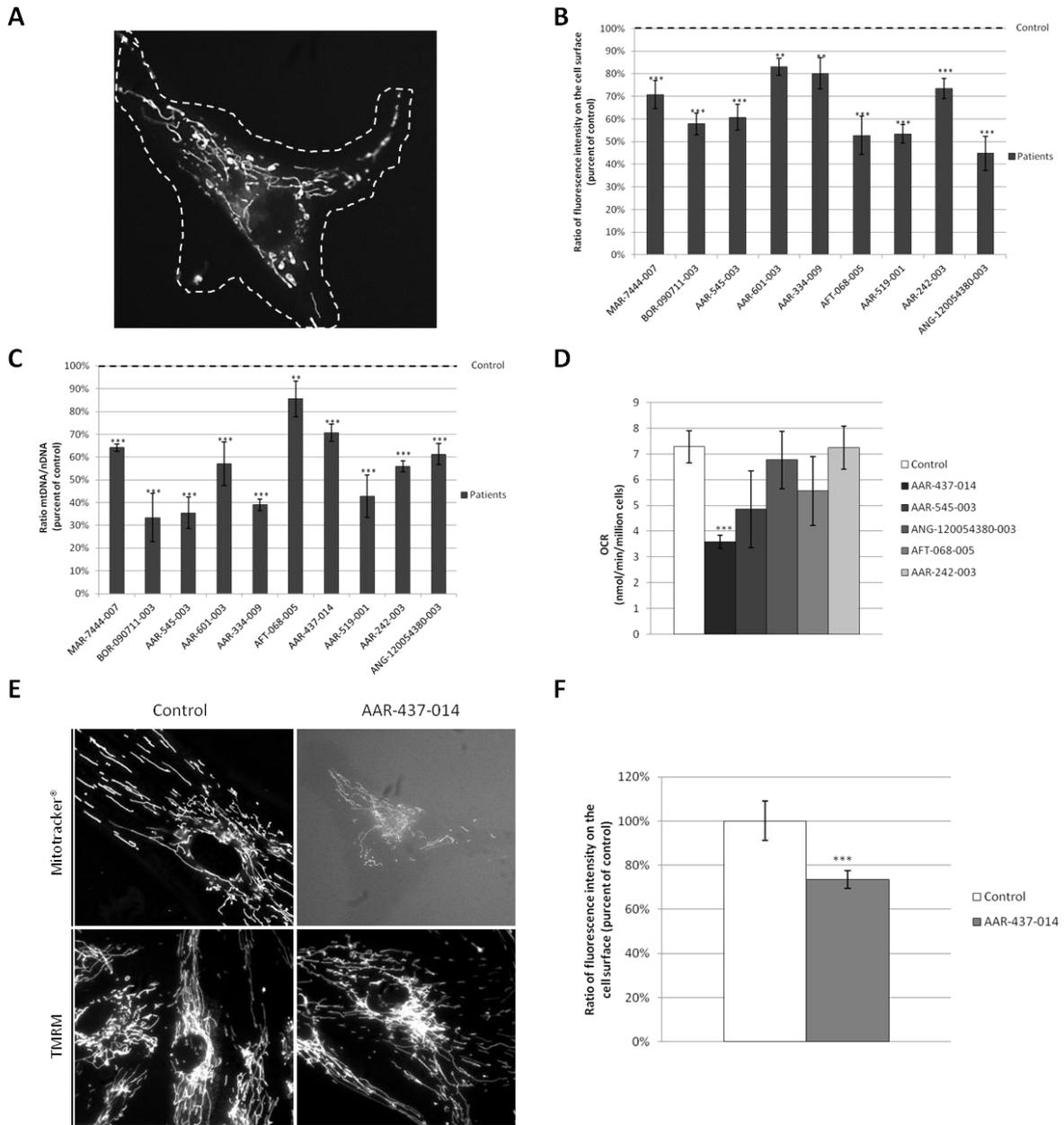
NA = not applicable; ^ = SNP not validated; + known mutations (Hara *et al.*, 2007; H'mida-Ben Brahim *et al.*, 2011; Bouhlal *et al.*, 2011 ; Dibilio *et al.*, 2013; Prodi *et al.*, 2012; Ouyang *et al.*, 2008; Romano *et al.*, 2012). <sup>1</sup> Amino acid alignments were executed at ClustalW2 with *Homo sapiens*, *Macaca mulatta*, *Canis lupus familiaris*, *Ailuropoda melanoleuca*, *Equus caballus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*, *Ornithorhynchus anatinus*, *Gallus gallus*, *Anolis carolinensis*, *Dario rerio*. <sup>2</sup> *In silico* predictions were performed using Polyphen-2, Mutation Taster, SIFT, and Provean.<sup>3</sup> Pathogenicity class following the classification recommendation (Plon *et al.*, 2008).

**Table 2** Neurological symptoms rate in our series and comparison to main previously published series.

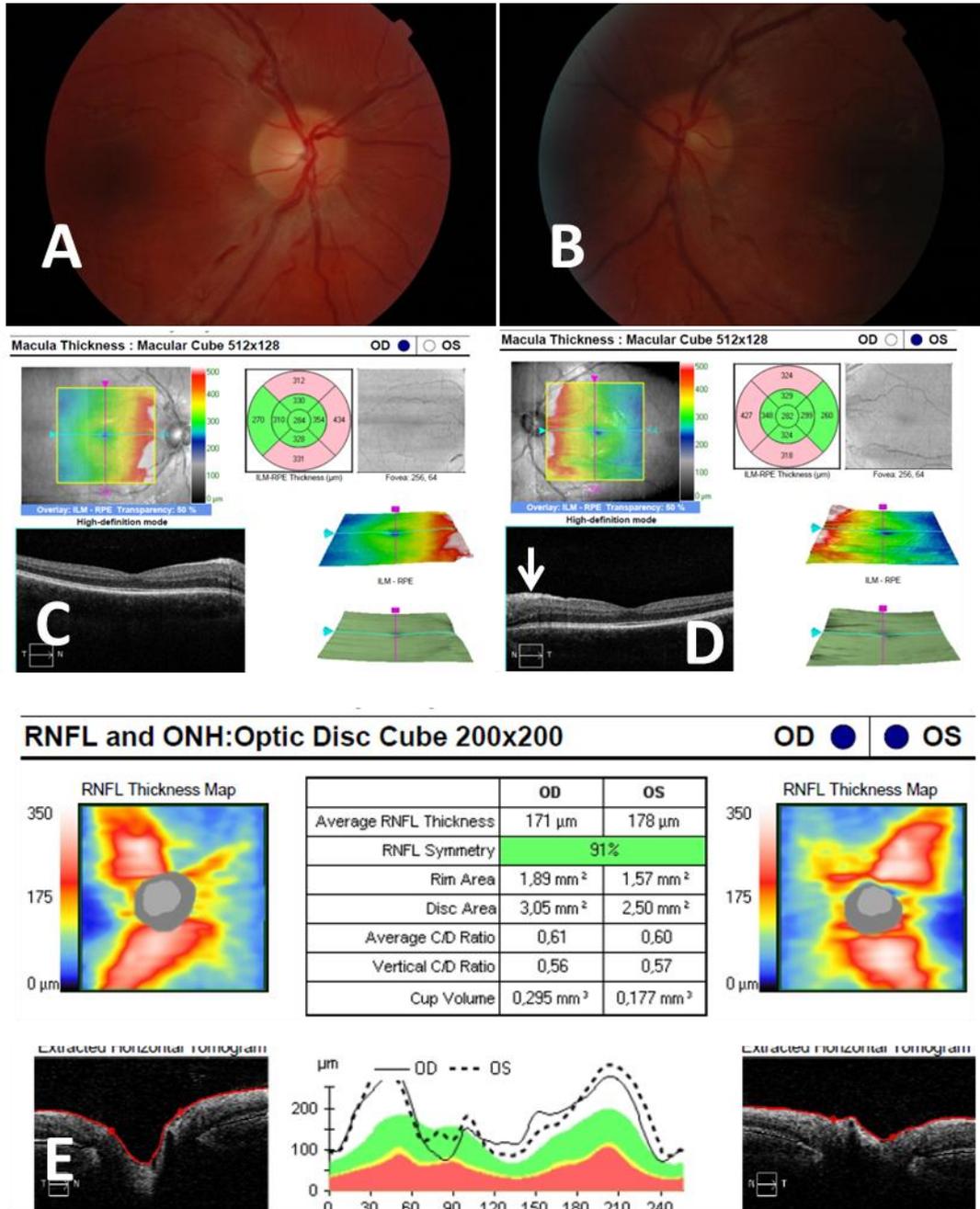
SD: standard deviations; \*: without taking into account data from Duquette *et al.*, 2013; \*\*: without taking into account data from Prodi *et al.*, 2012; \*\*\*: without taking into account data from Baets *et al.*, 2010; \*\*\*\*: without taking into account data from Vermeer *et al.*, 2008; †: overall reflexes: no precision in the paper where brisk reflexes were noted.



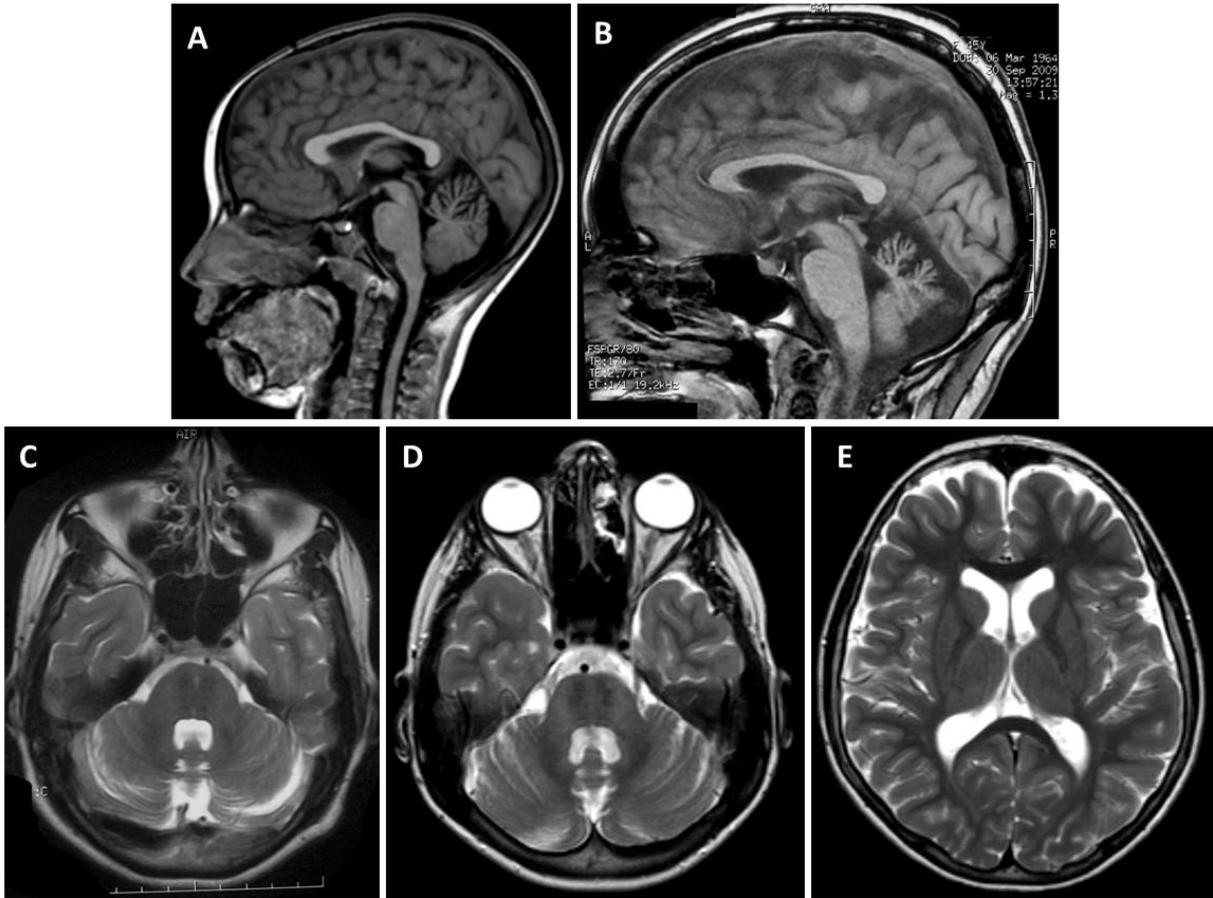
**Figure 1** Mitochondrial network using mitotracker labeling.



**Figure 2** Mitochondrial abnormalities in skin fibroblasts.



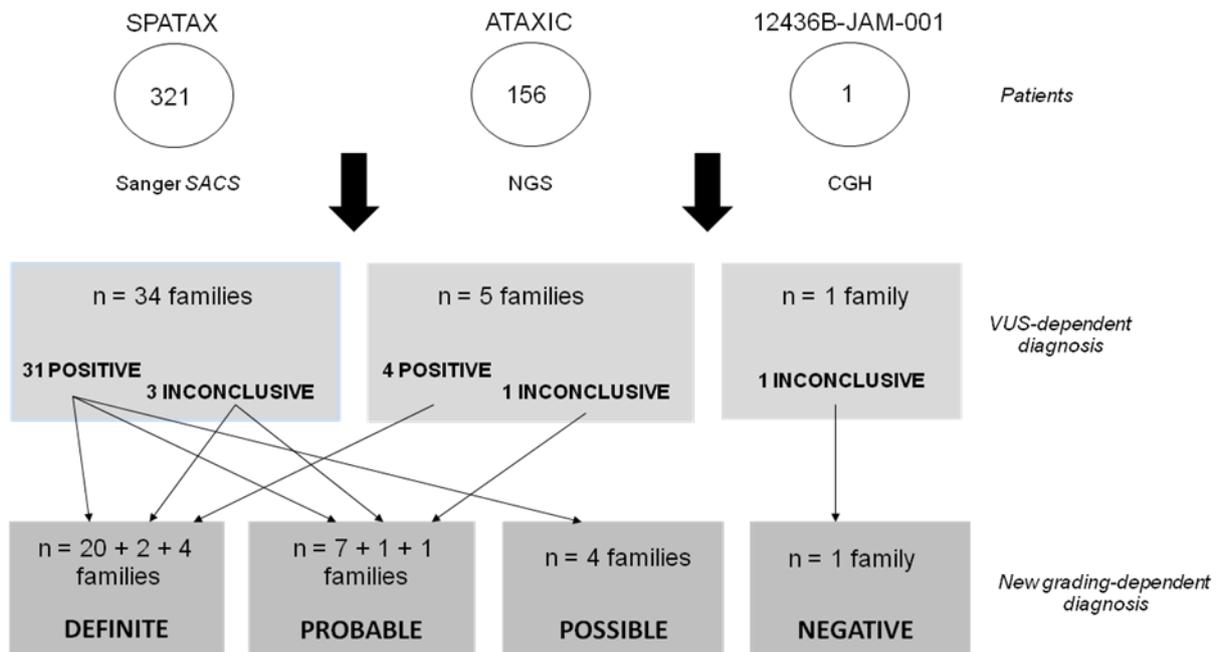
**Figure 3** Ophthalmological findings in patient ANG-120054380-003.



**Figure 4** Brain MRI of several ARSACS patients exhibiting characteristic features.

<b>Grading definition</b>	<b>Diagnostic criteria</b>
<b>Possible ARSACS</b>	Spastic ataxia or congenital ataxia or spastic paraplegia and/or linear hypointensities in the pons on brain MRI and/or axonal neuropathy with mild demyelinating participation
	<b>AND</b> two VUS $\leq$ class 4 in SACS
<b>Probable ARSACS</b>	Spastic ataxia or congenital ataxia or spastic paraplegia and/or linear hypointensities in the pons on brain MRI and/or axonal neuropathy with mild demyelinating participation
	<b>AND</b> one VUS class 5 with one VUS $\leq$ class 4 in SACS
<b>Definite ARSACS</b>	Spastic ataxia or congenital ataxia or spastic paraplegia and/or linear hypointensities in the pons on brain MRI and/or axonal neuropathy with mild demyelinating participation
	<b>AND</b> two VUS class 5 in SACS <b>OR</b> at least one VUS class 5 or 2 VUS $\leq$ class 4 in SACS and altered mitochondrial network with hyperfused tubules in fibroblasts

**Figure 5** New grading definition to diagnosis of ARSACS.



**Figure 6** Summary of ARSACS diagnosis in this study.

**Table 1** SACS variants identified in 39 families.

SPATAX Family	Exon	Genomic change	Protein change	ESE changes	AA alignments <sup>1</sup>	Domain	<i>In-silico</i> predictions <sup>2</sup>	Pathogenicity VUS class <sup>3</sup>
<i>Nonsense homozygous variants</i>								
AAR-366	2	c.106G>T	p.E36*	NA	NA	Ub	NA	Pathogenic (class5)
AAR-270	7	c.625delG	p.G209Vfs*6	NA	NA	sr1/SRR1	NA	Pathogenic (class5)
AAR-330	9	c.2850insA	p.L950Lfs*20	NA	NA	srX/SIRPT1	NA	Pathogenic (class5)
AFT-079	9	c.2881C>T	p.R961*	NA	NA	srX/SIRPT1	NA	Pathogenic (class5)
AAR-321	9	c.5920G>T	p.E1974*	NA	NA	SIRPT2	NA	Pathogenic (class5)
AAR-104	9	c.6630T>C	p.Y2210*	NA	NA	SIRPT2	NA	Pathogenic (class5)
MAR-7444●	9	c.10290C>G <sup>+</sup>	p.Y3430*	NA	NA	srX/SIRPT3	NA	Pathogenic (class5)
AAR-509	9	c.11601delACAA	p.K3867Nfs*1	NA	NA	sr/SIRPT3	NA	Pathogenic (class5)
<i>Homozygous missense variants</i>								
AAR-456	7	c.815G>A <sup>+</sup>	p.R272H	No	Highly Conserved (11/11)	sr1/SSR1	Deleterious	Likely pathogenic (class 4)
AAR-269	7	c.815G>A <sup>+</sup>	p.R272H	No	Highly Conserved (11/11)	sr1/SSR1	Deleterious	Likely pathogenic (class 4)
AAR-437●	7	c.815G>A <sup>+</sup>	p.R272H	No	Highly Conserved (11/11)	sr1/SSR1	Deleterious	Likely pathogenic (class 4)
AAR-242●	7	c.1537A>G <sup>^</sup>	p.I513V	No	Highly Conserved (9/11)	sr2/SSR1	Tolerate	Likely not pathogenic (class 2)
AAR-1168	9	c.3932T>A <sup>+</sup>	p.M1311K	No	Highly Conserved (11/12)	sr3/SIRPT1	Deleterious	Likely pathogenic (class 4)
AAR-770	9	c.5761T>G	p.Y1921D	Yes	Highly Conserved (12/12)	sr2/SSR2	Deleterious	Likely pathogenic (class 4)
AAR-519●	9	c.6296C>T	p.P2099L	Yes	Highly Conserved (12/12)	SIRPT2	Deleterious	Likely pathogenic (class 4)
AAR-599	9	c.8108G>A	p.R2703H	No	Highly Conserved (12/12)	sr1/SRR3	Deleterious	Likely pathogenic (class 4)
AAR-235	9	c.11528G>T	p.G3843V	Yes	Highly Conserved (12/12)	sr3/SIRPT3	Deleterious	Likely pathogenic (class 4)

**Table 1** SACS variants identified in 39 families. (*Continued*)

<i>Nonsense compound heterozygous variants</i>									
AAR-601●	5 9	c.428delTT c.13066C>T	p.L143Lfs*10 p.Q4356*	NA	NA	sr1/SRR1 /	NA NA	Pathogenic (class5) Pathogenic (class5)	
AAR-230	5+ 9	c.457+3A>C c.6356C<T <sup>+</sup>	NA p.R2119*	NA	NA	srX/SIRPT1 /	Deleterious NA	Pathogenic (class5) Pathogenic (class5)	
AAR-246	9	c.3328insA c.12925G>T	p.I1110Nfs*1 p.E4309*	NA	NA	SIRPT1 sr3/SIRPT3	NA NA	Pathogenic (class5) Pathogenic (class5)	
BOR-090711●	9	c.3540delCT c.11239A>T	p.L1180Lfs*7 p.K3747*	NA	NA	sr1/SSR2 sr1/SSR2	NA NA	Pathogenic (class5) Pathogenic (class5)	
AAR-225	9	c.4933C<T c.5008delTATT	p.R1645* p.Y1671Lfs*20	NA	NA	sr2/SSR2 sr3/SIRPT2	NA NA	Pathogenic (class5) Pathogenic (class5)	
AUS-553090795	9	c.5764delTTAC c.6948delCCAATGCTTACTACAA	p.L1922Rfs*2 p.T2316Nfs*6	NA	NA	srX/SIRPT3 sr3/SIRPT3	NA NA	Pathogenic (class5) Pathogenic (class5)	
AAR-545●	9	c.10634delITG c.11374C>T <sup>+</sup>	p.V3545Efs*3 p.R3792*	NA	NA	sr1/SRR1 /	NA NA	Pathogenic (class5) Pathogenic (class5)	
<i>Nonsense and missense compound heterozygous variants</i>									
AAR-410	7 9	c.826C>T <sup>+</sup> c.13319C>A	p.R276C p.S4440*	Yes NA	Highly Conserved (11/11) NA	/ SIRPT2	Deleterious NA	Likely pathogenic (class 4) Pathogenic (class5)	
SAL-399	7 9	c.1093delA c.7815G>T	p.S365Afs*6 p.Q2605H	NA Yes	NA Highly Conserved (12/12)	sr1/SRR1 /	NA Deleterious	Pathogenic (class5) Likely pathogenic (class 4)	
AAR-334●	9	c.2881C>T c.8108G>A	p.R961* p.R2703H	NA No	NA Highly Conserved (12/12)	SIRPT1 sr1/SRR3	NA Deleterious	Pathogenic (class5) Likely pathogenic (class 4)	
AAD-399	9	c.4718T>G c.8227delC	p.M1573R p.H2743Tfs*10	Yes NA	Highly Conserved (11/12) NA	srX/SIRPT1 sr1/SRR3	Tolerate NA	Likely not pathogenic (class2) Pathogenic (class5)	
SAL-491	9	c.4749C>G <sup>+</sup> c.6098insT	p.P1583R p.V2033Vfs*5	Yes NA	Highly Conserved (12/12) NA	sr1/SRR2 sr1/SRR3	Deleterious NA	Likely pathogenic (class 4) Pathogenic (class5)	
AFT-068●	9	c.6166delT c.6650C>A	p.F2056Ffs*21 p.P2217Q	NA Yes	NA Highly Conserved (12/12)	sr1/SRR2 SIRPT2	NA Deleterious	Pathogenic (class5) Likely pathogenic (class 4)	
AAR-429	9	c.6303delC c.13352T>C <sup>+</sup>	p.S2101fs*13 p.L4451P	NA No	NA Highly Conserved (12/12)	SIRPT2 SIRPT2	NA Deleterious	Pathogenic (class5) Likely pathogenic (class 4)	
FSP-084	9	c.6630T<A c.8546C<T	p.Y2210* p.P2849L	NA Yes	NA Highly Conserved (12/12)	SIRPT2 HEPN	NA Deleterious	Pathogenic (class5) Likely pathogenic (class 4)	
FSP-1171	9	c.7274G>C c.11265delAT	p.R2425P p.I3755Mfs*7	Yes NA	Highly Conserved (12/12) NA	sr2/SRR3 sr2/SRR3	Deleterious NA	Likely pathogenic (class 4) Pathogenic (class5)	
<i>Nonsense heterozygous variant</i>									
ANG-120054380●	9	c.3853_insT	p.C1285Lfs*8	NA	Highly Conserved (12/12)	SRR1	NA	Pathogenic (class5)	

ATAXIC Family	Exon	Genomic change	Protein change	ESE changes	AA alignments <sup>1</sup>	Domain	<i>In-silico</i> predictions <sup>2</sup>	Pathogenicity VUS class <sup>3</sup>
<i>Nonsense homozygous variants</i>								
01017AI	7	c.1769_70delGT	p.V590Afs*55	NA	NA	SIRPT1	NA	Pathogenic (class5)
13003TL	9	c.4692G>C	p.Y1564*	NA	NA	sr1/SIRPT2	NA	Pathogenic (class5)
<i>Nonsense compound heterozygous variants</i>								
10012RB	7	c.1769_70delGT	c.V590Afs*55	NA	NA	SIRPT1	NA	Pathogenic (class5)
	9	c.5151delA	c.K1717Nfs*8			sr1/SIRPT2	NA	Pathogenic (class5)
13006CD	7	c.1303G>T	p.G435*	NA	NA	sr2/SIRPT1	NA	Pathogenic (class5)
	9	c.10638_681delinsGGGG	p.R3546Rfs*4			srX/SIRPT3	NA	Pathogenic (class5)
<i>Nonsense and missense compound heterozygous variants</i>								
01023MO	9	c.13238_41delAGCA c.13406C>A	p.Q4413Hfs*38 p.A4469D	NA Yes	NA Highly Conserved (12/12)	/ HEPN	NA Contradictory	Pathogenic (class5) Uncertain (class 3)

**Table 1** SACS variants identified in 39 families. (*Continued*)

NA=not applicable; ^=SNP not validated; + known mutations (Hara et al., 2007; H'mida-Ben Brahim et al., 2011; Bouhlal et al., 2011 ; Dibilio et al., 2013; Prodi et al., 2012; Ouyang et al., 2008; Romano et al., 2013). <sup>1</sup> Amino acid alignments were executed at ClustalW2 with Homo sapiens, Macaca mulatta, Canis lupus familiaris, Ailuropoda melanoleuca, Equus caballus, Mus musculus, Rattus norvegicus, Bos taurus, Ornithoryndus anatinus, Gallus gallus, Anolis carolinensis, Dario renio. <sup>2</sup> *In-silico* predictions were performed using Polyphen-2, Mutation Taster, SIFT and Provean. <sup>3</sup> Class following the classification recommendation (Plon et al., 2008).

**Table 2.** Neurological symptoms rate in our series and comparison to main previously published series – rate and mean age

		Present study	Vermeer et al., 2008	Baets et al., 2010	Prodi et al., 2012	Synofzik et al., 2013	Duquette et al., 2013
Number of index patients / overall studied patients		39/47	16/23	11/17	13/14	9/13	?/50
Mean age at onset		5.1 ± 7.4 y	3.7 ± 3.1 y	13.8 ± 11.2 y	3.6 ± 2.6 y	7.6 ± 8.7 y	No data
Mean age at examination		29.7 ± 12.9 y	39.3 ± 9.9 y	34.7 ± 11.1 y	32.2 ± 9.4 y	28.7 ± 13.5 y	18 y
Symptom	severity of symptom when available	rate				mean age (standard deviation)	
Nystagmus		83% (34/41)	No data	11/17	No data	8/12	72%
Saccadic pursuit		79% (19/24)	No data	No data	No data		
Saccade anomalies		18% (7/39)	No data	No data	No data		
Static ataxia		47/47 (including 11 mild, 15 moderate, 14 severe)	21/21	12/16	14/14	10/12	100%

Cinetic ataxia		46/46 (including 21 mild, 11 moderate, 6 severe)	16/16	14/16	Merger	10/12	98% appendicular?
LL spasticity		28/43 (including 2 mild, 19 moderate, 6 severe)	17/17	10/17	14/14	8/12	94%
LL weakness		29/43	No data	10/17	13/14	No data	44-48%
LL muscle wasting		14/40	No data	No data	No data	No data	No data
Knee reflex	normal	4/44	6/19		No data	No data	
	decreased/absent	10/44	5/19				
	brisk ± diffused	30/44	8/19	10 (overall reflexes)			98%
Ankle reflex	normal	4/46	0		No data	No data	
	decreased/absent	28/46	19/20				44%
	brisk ± diffused	14/46	1/20	10 (overall reflexes)			
UL spasticity		5/41	4/17	No data	No data	No data	cf. LL spasticity
UL weakness		14/43 including 5 distal	No data	3	No data	No data	No data

UL muscle wasting		8/43 including 4 distal	No data	No data	No data	No data	No data
UL reflexes	normal	13/46	10/17		No data	No data	
	decreased/ absent	16/46	6/17				
	brisk ± diffused	17/46 (1 diffused)	1/17	10 (overall reflexes)			cf. knee reflex
Extension plantar response		35/45	No data	14/17		7/12	98
Impaired pin-prick, touch sense		6/37	No data	8/17			0
Decreased vibration at ankles		28/41	No data	Merger			0
Pes cavus		24/42	No data	4			66%
Intellectual disability/school difficulties		21/41	2	2	No data	No data	69%
Cognitive decline		3/34	No data	0	No data	No data	0
Epilepsy		4	1		No data	No data	11/71 (15.5%)
Hearing loss		6 including 4 with AEP alteration	No data		No data	0	No data

Urinary/anal dysfunction		11	11/21		No data	10/12	2%
Dystonia		2	3		No data	No data	
Dysphagia		3	7		No data	No data	
Scoliosis		4	No data	No data	No data	No data	
Hypertrophy of myelinated fibers at fundus examination		3/16	14/14	1/8		1/6	

Family	Exon	Genomic change	Protein change	ESE changes	AA alignments <sup>1</sup>	Domain	<i>In-silico</i> predictions <sup>2</sup>	Pathogenicity VUS class <sup>3</sup>
<i>Missense variants</i>								
AAD-095	7	c.844C>G	p.L282V	Yes	Highly Conserved (11/11)	sr1/SRR1	Deleterious	Uncertain (class 3)
STR-1074	7	c.1257A>G	p.I419V	Yes	Lowly Conserved (5/11)	sr2/SRR1	Tolerate	Likely not pathogenic (class 2)
AAR-180	9	c.2270G>A	p.G757D	Yes	Highly Conserved (10/12)	srX/SIRPT1	Tolerate	Likely not pathogenic (class 2)
FSP-626	9	c.2414G>A	p.R805K	Yes	Conserved (8/12)	srX/SIRPT1	Tolerate	Likely not pathogenic (class 2)
AAR-338	9	c.4211A>C	p.K1404T	No	Highly Conserved (12/12)	/	Deleterious	Uncertain (class 3)
FSP-559	9	c.4398T>G	p.N1466K	Yes	Highly Conserved (12/12)	sr1/SRR2	Tolerate	Likely not pathogenic (class 2)
AAR-092	9	c.9232A>G	p.N3078D	Yes	Highly Conserved (10/12)	SIRPT3	Tolerate	Likely not pathogenic (class 2)
FSP-039	9	c.9359G>A	p.R3120H	Yes	Highly Conserved (12/12)	srX/SIRPT3	Tolerate	Likely not pathogenic (class 2)
FSP-1614	9	c.9359G>A	p.R3120H	Yes	Highly Conserved (12/12)	srX/SIRPT3	Tolerate	Likely not pathogenic (class 2)
AAR-256	9	c.9439G>A	p.E3147K	No	Highly Conserved (11/12)	srX/SIRPT3	Deleterious	Uncertain (class 3)
AAR-211	9	c.13475T>G	p.I4486S	Yes	Highly Conserved (10/12)	HEPN	Deleterious	Likely pathogenic (class 4)
<i>Silent variants</i>								
FSP-150	6	c.591C>T	p.V197V	No	Highly Conserved (11/11)	sr1/SIRPT1	NA	Not pathogenic (class 1)
AAR-328	7	c.930G>T	p.L310L	Yes	Highly Conserved (11/11)	sr1/SIRPT1	NA	Not pathogenic (class 1)
FSP-711	7	c.1990G>T	p.L663L	No	Highly Conserved (11/11)	srX/SIRPT1	NA	Not pathogenic (class 1)
AAD-796	9	c.7122G>A	p.L2374L	Yes	Highly Conserved (12/12)	sr3/SIRPT2	NA	Not pathogenic (class 1)
AAR-352	9	c.8142G>A	p.S2714S	Yes	Highly Conserved (12/12)	sr1/SIRPT3	NA	Not pathogenic (class 1)

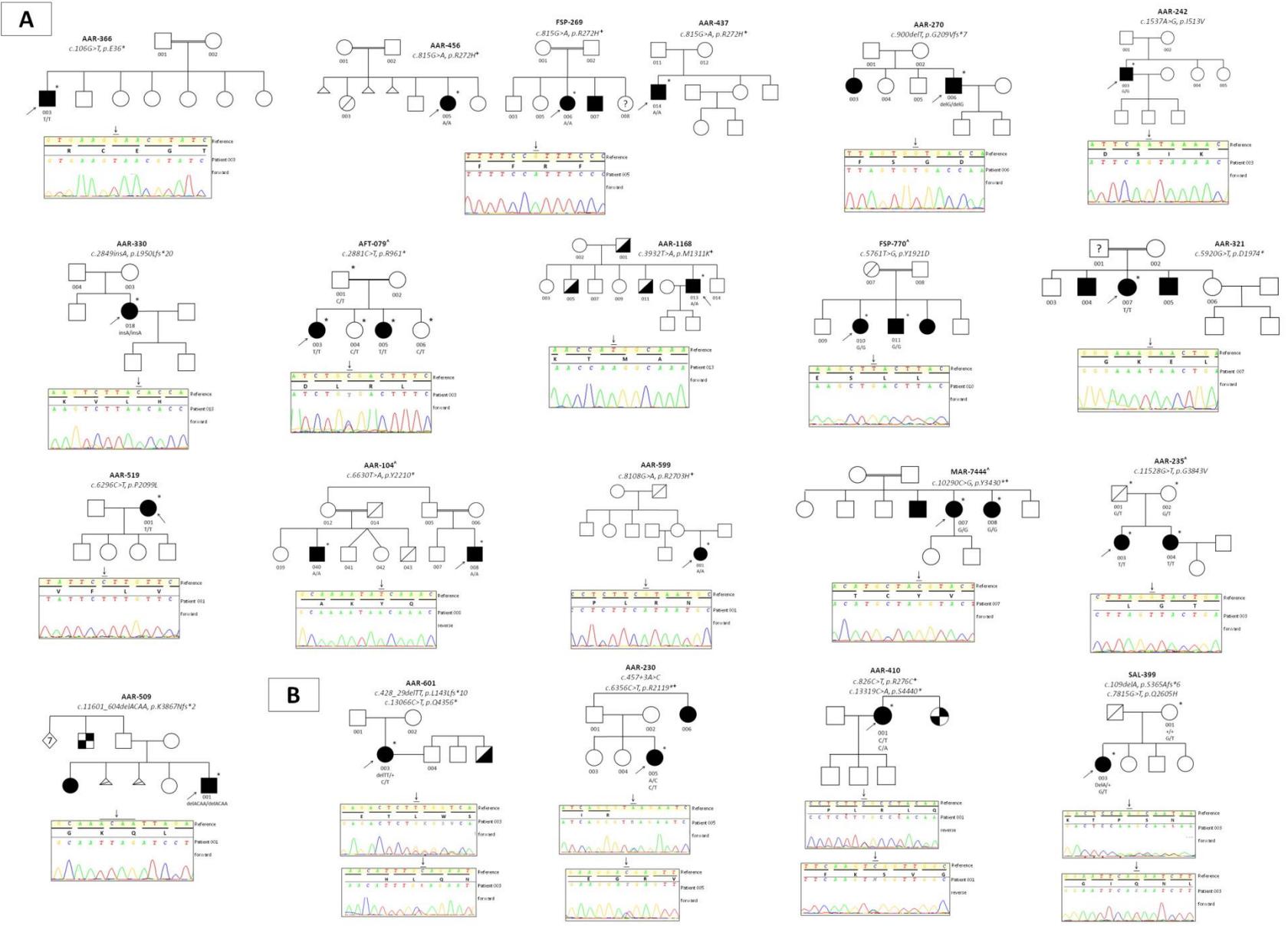
**Suppl. Table 1** Heterozygous variants in *SACS* identified in 16 families.

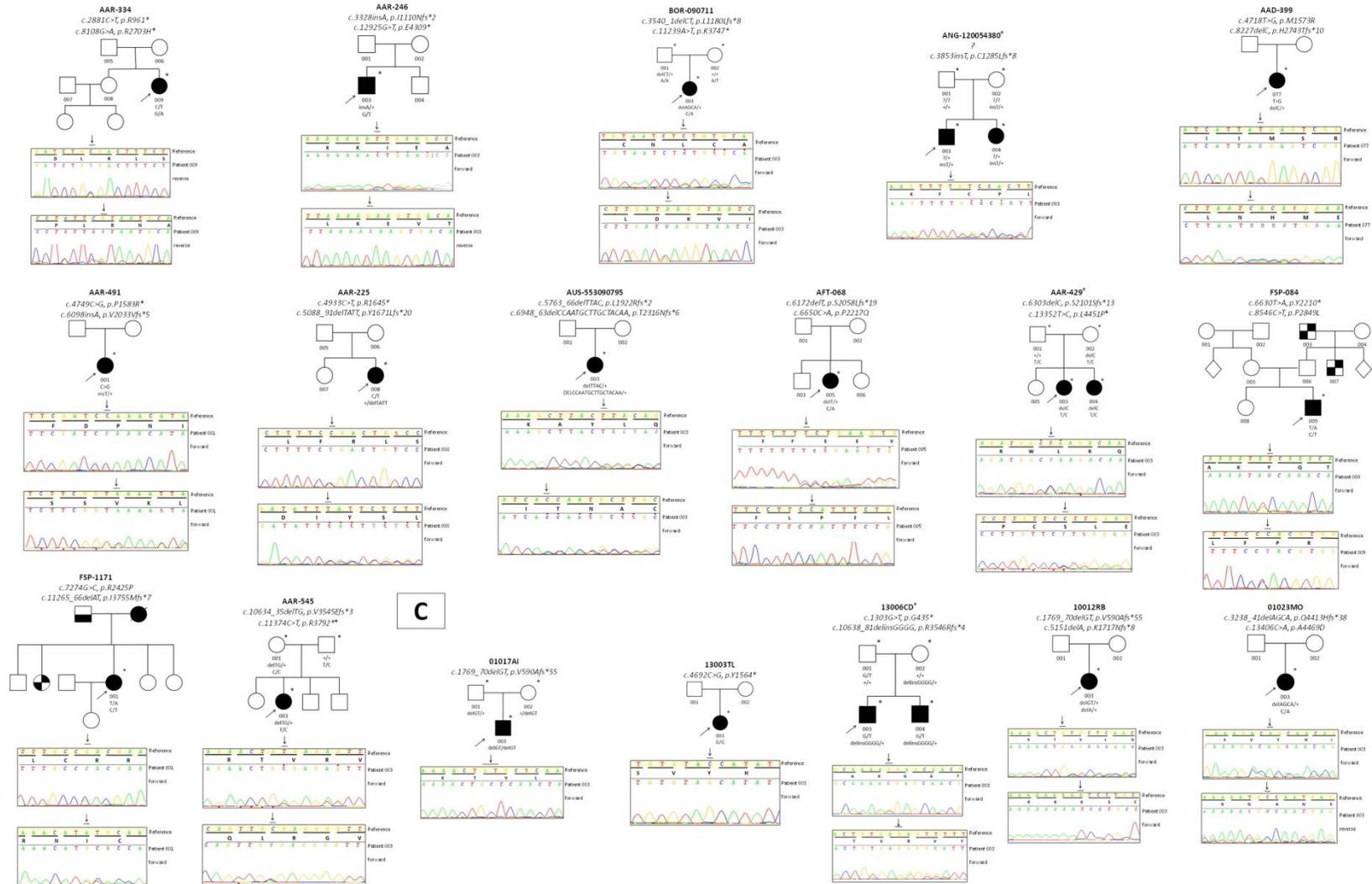
NA=not applicable; ^=SNP not validated. <sup>1</sup> Amino acid alignments were executed at ClustalW2 with *Homo sapiens*, *Macaca mulatta*, *Canis lupus familiaris*, *Ailuropoda melanoluca*, *Equus caballus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*, *Ornithoryndus anatinus*, *Gallus gallus*, *Anolis carolinensis*, *Dario renio*. <sup>2</sup> *In-silico* predictions were performed using Polyphen-2, Mutation Taster, SIFT and Provean. <sup>3</sup> Class following the classification recommendation (Plon *et al.*, 2008).



HMZ missense mutations																																			
AAR-242-003	M	France	-	-	22	Unsteadiness	52	md 3/7	md	md	+	+	-	md	md	sv	very brisk	∩	no	no	no	no	very brisk	no	no	no	-	no	no	marked cerebellar atrophy predominant on vermis, post atrophy		right foot and right upper limb dystonia			
AAR-235-003	F	Italy	likely	+	1	Unsteadiness	52	Sv 6/7	md	md	+	+	-	sv	sv diffus	no	very brisk	∩	no	sv distal	no	∩	Yes, BL	no	yes	-	no	no	cerebellar atrophy	denervating SM PNP, right predominance	urinary and/or anal sphincter dysfunction, superior ophthalmoplegia	N			
AAR-235-004	F	Italy	likely	+	2.5	Unsteadiness	49	sv 5/7	sv	md	+	+	-	md	mild	no	brisk	∩	mild	mild	no	N	Yes, BL	no	sv	+	no	no	cerebellar atrophy	denervating SM PNP	epilepsy, urinary and/or anal sphincter dysfunction, scoliosis				
FSP-770-010	F	Morocco	+	+	1	Unsteadiness	37	sv 7/7	sv	sv	+	+	-	+	(slow sacca des)	no	mild distal	md and diffused	ab	ab	no	md distal	no	∩	Yes, BL	no	yes	-	yes	no		PNP	epilepsy, urinary and/or anal sphincter dysfunction, scoliosis		cerebral stroke hypertycker
FSP-770-011	M	Morocco	+	+	13	Unsteadiness + stifflegs	34	md 3/7	md	mild	+	+	-	md	mild distal	no	ab	no	no	no	no	∩	Yes, BL	no	yes	+	yes	no	no						
AAR-456-005	F	Morocco	+	-	1	Unsteadiness	21	md 3/7	md	mild	+	+	-	+	(slow sacca des)	mild	no	no	ab	ab	no	no	no	ab	Yes, UL	no	-	no	no	vermis atrophy	axonal PNP at 11	urinary and/or anal sphincter dysfunction			
FSP-269-006	F	Algeria	+	-	0		33	sv	sv	mild	+	-	md				very brisk	ab	?		very brisk	Yes, BL	no	yes	-	yes	yes	no	cerebellar atrophy	denervating PNP	Bilateral hearing loss				
AAR-437-014	M	France	-	+	1	Unsteadiness	26	sv 4/7	md	md	-	+	-	md	md	sv distal	brisk	brisk	no	no	no	ab	Yes, BL	no	yes	-	mild	yes	vermis, pons and spinal cord atrophy	axonal SM PNP					
AAR-599-001	F	France	-	-	3	Unsteadiness	16	md 3/7	md	mild	+	+	-	md	no	no	N	N	no	no	no	N	Yes, BL	no	yes, md	-	yes	no	no	vermis atrophy, pons hypointensity	denervating SM PNP	mild hypokinesia sensorimotor hearing loss, urinary and/or anal sphincter dysfunction			
FSP-1168-013	M	France	-	-	4	Unsteadiness + stifflegs	45	sv 5/7	sv	mild	+	+	-	sv	md	no	very brisk	ab	no	no	no	brisk	Yes, BL	no	yes, sv	-		no	vermis and thin CC	denervating SM PNP			FON		
AAR-519-001	F	Portugal	-	+	8	stifflegs	39	sv 5/7	sv	sv	+	-	-	mild			brisk	brisk				brisk	Yes, BL			-	no	no	no	cerebellar atrophy	SM PNP				
AAR-519-002	F	Portugal	-	+	1	Unsteadiness	41	md 3/7	md	mild	+	-	-	md	mild	no	very brisk	ab	no	mild	no	N	Yes, BL	no	yes, sv	+	(mild)		no	cerebellar atrophy predominant on upper vermis	peripheral neuropathy	urinary and/or anal sphincter dysfunction, mild tremor			
single IHTZ truncating mutation																																			
ANG-120054380-003	M	France	-	+	1		16	md 3/7	mild	mild	+	+	-	md	mild	md	diffused	diffused	no	no	no	decreased	Yes, BL	no	no	md	no	no	no	no	upper vermis and mild spinal cord atrophy, FLAIR linear pons hypointensities, FLAIR peri-thalamic hypointensity, thin CC		Achille's tendon retraction	hypertrophy of retinal fiber layer	
ANG-120054380-004	F	France	-	+	infancy	Unsteadiness + steppage	20	md 3/7	mild	mild	ND	ND	ND	md	mild	mild	very brisk	very brisk	mild	no	mild	very brisk	Yes, BL	yes	sv	md			no	upper vermis and mild spinal cord atrophy, FLAIR linear pons hypointensities, FLAIR peri-thalamic hypointensity, posterior thinning of CC	axonal peripheral neuropathy	Hoffman sign, mild urinary urgency	N		
AEAXIC patients																																			
01AD17	F	Algeria	+	-	1	Unsteadiness	9	mild 2/7	mild	mild	-	-	-	no	no	no	brisk	brisk	no	no	no	N	no			+	(mild)	no	no	111	upper vermis atrophy, T2 FLAIR pons hypointensities	axonal sensory and denervating motor neuropathy	decreased conduction velocity of AEP at brachium level, and VEP/SEP at central level		
01MO023	F	France	-	-	1.3	Unsteadiness	8	mild 2/7	very mild	mild	-	-	-	no	no	no	N	N	no	no	no	N	no			+	(mild)	no	no		upper vermis atrophy, T2 FLAIR pons hypointensities, MCP enlargement		myopia, central alterations of conduction velocity of AEP and SEP, VEP/N	N	
10EB012	M	France	-	-	1	Unsteadiness	14	mild 2/7	mild	mild	+	-	-	no	no	no	brisk	∩	no	no	no	N	no			-			no	upper vermis, cerebella oblongata and cervicodorsal spinal cord atrophy, T2 FLAIR pons hypointensities, mild T2 hypointensity of the MCP, mild T2 hypointensity surrounding thalamus	denervating SM PNP	hypotonia, epilepsy (partial secondarily generalized stroke)	abN		
13CD006	M	France	-	+	1	Unsteadiness	12		yes	yes				no	no	no	N	N	no	no	no	N	no	no	no	no	no	no	no	no	school difficulties			N	Non
13CM007	M	France	-	+	1	Unsteadiness	9		yes	yes				no	no	no	N	N	no	no	no	N	no	no	no	no	no	no	no	no	school difficulties			N	Non
13TL003	F	France	-	-	1	Unsteadiness	12		yes	yes				no	no	no	mildly increase	mildly increase	no	no	no	N	no	no	no	no	no	no	no	no	denervating neuropathy			N	Non

**Suppl. Table 2** Clinical observations of all patients in this study. SDFS=disability stage at examination, S = spasticity, W=weakness, MW=muscle wasting, ID=intellectual disability, ab=absent, md=moderate, sv=severe, ∩= diminished, UL=unilateral, BL=bilateral and N=normal.

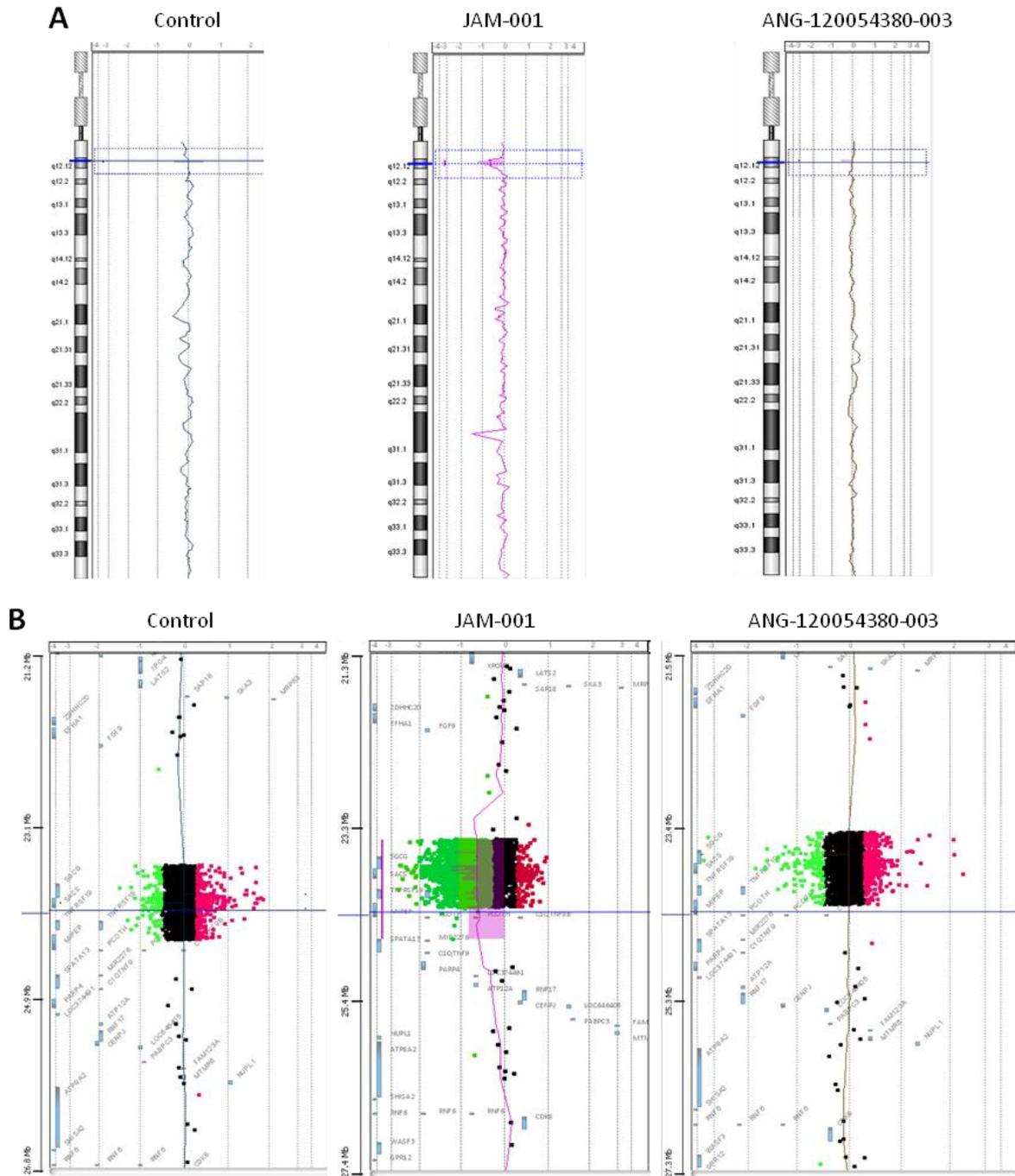




**Supplemental figure 1** Pedigrees and mutations identified in 39 ARSACS families. A SPATAX family with SACS homozygous mutations, B SPATAX family with SACS compound heterozygous mutations and C ATAXIC pedigrees. ^ indicated the families with identified affected relatives and + indicated the published mutation

	AAR-456-005	AAR-437-014	AAR-269-006
D13S232	118-118	106-106	118-118
SACS	233-233	235-235	232-232
D13S292	130-130	134-134	130-130
D13S787	256-256	253-253	256-256
D13S1243	253-253	255-255	250-253

**Supplemental figure 2** Microsatellites analysis on three patients carrying the same mutation. D13S232, D13S292, D13S787 and D13S1243 are the microsatellite markers flanking SACS. SACS is the intragenic marker.



**Supplemental figure 3** CGH-array to ANG-120054380-003 patient carrying one truncated mutation. **A** is the chromosomal view showing a deviation of base line at the patient JAM-001 consistent with a deletion in the 13q12 region which absent at the control and the patient ANG-120054380-003. **(B)** Focus on the 13q centromeric proximity. In the patient JAM-001, the pink block and green point indicate the deleted region, where average of log<sub>2</sub> ration is about -1, whose contain SACS gene. At the control and the patient ANG-120054380-003, the blue and brown line showed the absence of alteration in this region.

## Annexe 5 : Autres articles en rapport avec le sujet de thèse

### Article n°1

REEP1 mutations in SPG31: frequency, mutational spectrum, and potential association with mitochondrial morpho-functional dysfunction.

Goizet C, Depienne C, Benard G, Boukhris A, Mundwiler E, Solé G, Coupry I, Pilliod J, Martin-Négrier ML, Fedirko E, Forlani S, Cazeneuve C, Hannequin D, Charles P, Feki I, Pinel JF, Ouvrard-Hernandez AM, Lyonnet S, Ollagnon-Roman E, Yaouanq J, Toutain A, Dussert C, Fontaine B, Leguern E, Lacombe D, Durr A, Rossignol R, Brice A, Stevanin G.

*Human Mutation 2011; 32(10):1118-27*

## REEP1 Mutations in SPG31: Frequency, Mutational Spectrum, and Potential Association with Mitochondrial Morpho-Functional Dysfunction

Cyril Goizet,<sup>1,2,3,4,6†</sup> Christel Depienne,<sup>2,3,4,5†</sup> Giovanni Benard,<sup>1†</sup> Amir Boukhris,<sup>2,3,4,5,7†</sup> Emeline Mundwiller,<sup>2,3,4</sup> Guilhem Solé,<sup>1,16</sup> Isabelle Coupry,<sup>1</sup> Julie Pilliod,<sup>1</sup> Marie-Laure Martin-Négrier,<sup>17</sup> Estelle Fedirko,<sup>5</sup> Sylvie Forlani,<sup>2,3,4</sup> Cécile Cazeneuve,<sup>5</sup> Didier Hannequin,<sup>8</sup> Perrine Charles,<sup>5,9</sup> Imed Feki,<sup>2,3,7</sup> Jean-François Pinel,<sup>10</sup> Anne-Marie Ouvrard-Hernandez,<sup>11</sup> Stanislas Lyonnet,<sup>12</sup> Elisabeth Ollagnon-Roman,<sup>13</sup> Jacqueline Yaouanq,<sup>10</sup> Annick Toutain,<sup>14</sup> Christelle Dussert,<sup>2,3,4</sup> Bertrand Fontaine,<sup>2,3,4,9</sup> Eric Leguern,<sup>2,3,4,5</sup> Didier Lacombe,<sup>1,6</sup> Alexandra Durr,<sup>2,3,4,5</sup> Rodrigue Rossignol,<sup>1</sup> Alexis Brice,<sup>2,3,4,5,9</sup> and Giovanni Stevanin<sup>2,3,4,5,15\*</sup>

<sup>1</sup> Université Bordeaux Segalen, Laboratoire Maladies Rares: Génétique et Métabolisme (MRGM), Bordeaux, France; <sup>2</sup> INSERM, U675, Paris, France; <sup>3</sup> Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, UMR-S975, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France; <sup>4</sup> CNRS, UMR7225, Paris, France; <sup>5</sup> APHP, GHU Pitié-Salpêtrière, Département de Génétique et Cytogénétique, Fédération de Génétique, France; <sup>6</sup> CHU Bordeaux, Service de Génétique Médicale, Bordeaux, France; <sup>7</sup> Service de Neurologie, Hôpital Habib Bourguiba, Sfax, Tunisia; <sup>8</sup> INSERM, U614, Service de Neurologie, CHU Rouen, France; <sup>9</sup> APHP, GHU Pitié-Salpêtrière, Département de Neurologie, Paris, France; <sup>10</sup> Hôpital Pontchaillou, Clinique Neurologique, CHU Rennes, France; <sup>11</sup> CHU Grenoble, Service de Neurologie, Grenoble, France; <sup>12</sup> Université Paris Descartes and APHP, Département de Génétique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; <sup>13</sup> CHU Lyon, Hôpital de la Croix Rousse, Consultation de Neurogénétique, Lyon, France; <sup>14</sup> CHU Tours, Service de Génétique, Tours, France; <sup>15</sup> Ecole Pratique des Hautes Etudes, Paris, France; <sup>16</sup> CHU Bordeaux, Pôle des Neurosciences Cliniques, Pessac, France; <sup>17</sup> CHU Bordeaux, Département de Pathologie, Bordeaux, France

Communicated by Hamish Scott

Received 28 December 2010; accepted revised manuscript 17 May 2011.

Published online 26 May 2011 in Wiley Online Library (www.wiley.com/humanmutation). DOI: 10.1002/humu.21542

**ABSTRACT:** Hereditary spastic paraplegias (HSP) constitute a heterogeneous group of neurodegenerative disorders characterized at least by slowly progressive spasticity of the lower limbs. Mutations in *REEP1* were recently associated with a pure dominant HSP, SPG31. We sequenced all exons of *REEP1* and searched for rearrangements by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in a large panel of 175 unrelated HSP index patients from kindreds with dominant inheritance (AD-HSP), with either pure ( $n = 102$ ) or complicated ( $n = 73$ ) forms of the disease, after exclusion of other known HSP genes. We identified 12 different heterozygous mutations, including two exon deletions, associated with either a pure or a complex phenotype. The overall mutation rate in our clinically heterogeneous sample was 4.5% in French families with AD-HSP. The phenotype was restricted to pyramidal signs in the lower limbs in most patients but nine had a complex phenotype associating axonal peripheral neuropathy

(= 5/11 patients) including a Silver-like syndrome in one patient, and less frequently cerebellar ataxia, tremor, dementia. Interestingly, we evidenced abnormal mitochondrial network organization in fibroblasts of one patient in addition to defective mitochondrial energy production in both fibroblasts and muscle, but whether these anomalies are directly or indirectly related to the mutations remains uncertain.

Hum Mutat 32:1118–1127, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** hereditary spastic paraplegia; SPG31; *REEP1*; mitochondria; mitochondrial network

### Introduction

Hereditary spastic paraplegias (HSP) are a heterogeneous group of disorders with a prevalence of ~5/100,000 [Erichsen et al., 2009; Filla et al., 1992; Fink, 2006; Polo et al., 1993]. HSP are mainly caused by a dying-back degeneration initiating at the distal end of the corticospinal tract axons [Behan and Maia, 1974; Bruyn, 1992; Fink, 2006]. The clinical hallmark is a pyramidal syndrome of the lower limbs (LL) with considerable variability in terms of age at onset (from birth to >60 years), disease course, and severity. The pyramidal syndrome manifests with progressive spasticity, extensor plantar reflexes (Babinski sign), increased tendon reflexes/ankle clonus, weakness and sphincter disturbances, but without upper limb involvement. Combination of degeneration of pyramidal and posterior columns, that is, decreased vibration sense at ankles, is frequent. The presence of an isolated pyramidal syndrome defines “pure” or “uncomplicated” HSP. HSP are classified as “complex” or

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Correspondence to: Giovanni Stevanin, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, INSERM/UPMC UMR-S 975, CNRS 7225, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France. E-mail: giovanni.stevanin@upmc.fr

Contract grant sponsors: Programme Hospitalier de Recherche Clinique (to A.D.); The E-Rare program of the European Union and the French National Agency for Research (to the EUROSPA consortium); The Verum Foundation; The Association contre les Maladies Mitochondriales; Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux (to C.G.); and French Association Strumpell-Lorrain fellowship (to A.Bo.).

“complicated” when additional neurological or extra-neurological features are present [Harding, 1983], and in the presence of abnormal ancillary tests.

The genetic bases of HSP have been progressively depicted with the description of at least 46 responsible loci. To date, 18 loci associated with autosomal dominant HSP (AD-HSP) are known, essentially in families displaying a pure form of the disease and nine genes have been identified [Salinas et al., 2008; Stevanin et al., 2008]. Spastic paraplegia type 31 (SPG31) (MIM# 610250) is a recently described AD-HSP caused by mutations in the *REEP1* gene (MIM# 609139) [Zuchner et al., 2006]. A vast majority of SPG31 patients present with pure HSP, although rare peripheral nerve involvement has been described as a complicating feature [Beetz et al., 2008]. The mutation rate ranges from 2.4 to 6.5% of cases with AD-HSP [Beetz et al., 2008; Hewamadduma et al., 2009; Schlang et al., 2008]. The most common type of *REEP1* mutations are small frameshift mutations, but nonsense, missense, and microRNA target site alterations as well as intragenic deletion/duplication have been reported [Battini et al., 2011; Beetz et al., 2008; Zuchner et al., 2006].

*REEP1* encodes the receptor expression-enhancing protein 1 (201 amino acids). *REEP1* expression is almost ubiquitous and includes neuronal tissues, including spinal cord [Saito et al., 2004; Zuchner et al., 2006]. The protein contains two putative transmembrane domains and a conserved domain TB2/DP1/HVA22, which shares limited similarities with the human DP1 protein (MIM# 189902) [Saito et al., 2004; Zuchner et al., 2006]. Plant homologues of *HVA2* are stress-induced genes, as are heat-shock proteins, which promote and maintain correct protein folding especially in mitochondria. An exclusive localization of *REEP1* to the mitochondrial membrane has been shown in monkey kidney SV40 transformed fibroblasts (COS7 cells) and in mouse motor neuron derived MN-1 cells [Zuchner et al., 2006]. No colocalization was seen with Golgi and tubulin. Accordingly, an SPG31 patient carrying the p.R113X nonsense mutation [Hewamadduma et al., 2009] showed an alteration of mitochondrial respiratory chain complex I and IV activities [McDermott et al., 2003]. In contrast, an exclusive localization of a tagged form of *REEP1* to the endoplasmic reticulum (ER) was observed in COS7 cells, but no colocalization with mitochondria or the Golgi apparatus [Park et al., 2010]. In cultured cerebro-cortical neurons of rats and in COS7 cells, *REEP1* formed protein complexes with atlastin-1 and spastin but no colocalization with mitochondria or the ER was assayed in these cells.

We present here 12 mutations in *REEP1*, 11 of which are novel, and detailed clinical data of 25 patients from 12 families. In addition, we report the first evidence of mitochondrial energy production alteration in skeletal muscle and mitochondrial network disorganization in skin fibroblasts obtained from one SPG31 patient.

## Materials and Methods

### Subjects

Our study included 175 unrelated HSP probands with a disease inheritance compatible with an autosomal dominant trait. There were 102 “pure” and 73 “complex” phenotypes. A family was classified as having complex HSP if at least one affected member had other features in addition to the LL pyramidal syndrome [Coutinho et al., 1999; Goizet et al., 2009a]. Mean age at onset was 25.9 ± 16.8 years (range: birth to 71). Most patients were either French ( $n = 134$ ) or originated from other Western European countries ( $n = 39$ ). All evaluations were performed according to a previously described protocol established by the European and Mediterranean

network for spinocerebellar degenerations (SPATAX, coordinator: Dr A. Dürr) [Goizet et al., 2009b]. Disability was assessed on a 7-point scale in which 0 indicates the absence of disability with normal clinical examination (no pyramidal signs); 1, minimal disability (slight stiffness of the legs); 2, mild disability (unable to run, but full autonomy); 3, moderate disability in walking (reduced perimeter, frequent falls); 4, severe disability (unilateral assistance required to walk); 5, bilateral assistance required to walk; 6, wheelchair bound; and 7, bedridden.

*SPAST* / SPG4 (MIM# 182601) mutations and copy number variants had previously been excluded by direct sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in all index patients, as had mutations in *ATL1* / SPG3A (MIM# 182600) when onset was before 20 years [Depienne et al., 2006, 2007a; Namekawa et al., 2006]. In addition, mutations in *KIF5A* / SPG10 (MIM# 604187) and *SLC33A1* / SPG42 (MIM# 612539) had been excluded by direct sequencing in 149 of the selected patients [Goizet et al., 2009b; Schlipf et al., 2010]. A subset of 26 patients with a compatible phenotype was also excluded for mutations in *BSCL2* / SPG17 (MIM# 270685) (unpublished data) and 64 probands were excluded for mutations in *NIPA1* / SPG6 [Klebe et al., 2007].

### Point Mutation Detection

The coding sequence (seven exons), intron-exon boundaries and 200 bp in the 3'-UTR of the *REEP1* gene were amplified by PCR on a Thermocycler ABI3800 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The amplicons were sequenced in both directions using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3 (Applied Biosystems) in an ABI Prism 3730 automated sequencer. The electrophoretic profiles were analyzed with Seqscape 2.6 (Applied Biosystems). Primer sequences and conditions for PCR and sequencing are available from the authors upon request. After identification of a variant, reamplification and resequencing were systematically performed in a new DNA aliquot and segregation with the disease was verified by direct sequencing in additional family members when available. Mutation or variant nomenclature was based on the *REEP1* transcript reference NM\_022912.2. Nucleotides were numbered according to the cDNA with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence according to the recommended nomenclature (Human Genome Variation Society, <http://www.hgvs.org/mutnomen/>). Synonymous, missense and splice site variations were systematically evaluated for modifications of exonic splicing enhancers (ESE) (ESE finder 3.0 algorithm available at <http://www.rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE/esefinder.cgi>) or splicing consensus sequences (Splice Site Prediction by Neural Network at [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) and Splice Site Score Calculation at [http://rulai.cshl.edu/new\\_alt\\_exon\\_db2/HTML/score.html](http://rulai.cshl.edu/new_alt_exon_db2/HTML/score.html)).

### Gene Dosage Analysis

We used the SALSA MLPA P213 HSP-2 KIT (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) to identify deletions or duplications in the *REEP1* / SPG31 gene according to manufacturer's recommendations and as described elsewhere [Beetz et al., 2008]. Electrophoregrams were resolved using GeneMapper 4 software (Applied Biosystems).

### mRNA Analysis

Peripheral blood mononuclear cells from patient FSP-166-13, were isolated by Ficoll gradient using lymphocyte separation medium LSM 1077 (PAA Laboratories, Pasching, Austria).

Lymphoblastoid cell lines were established after infection with Epstein-Barr virus. Half of the cells were treated with emetin (10 µg/ml) during the last 8 hr of culture in order to block nonsense-mediated mRNA decay (NMD) [Noensie and Dietz, 2001].

Extraction of total RNA from  $\sim 5 \times 10^6$  lymphoblastoid cells was performed using the Rneasy Mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), according to the manufacturer's instructions. RNA quality and quantity were verified using a BioAnalyzer2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Reverse transcription (RT) of 1 µg of total RNA was performed with the SuperScript double-strand kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) to obtain double-strand cDNA.

REEP1 cDNA was amplified by nested PCR on a Thermocycler ABI3800. Primer sequences and conditions for PCR are available from the authors upon request. PCR products were controlled on a 4% agarose gel. The mutated allele was subcloned with the pcDNA3.1/V5-His<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> TA Expression kit in TOP10 bacteria (Invitrogen). DNA extracted from bacterial clones was amplified by PCR and clones that had integrated the mutated allele were sequenced.

### Muscle Biopsy Analyses

The deltoid muscle biopsy obtained from patient N08-1658-01 was immediately frozen and processed using standard histologic and histochemical techniques [Dubowitz and Sewry, 2007].

### Mitochondrial Investigations

The mitochondrial respiratory rate was measured on the muscle biopsy in the hour that followed the surgery. The method consisted in the permeabilization of muscle fiber bundles, using saponin, to monitor the delivery of respiratory substrates and inhibitors to the mitochondrion. Briefly, the biopsy of about 40 mg was manually dissected to separate the fibers in buffer A (10-mM EGTA, 5-mM MgCl<sub>2</sub>, 20-mM taurine, 0.5-mM dithiothreitol, 20-mM imidazole, 0.1 M K<sup>+</sup> + Mes, 5-mM ATP, and 20-mM phosphocreatine). Saponin (50-µl of a 5 mg/ml solution) was added to 5 ml of buffer A and the solution was stirred at 4°C for 15 min. Then, two washes of 15 min. were performed in buffer B (10-mM EGTA, 5-mM MgCl<sub>2</sub>, 20-mM taurine, 0.5-mM dithiothreitol, 20-mM imidazole, 0.1 M K<sup>+</sup> + Mes, 3-mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 5 mg/ml BSA). This procedure had previously been validated for routine used for the diagnosis of mitochondrial diseases in our reference center at Bordeaux University hospital [Letellier et al., 1992]. The rate of mitochondrial respiration was measured by polarography (OXY1 Hansatech) in respiratory buffer B supplemented with 10-mM pyruvate and 10-mM malate or 25-mM succinate as respiratory substrates, both at resting state (state 4) and at phosphorylating state (state 3), as obtained by the addition of 2-mM ADP. The activity of complex IV was also measured by polarography in the 1-ml wells by adding 100 µl of 47.4 mg/ml TMPD reduced with 10-mM ascorbate in presence of 1-mM antimycin A. Mitochondrial respiration was also measured on intact skin fibroblasts obtained from patient N08-1658-01. Culture of skin fibroblasts was prepared from the skin biopsy as previously described [Chevrollier et al., 2008]. The routine (endogenous) respiration was measured on 2 million of cells placed in high-glucose (25 mM) DMEM, which also contained 2-mM glutamine as oxidative energy substrate. Additional skin fibroblast cultures were prepared from skin biopsies obtained from six control subjects aged 43 ± 7 years.

The analysis of mitochondrial morphology was performed on living cells stained with Mitotracker Green (Invitrogen) as previously described [Benard et al., 2007]. Briefly, the cells were stained

with Mitotracker Green (Invitrogen) 150 nM for 20 min at 37°C, and imaging was performed on a FluoView laser scanning inverted microscope (Nikon, Shinjuku, Japan). The objective used was an oil spring-loaded Plan Achromat 60.0X/1.4/0.21. The images were acquired using the EZ-C1 Gold Version 3.2 build 610, as follows (at 37°C): the pinhole was set at 33.3 µm and the image size was 1,024 × 1,024. The step size was 0.5 µm, and the acquisition time of the Z-series set at 10 frames per second. The number of images was adapted to the width of each cell determined individually. Reconstitution of the three-dimensional images was performed using Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland). Cells were grown in glucose medium on glass chamber (Lab-Tek chamber slides: 2 wells (glass) of 4.2 cm<sup>2</sup> per well; ref. 177380) and series of images were taken from three different chambers slides. One hundred cells per experimental condition (REEP1 patient vs. controls) were selected randomly, and the analysis of mitochondrial tubule length was performed using a double-blinded approach. The length of the mitochondrial tubules was evaluated with the morphometric software (Morpho.Pro; Explora Nova, La Rochelle, France). This allowed the region of interest to be automatically selected and the area occupied by the selected pixels to be calculated. Mitochondrial tubule length was determined on 30 randomly selected tubules per cell, on 100 cells of each type (SPG31 patient vs. two controls).

### Western Blotting

Total cell lysis (human skeletal muscle myoblasts and human skin fibroblasts) was performed using 0.4% lauryl-maltoside, for 30 min on ice. Samples were diluted into an SDS-PAGE tricine sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA) containing 2% β-mercaptoethanol by incubation for 30 min at 37°C, and separated on a 4–20% SDS polyacrylamide gradient mini-gel (Bio-Rad) at 150 V. Proteins (20 µg for each sample) were transferred electrophoretically to 0.45 µm polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes for 2 hr at 100 mA in CAPS buffer (3.3 g CAPS, 1.5-l 10% methanol, pH 11) on ice. Membranes were blocked overnight in 5% milk-PBS + 0.02% azide, and incubated for 4 hr with the primary antibodies. Rabbit polyclonal antibodies against REEP1 were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; SAB2101976, immunogen sequence VQAKDRSYDALVHFVFKRGLNVAATAAVMAASKGQG-ALSERLRSFSMQDLT). After six washes with PBS-0.05% Tween 20, the membranes were incubated for 1 hr with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (Bio-Rad), diluted in 5% milk-PBS. This secondary antibody was detected in a Chemidoc (Bio-Rad) using the chemiluminescent ECL Plus<sup>™</sup> reagent (Amersham/GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The signal was quantified by densitometric analysis using Image J (NIH) software.

## Results

### Identification of Point Mutations and Small Deletions

We identified eight point mutations and two small nucleotide deletions at the heterozygous state in 10 French families with AD-HSP (Table 1). All these mutations were absent from at least 338 control chromosomes of healthy Caucasian individuals and cosegregated with the disease in all seven of the families in which it could be verified (Fig. 1).

Four of these mutations led to missense variants (p.P19L, p.S23F, p.W42R, p.D56N). The substituted residues were highly conserved during evolution through various species. These genomic changes

**Table 1. Mutations in REEP1 Identified in the 12 French SPG31 Families**

Family	Exon/intron	Genomic change	Protein change	AA conservation	Familial segregation	ESE prediction	Prediction score of splicing
FSP-723	Exon 2	c.49delC	p.Leu17PhefsX11	NA	Yes	NA	NA
N08-0089	Exon 2	c.56C>T	p.Pro19Leu	highly conserved	NA	modified	non modified
FSP-500	Exon 2	c.68C>T	p.Ser23Phe	highly conserved	NAv	modified	non modified
FSP-154	Exon 2	exon deletion	r. unknown	NA	Yes	NA	NA
FSP-126	Intron 2	c.106-4A>G	r. unknown	NA	Yes	NA	non modified
FSP-569	Exon 3	exon deletion	r. unknown	NA	NAv	NA	NA
N08-1658	Exon 3	c.106delG	p.Val36SerfsX4	NA	NA	NA	NA
FSP-418	Exon 3	c.124T>C	p.Trp42Arg	highly conserved	Yes	modified	non modified
FSP-321	Exon 3	c.166G>A	p.Asp56Asn	highly conserved	Yes	modified	non modified
FSP-731	Intron 3	c.183-2A>G	r. unknown	NA	NAv	NA	acceptor site abolished
FSP-322	Exon 4	c.198T>G	p.Tyr66X	NA	Yes	NA	NA
FSP-166	Exon 5	c.366G>T	p.Gly122GlyfsX46	NA	Yes	modified	novel donor site*

AA, amino acid; ESE, enhancer splicing elements; NA, not applicable; NA, not available; \* confirmed on mRNA. In order to estimate evolutionary conservation of mutated variants, *REEP1* sequences of different species (*Macaca mulatta*, *Pan troglodytes*, *Bos taurus*, *Canis familiaris*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Xenopus tropicalis*, *Tetraodon nigroviridis*, *Gasterosteus aculeatus*, and *Drosophila melanogaster*) were downloaded from the Ensembl genome browser ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) and aligned using ClustalW software ([www.ebi.ac.uk/cluster/](http://www.ebi.ac.uk/cluster/)). Synonymous, missense, and splice site variations were systematically evaluated for modifications of exonic splicing enhancers (ESE) (ESE finder 3.0 algorithm available at <http://www.rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE/efinder.cgi>) or splicing consensus sequences (Splice Site Prediction by Neural Network at [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) and Splice Site Score Calculation at [http://rulai.cshl.edu/new\\_alt\\_exon\\_db2/HTML/score.html](http://rulai.cshl.edu/new_alt_exon_db2/HTML/score.html)).

did not affect the in silico predicted scores of splicing. However, ESE scores were modified but effects on splicing could not be tested.

One mutation was a nonsense variant (p.Y66X) and two others were small nucleotide deletions leading to frameshifts and premature termination codons (p.L17FfsX11, p.V36SfsX4).

An apparently silent G>T substitution (p.G122G) in family FSP-166 (Table 1) was predicted in silico to create an ectopic intronic splicing donor site within exon 5 which would lead to the skipping of a 53-bp fragment on the transcript at the 3'-end of exon 5 (predicted scores of splicing were 0.99 for the mutant splice site vs. 0.78 for the downstream wild-type splice site on the Splice Site Prediction by Neural Network Website). This prediction was confirmed by sequencing the corresponding exon from mRNA extracted from lymphoblastoid cell lines of the FSP-166 index patient. The 53-bp deletion introduces a premature termination codon in exon 6 (Fig. 1, p.G122GfsX46).

The two remaining point mutations were heterozygous intronic variants: c.106-4A>G in family FSP-126 and the previously reported c.183-2A>G in family FSP-731 [Zuchner et al., 2006]. Both were identified in splice site consensus sequences. In silico analysis of c.106-4A>G using the Splice Site Finder and Splice Site Score Calculation Websites predicted the in-phase retention of a CAG codon from the intron leading to the insertion of an additional glutamine residue between tyrosine in position 35 and valine in position 36.

### Identification of Intragenic Deletions

MLPA analysis revealed a heterozygous single exon deletion in two patients: exon 2 in patient FSP-154 and exon 3 in patient FSP-569-3 (Fig. 1). Exon 2 deletion co-segregated perfectly with the disease in the seven available relatives of family FSP-154. Both exon deletions are expected to lead to a frameshift and creation of premature termination codons, but this could not be verified on mRNA.

### SPG31 Relative Frequency

We identified 12 *REEP1* mutations in 175 AD-HSP probands, regardless of whether they had pure or complex presentation (6.9%,  $n = 12/175$  non-SPG3, -SPG4, -SPG6, -SPG10, and -SPG42 families). All the SPG31 families identified here originated from France

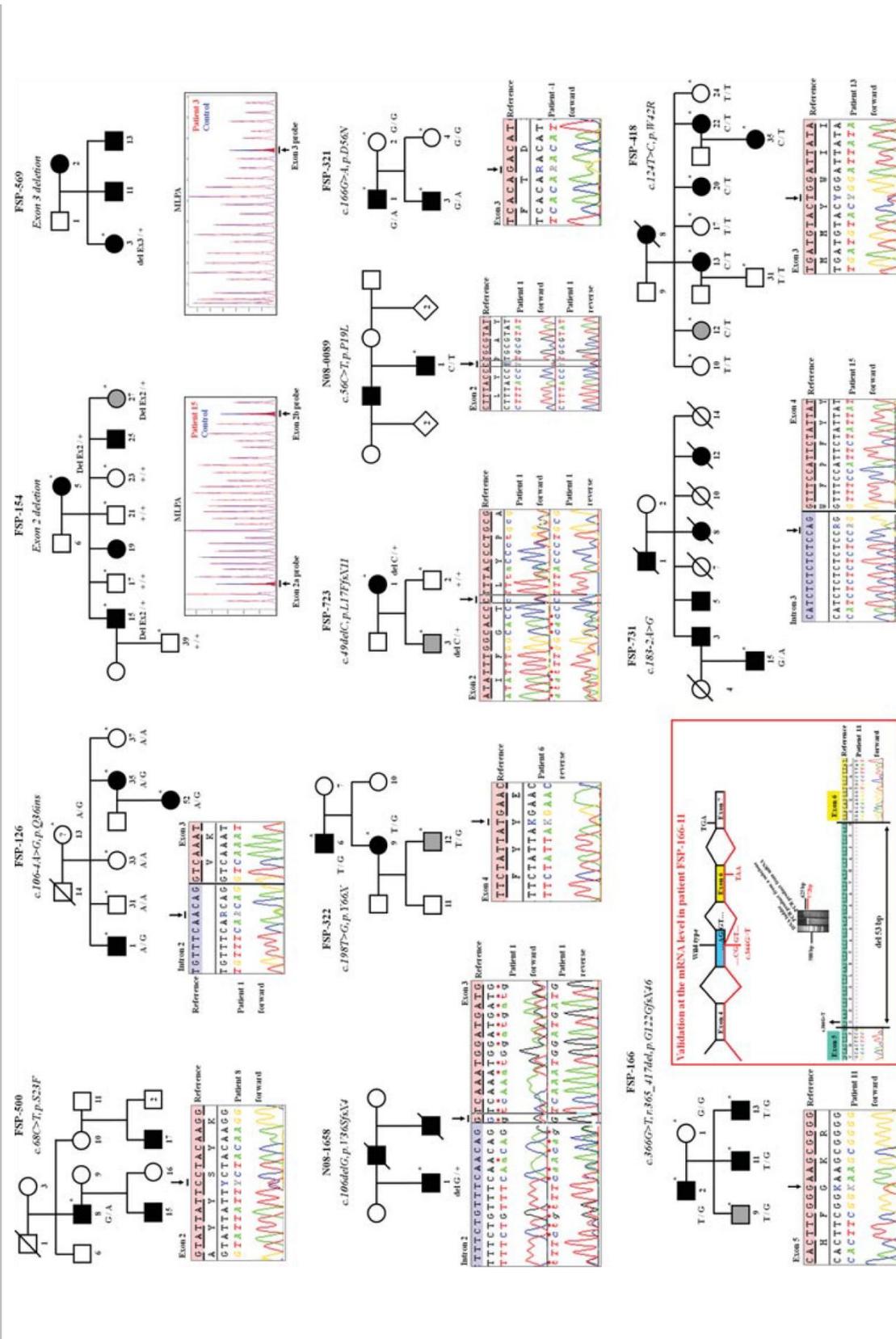
in which the frequency is thus 9% ( $n = 12/134$ ) in the French non-SPG3,4,6,10,42 AD-HSP families analyzed and, in extenso, approximately 4.5% considering all autosomal dominant known HSP cases. No mutations were detected in the 41 families coming from various other countries.

### Pure and Complex Presentation

Detailed clinical and paraclinical features were obtained for a total of 25 patients (15 men and 10 women) from the 12 identified SPG31 families (Supp. Table S1). Five patients from five different families were free from neurological complaints and were thus considered asymptomatic, but only one had normal neurological examination (patient FSP-166-9). The mean age at onset ( $n = 20$ , excluding the asymptomatic patients) was  $18.1 \pm 20.3$  years (range 1–78). Age at onset varied greatly among, but also within, families as demonstrated in family FSP-166 (Supp. Table S1). However, the distribution of age at onset was compatible with the bi-modal distribution that was previously suggested [Beetz et al., 2008]. Onset occurred mostly during the two first decades ( $n = 13/20$ , 65%), with most of the remaining patients showing ages at onset between 30 and 35 years.

The presenting symptoms were gait abnormalities caused by insidious appearance of stiffness in the lower extremities in most symptomatic patients ( $n = 17/20$ ). When last examined, all symptomatic patients had LL hyperreflexia and spasticity often associated with bilateral Babinski signs ( $n = 19/20$ , 95%), LL weakness ( $n = 13/20$ , 65%) and bladder dysfunction ( $n = 9/20$ , 45%) (Supp. Table S1). The functional handicap and disease progression varied from mild to severe. After a mean disease duration of  $29.7 \pm 18.0$  (range 3–72), the mean disability score was  $2.9 \pm 1.5$  (range 2–6). Six patients required walking assistance after a mean disease duration of 37.6 years, two of them being wheelchair bound after 3 and 16 years of disease evolution, respectively. Notably, patient FSP-166-2 with a very late age at onset (78 years) had a severe handicap following acute Lyme disease at age 78.

Brain magnetic resonance imaging (MRI) was normal in seven of the eight patients studied; the remaining patient showed small deep infarct stigmata at age 80 years. Electroneuromyography (ENMG) showed axonal peripheral neuropathy (PNP) in five of 11 patients (Supp. Table S1).



**Figure 1.** Pedigrees and *REEP1* mutations identified in 12 SPG31 families. The HSP-affected members of the families are indicated by black symbols. Asymptomatic patients are indicated in gray. The asterisk indicates that DNA was available for genetic analyses. Sequences of MLPA electropherograms are shown for one patient from each family.



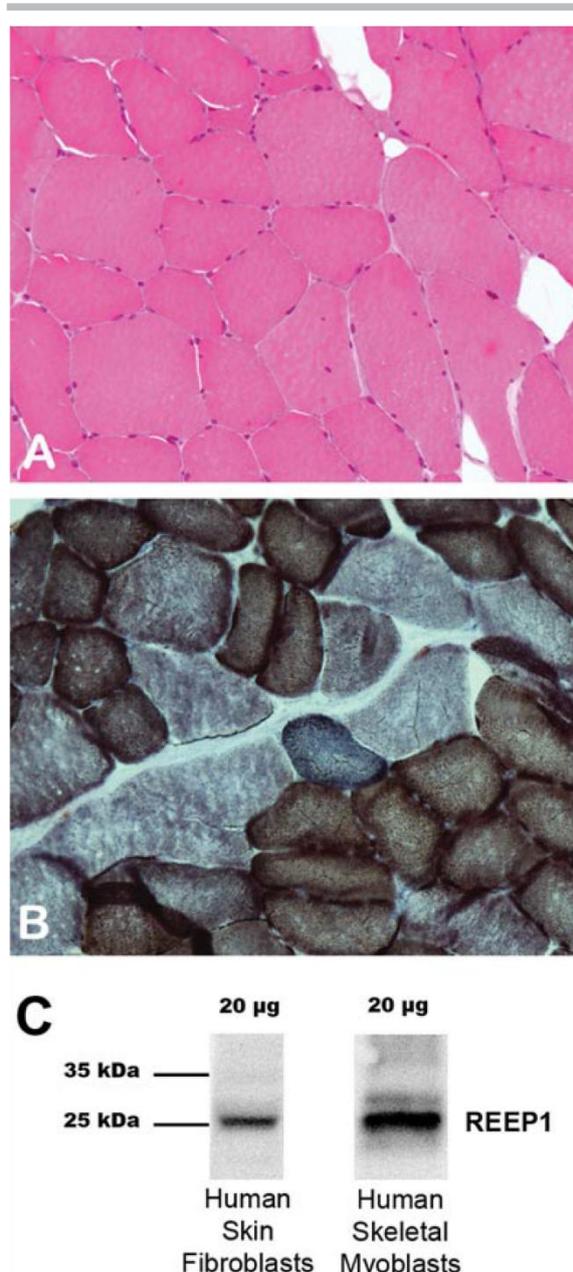
**Figure 2.** View of the hands of patient FSP-166-13. Note the moderate amyotrophy mimicking Silver syndrome.

The phenotype presentation was rather suggestive of a pure form ( $n = 7/12$  families, 58%) although several cases had additional features enabling their families to be classified as complicated HSP (Supp. Table S1). Interestingly, the index patient of FSP-166 (FSP-166-13) displayed moderate muscle wasting of the hands (Fig. 2), mimicking Silver syndrome (SPG17), that appeared early at age 17 years with axonal PNP. In addition, his father (FSP-166-2) also displayed moderate LL distal amyotrophy associated with cognitive decline, memory disturbances, aggressive behavior, and depression.

### Altered Mitochondrial Bioenergetics and Abnormal Mitochondrial Network Morphology

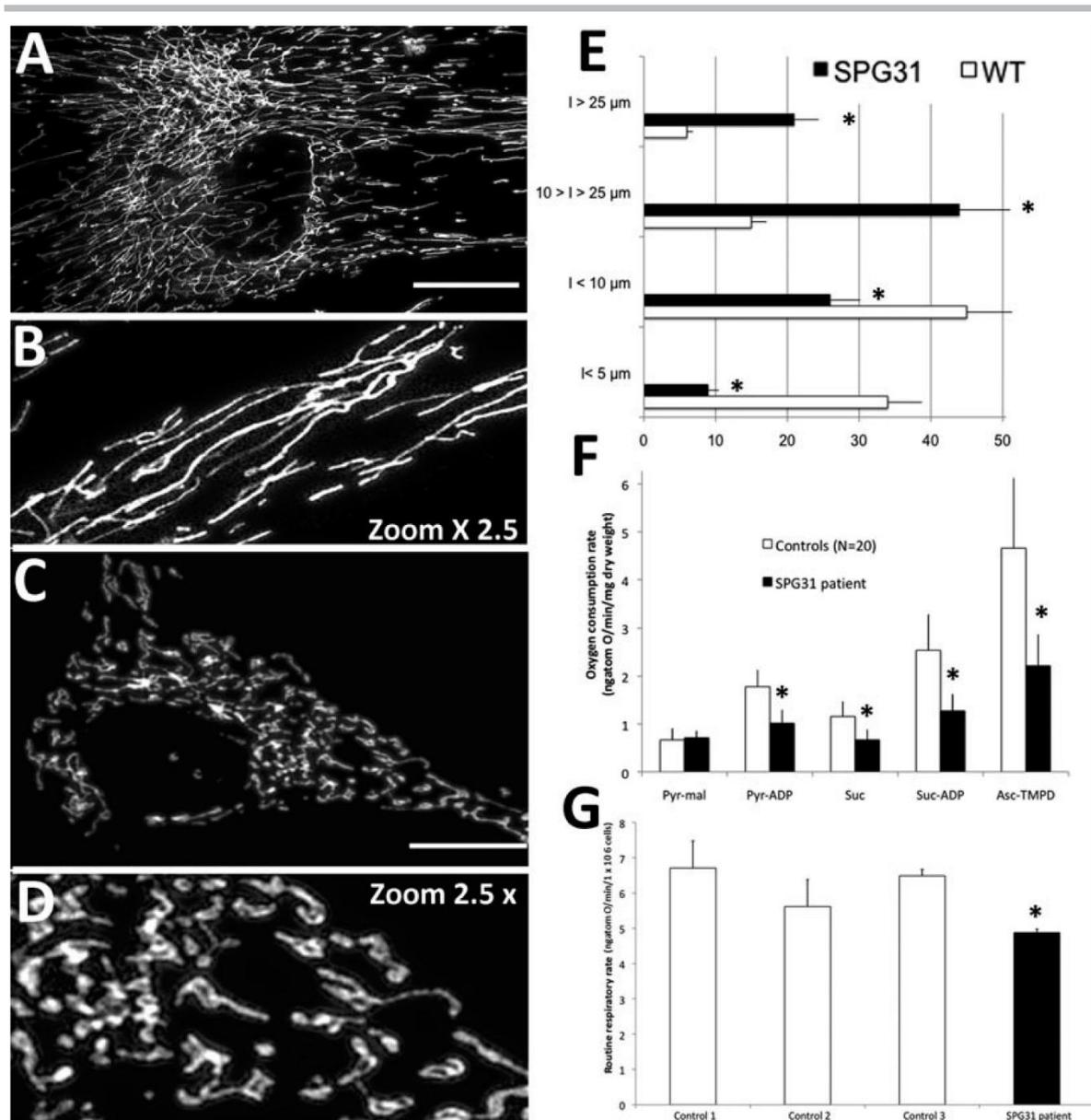
The deltoid muscular biopsy specimen obtained from patient N08-1658-01 showed mild myogenic features characterized by irregular muscle fiber diameter and a few internalized nuclei (Fig. 3A). Gomori trichrome staining was normal. Two fibers presented a partial reduction of cytochrome c oxidase (COX) staining (Fig. 3B).

Prior to investigate potential mitochondrial dysfunction in skin fibroblasts and in the muscle biopsy from this patient, we analyzed the expression of REEP1 in human skin fibroblasts and in human myoblasts taken from a control individual by western blot, using a



**Figure 3.** Histologic and histochemical findings in muscle of patient N08-1658-01 and expression of REEP1 in muscles and fibroblasts. **A:** Hematein-eosin staining shows mild irregularity in fiber size and a few internalized nuclei (X40). **B:** Cytochrome c oxidase (COX)/succinate dehydrogenase (SDH) staining shows rare fibers with a decrease of COX staining (X40). **C:** Expression level of REEP1 in human muscle myoblasts and human skin fibroblasts. Twenty micrograms of total cell proteins were analyzed by western blot using a commercially available REEP1 antibody.

commercially available antibody. The results (Fig. 3C) evidenced a band at the expected size in the total cell lysates prepared from these two types of human cells, indicating the expression of REEP1.



**Figure 4.** Main results of mitochondrial bioenergetics and morphology investigations in muscle and skin of patient N08-1658-01. The mitochondrial network of the SPG31 patient's skin cells was observed by fluorescence microscopy (A and B) and revealed hyperfused tubules as compared to control skin fibroblasts (C and D). The mitochondrial tubule length determined on 100 different cells (30 tubules per cell) indicated a higher proportion of long tubules in SPG31 cells as compared to control cells ( $n = 100$ ) prepared from six different individuals (E). Mitochondrial respiration was measured in permeabilized fibers prepared from a muscle biopsy of the SPG31 patient and revealed a reduction of oxygen consumption as compared to control muscle biopsies (F). Mitochondrial respiration was also reduced in intact cells obtained from SPG31 skin as compared to sex- and age-matched controls. The white bar is the mean value of 20 controls, while the black bar is the mean value of four muscle fibers taken from the same biopsy of the patient. (G). All data are mean value  $\pm$  SD. In panels F and G, \* indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to the control.

In the skin fibroblasts obtained from patient N08-1658-01 (Fig. 4A and B) mitochondrial morphology was abnormal with significantly longer tubules ( $p = 0.034$  for tubules  $>10 \mu\text{m}$  and  $p = 0.0017$  for tubules  $>25 \mu\text{m}$ ) (Fig. 4E) as compared to control skin fibroblasts (Fig. 4C–E), suggesting an increased fusion and/or a decreased fission of the mitochondrial network.

The polarographic investigation on the muscle biopsy using the “permeabilized muscle” technique revealed a significant alteration of mitochondrial coupled respiration with pyruvate-malate-ADP (43% reduction) or succinate-ADP (50% reduction) as respiratory substrates (Fig. 4F). COX isolated activity determined by polarography using ascorbate-TMPD as energy substrates in the presence

of antimycin A was also reduced (52% reduction) in the patient's muscle (Fig. 4F). Likewise, the oxygen consumption rate was also significantly reduced in the skin fibroblasts analyzed in DMEM (Fig. 4G).

## Discussion

### Nature of the Mutations and Relative Frequency

Among the nine currently identified genes implicated in AD-HSP, *SPAST*/SPG4, and *ATL1*/SPG3 represent half of the families [Depienne et al., 2007b]. To date, a total of 31 different mutations in *REEP1* have been identified in 37 families, defining a novel subtype of AD-HSP, SPG31 [Battini et al., 2011; Beetz et al., 2008; Hewamadduma et al., 2009; Liu et al., 2009; Schlang et al., 2008; Zuchner et al., 2006]. Only 16 of these SPG31 families have been described in detail and they show essentially a pure HSP phenotype. In this study, we report 10 different heterozygous point mutations, nine of which are novel, and two new intragenic exon deletions, identified in 12 new unrelated families with AD-HSP, and we provide detailed phenotypic data on 25 patients. The relative frequency in all patients with dominant HSP was 4.5% considering our largest cohort composed of French families when taking account the other known HSP genes.

Four of our 12 mutations were novel missense mutations, which add to the four previously reported (p.P19R, p.A20E, p.T55L, and p.L107P) in five different families [Beetz et al., 2008; Schlang et al., 2008; Zuchner et al., 2006]. The substituted residues of all these novel missense mutations are highly conserved during evolution and all but one (p.L107P) affect the DP1 domain [Zuchner et al., 2006]. In addition, we identified the splice mutation c.106-4A>G in intron 2. Although the position -4 of any variant is not systematically associated with splicing alteration [Cartegni et al., 2002], the base transition perfectly segregated with the disease in the family (Fig. 1) and was absent in a large series of control chromosomes. Moreover, this base was highly conserved through evolution in all species for which *REEP1* intronic sequences were available (*Macaca mulatta*, *Pan troglodytes*, *Mus musculus*, *Canis familiaris*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*), and the in silico prediction was compatible with the addition of a glutamine residue between amino acids 35 and 36, p.34\_35insE. We thus considered c.106-4A>G as a pathogenic mutation although this could not be experimentally confirmed.

Five other mutations were nonsense, splicing or frameshift mutations. Among them, a silent exonic point mutation, p.G122G, found in family FSP-166, was shown to create an ectopic splice site that altered the mRNA splicing and led to a frameshift and a premature termination codon.

Finally, the study of rearrangements in *REEP1*, revealed two intragenic deletions involving at least a large portion of exon 2 in family FSP-154 and at least a portion of exon 3 in family FSP-569. These results confirm that intragenic gene dosage anomalies may account for SPG31 patients, as also pointed out by others [Battini et al., 2011; Beetz et al., 2008; Tzschach et al., 2009]. According to all these data, the overall frequency of gene dosage mutations in *REEP1* is at least 9.5% ( $n = 4/42$ ). The search for such mutations therefore needs to be considered in routine diagnostic procedures.

### Expansion of the Clinical Spectrum

The clinical data show that SPG31 manifests essentially, but not exclusively, as a pure HSP phenotype, as was shown in other HSP

subtypes [Goizet et al., 2009a, 2009b]. Generally, the progression rate is slow as patients with severe disability showed the longest disease durations. Clinical or electrical neuropathy, including a Silver-like syndrome presentation in one patient, cerebellar signs, postural tremor, or cognitive impairment are part of the SPG31 clinical spectrum. The Silver syndrome, or SPG17, (MIM# 270685) is classically associated with mutations in *BSCL2* (MIM# 606158) encoding seipin [Windpassinger et al., 2004], a protein that is mainly localized to the ER membrane [Ito and Suzuki, 2009]. However, genetic heterogeneity of Silver syndrome is increasingly evident since SPG3, SPG4, and SPG10 patients displaying this phenotype have recently been described [Goizet et al., 2009b; Salameh et al., 2009].

Interestingly, one patient (FSP-166-9) had a normal neurological examination with no pyramidal signs at age 43 years, which could argue in favor of incomplete penetrance. However, the presence of pes cavus and scoliosis may rather suggest phenotypic variability with potential later onset of the spastic paraplegia.

### Pathogenic Mechanisms

Our results confirm that SPG31 results more often from truncating mutations in *REEP1* leading to theoretical premature termination of translation [Beetz et al., 2008; Schlang et al., 2008; Zuchner et al., 2006]. However, the truncated mRNA transcripts are probably recognized and degraded by NMD [Noensie and Dietz, 2001]. A deletion of the first two coding bases leading to absence of translation initiation has also been reported [Beetz et al., 2008]. Alternatively, eight missense mutations have been identified, all but one located in the N-terminal motif predicted to be involved in protein localization. Residue substitutions may alter subcellular targeting and decrease availability of the REEP1 protein at its site of function [Beetz et al., 2008]. Altogether, a loss of function mechanism by null allele/haploinsufficiency is suggested, although additional molecular mechanisms cannot be excluded.

### Mitochondrial Dysfunction in SPG31

We observed mild myogenic features and a partial reduction of COX staining in the muscle biopsy of one SPG31 patient (patient N08-1658-01) as well as a reduction in mitochondrial respiration and complex IV activity, both in muscles and fibroblasts. The "COX-deficient fiber" is the histochemical signature of most mitochondrial disorders and thus indicates a localized defect of OXPHOS [Dubowitz, 1985]. Our results add to the complex I and IV deficiencies previously described in the muscle of a SPG31 patient carrying another truncating mutation (p.R113X) [Hewamadduma et al., 2009; McDermott et al., 2003]. All these anomalies are close to those observed in patients affected with SPG7 (MIM# 607259), a HSP subtype caused by the loss of paraplegin (MIM# 602783), a subunit of the ATP-dependent m-AAA proteases located in the inner mitochondrial membrane. Indeed, mitochondrial complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress were shown in fibroblasts of two SPG7 patients [Arnoldi et al., 2008; Atorino et al., 2003]. Morphological muscle changes associated with oxidative phosphorylation impairment were observed in one of the latter two patients and in four others [Arnoldi et al., 2008; Casari et al., 1998]. Of note, as in SPG31, peripheral neuropathy and cerebellar features are part of the SPG7 phenotype spectrum [Stevanin et al., 2008].

Alternatively, the abnormal shape of the hyperfused mitochondrial network we evidenced in fibroblasts is similar to that described in a patient with microcephaly, abnormal brain development, optic atrophy, and hypoplasia caused by a heterozygous

dominant-negative mutation in the dynamin-like protein 1 gene (*DLP1*; MIM# 603850) [Waterham et al., 2007]. In that patient, mitochondrial and peroxisomal fission were defective due to a mutation in *DLP1*, the gene encoding the main fission protein for both organelles. As a result, the mitochondrial network was elongated and tangled in skin fibroblasts taken from this patient. The similarity of the hyperfused mitochondrial shape between this patient with *DLP1* mutation and the SPG31 patient analyzed here (Fig. 3) may suggest that mitochondrial fission could be altered in SPG31.

The reduced mitochondrial respiration observed in the muscle and fibroblasts of SPG31 patients may be related to the defective mitochondrial dynamics that we observed, since patients with defective mitochondrial fusion caused by mutations in *OPA1* (MIM# 605290), *GDAP1* (MIM# 606598), and *MFN2* (MIM# 608507) also show an impairment of mitochondrial energy production [Cassereau et al., 2009; Chevrollier et al., 2008; Loiseau et al., 2007]. Mutations in *OPA1* cause autosomal dominant optic atrophy (MIM# 165500) [Delettre et al., 2000], while mutations in *GDAP1* and *MFN2* lead to various subtypes of Charcot-Marie-Tooth diseases (CMT) [Baxter et al., 2002; Zuchner et al., 2004]. Some patients with *OPA1* and *MFN2* mutations display pyramidal signs and spasticity associated with the classical features observed in each condition [Del Bo et al., 2008; Yu-Wai-Man et al., 2010]. In contrast, our results could reflect nonspecific secondary mitochondrial changes. Analyses of skin and muscle biopsies of additional SPG31 patients carrying different *REEP1* mutations and a comparison with patients affected with other HSP subtypes would be ideal to reveal if such anomalies constitute a reproducible and specific feature of SPG31. However, the mitochondrial localization of *REEP1* described by Zuchner et al. [2006] added to the presence of *REEP1* in the tissues we studied may argue for a direct mitochondrial dysfunction in muscles and in fibroblasts of SPG31 patients (Supp. Table S2).

As stated in the introduction, few authors analyzed the intracellular localization of *REEP1* [Behrens et al., 2006; Park et al., 2010; Zuchner et al., 2006] and most of these studies used either tailored-made polyclonal antibodies targeted against different immunogen peptides, which could have recognized the *REEP1* isoforms, or tagged-forms of *REEP1* which might have altered the intracellular addressing of this protein and retained it in the ER (Supp. Table S3). All of these studies analyzed *REEP1* localization in cells taken from monkey, mouse, or rat, and no data are available on human cells. Therefore, the intracellular localization of *REEP1* still remains elusive and our observations of a mitochondrial dysfunction might suggest that *REEP1* is present in mitochondria.

Alternatively, the localization of *REEP1* protein to the ER [Park et al., 2010] might also explain the observed alteration of mitochondrial deficiency since the ER and mitochondria are both tightly functionally interconnected [de Brito and Scorrano, 2010]. For instance, the mitochondria-associated membranes (MAM) contain proteins that play a crucial role in the functional coupling between ER and mitochondrial lipid synthesis [Hayashi et al., 2009; Osman et al., 2011]. *REEP1* might be located in these small regions nearly common to both organelles that might also explain how a defective ER protein could entail mitochondrial morpho-functional defects. Interestingly, mitofusin 2 (*MFN2*), cited above, is involved in the morphogenesis of mitochondria and was recently identified at the contact sites between mitochondria and the ER [de Brito and Scorrano, 2008; Merkwirth and Langer, 2008]. How *REEP1* may directly or indirectly play a role in mitochondrial form and function remains to be evaluated.

In conclusion, point mutations and gene dosage anomalies in *REEP1*/SPG31 are not rare in AD-HSP and, although more frequently presenting as a pure HSP, complex phenotypes are also ob-

served in patients. The alteration of mitochondrial fusion/fission, probably leading to energy production impairment, may explain part of the HSP phenotype but further studies are necessary to determine whether these are primary or secondary changes and whether SPG31 should be classified in the sub-group of HSP caused by mitochondrial dysfunction, in addition to SPG7 and SPG13 (MIM# 605280) [Stevanin et al., 2008].

## Acknowledgments

The authors thank the family members for their participation, and Isabelle Lagroua, Elodie Denis, Ludmilla Jornea, Florie Fauché, Philippe Martin-Hardy, José-Carlos Fernandez, and Lionel Quentin for their contribution to the extraction of patients' and controls' DNA.

## References

- Arnoldi A, Tonelli A, Crippa F, Villani G, Pacelli C, Sironi M, Pozzoli U, D'Angelo MG, Meola G, Martinuzzi A, Crimella C, Redaelli F, Panzeri C, Renieri A, Comi GP, Turconi AC, Bresolin N, Bassi MT. 2008. A clinical, genetic, and biochemical characterization of SPG7 mutations in a large cohort of patients with hereditary spastic paraplegia. *Hum Mutat* 29:522–531.
- Atorino L, Silvestri L, Koppen M, Cassina L, Ballabio A, Marconi R, Langer T, Casari G. 2003. Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol* 163:777–787.
- Battini R, Fogli A, Borghetti D, Michelucci A, Perazza S, Baldinotti F, Conidi ME, Ferreri MI, Simi P, Cioni G. 2011. Clinical and genetic findings in a series of Italian children with pure hereditary spastic paraplegia. *Eur J Neurol* 18:150–157.
- Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, Stajich JE, Hulette C, Dew-Knight S, Hentati F, Ben Hamida M, Bel S, Stenger JE, Gilbert JR, Pericak-Vance MA, Vance JM. 2002. Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 30:21–22.
- Beetz C, Schule R, Deconinck T, Tran-Viet KN, Zhu H, Kremer BP, Frints SG, van Zelst-Stams WA, Byrne P, Otto S, Nygren AO, Baets J, Smets K, Ceulemans B, Dan B, Nagan N, Kassubek J, Klumpe S, Klopstock T, Stolze H, Smeets HJ, Schrander-Stumpel CT, Hutchinson M, van de Warrenburg BP, Braastad C, Deufel T, Pericak-Vance M, Schols L, de Jonghe P, Zuchner S. 2008. *REEP1* mutation spectrum and genotype/phenotype correlation in hereditary spastic paraplegia type 31. *Brain* 131:1078–1086.
- Behan WM, Maia M. 1974. Strumpell's familial spastic paraplegia: genetics and neuropathology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 37:8–20.
- Behrens M, Bartelt J, Reichling C, Winnig M, Kuhn C, Meyerhof W. 2006. Members of RTP and REEP gene families influence functional bitter taste receptor expression. *J Biol Chem* 281:20650–20659.
- Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, Rossignol R. 2007. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 120:838–848.
- Bruyn RP. 1992. The neuropathology of hereditary spastic paraparesis. *Clin Neurol Neurosurg* 94 Suppl:S16–S18.
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3:285–298.
- Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, Zeviani M, Mora M, Fernandez P, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Marconi R, Durr A, Fontaine B, Ballabio A. 1998. Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 93:973–983.
- Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, Malinge MC, Letournel F, Nicolas G, Richard L, Ferre M, Verny C, Dubas F, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P. 2009. Mitochondrial complex I deficiency in *GDAP1*-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics* 10:145–150.
- Chevrollier A, Guillet V, Loiseau D, Gueguen N, de Crescenzo MA, Verny C, Ferre M, Dollfus H, Odent S, Milea D, Goizet C, Amati-Bonneau P, Procaccio V, Bonneau D, Reynier P. 2008. Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol* 63:794–798.
- Coutinho P, Barros J, Zemmouri R, Guimaraes J, Alves C, Choroa R, Lourenco E, Ribeiro P, Loureiro JL, Santos JV, Hamri A, Paternotte C, Hazan J, Silva MC, Prud'homme JF, Grid D. 1999. Clinical heterogeneity of autosomal recessive spastic paraplegias: analysis of 106 patients in 46 families. *Arch Neurol* 56:943–949.
- de Brito OM, Scorrano L. 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456:605–610.
- de Brito OM, Scorrano L. 2010. An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *Embo J* 29:2715–2723.

- Del Bo R, Moggi M, Rango M, Bonato S, D'Angelo MG, Ghezzi S, Airoldi G, Bassi MT, Guglieri M, Napoli L, Lamperti C, Corti S, Federico A, Bresolin N, Comi GP. 2008. Mutated mitofusin 2 presents with intrafamilial variability and brain mitochondrial dysfunction. *Neurology* 71:1959–1966.
- Deleltre C, Lenaers G, Griffioen JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquellec L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP. 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26:207–210.
- Depienne C, Fedirko E, Forlani S, Cazeneuve C, Ribai P, Feki I, Tallaksen C, Nguyen K, Stankoff B, Ruberg M, Stevanin G, Durr A, Brice A. 2007a. Exon deletions of SPG4 are a frequent cause of hereditary spastic paraplegia. *J Med Genet* 44:281–284.
- Depienne C, Tallaksen C, Lephay JY, Bricka B, Poëa-Guyon S, Fontaine B, Labauge P, Brice A, Durr A. 2006. Spastin mutations are frequent in sporadic spastic paraparesis and their spectrum is different from that observed in familial cases. *J Med Genet* 43:259–265.
- Depienne C, Stevanin G, Brice A, Durr A. 2007b. Hereditary spastic paraplegias: an update. *Curr Opin Neurol* 20:674–680.
- Dubowitz V. 1985. *Muscle biopsy: a practical approach*, 2nd edition. London: Baillière Tindall.
- Dubowitz V, Sewry CA. 2007. *Muscle biopsy: a practical approach*, 3rd edition. Saunders Elsevier.
- Erichsen AK, Koht J, Stray-Pedersen A, Abdelnoor M, Tallaksen CM. 2009. Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway: a population-based study. *Brain* 132:1577–1588.
- Filla A, De Michele G, Marconi R, Bucci L, Carillo C, Castellano AE, Iorio L, Kniahynicki C, Rossi F, Campanella G. 1992. Prevalence of hereditary ataxias and spastic paraplegias in Molise, a region of Italy. *J Neurol* 239:351–353.
- Fink JK. 2006. Hereditary spastic paraplegia. *Curr Neurol Neurosci Rep* 6:65–76.
- Goizet C, Boukhris A, Durr A, Beetz C, Truchetto J, Tesson C, Tsaousidou M, Forlani S, Guyant-Marechal L, Fontaine B, Guimaraes J, Isidor B, Chazouilleres O, Wendum D, Grid D, Chevry F, Chinnery PF, Coutinho P, Azulay JP, Feki I, Mochel F, Wolf C, Mhiri C, Crosby A, Brice A, Stevanin G. 2009a. CYP7B1 mutations in pure and complex forms of hereditary spastic paraplegia type 5. *Brain* 132:1589–1600.
- Goizet C, Boukhris A, Mundwiller E, Tallaksen C, Forlani S, Toutain A, Carriere N, Paquis V, Depienne C, Durr A, Stevanin G, Brice A. 2009b. Complicated forms of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia are frequent in SPG10. *Hum Mutat* 30:E376–E385.
- Harding AE. 1983. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1:1151–1155.
- Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczy G, Su TP. 2009. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 19:81–88.
- Hewamadduma C, McDermott C, Kirby J, Grierson A, Panayi M, Dalton A, Rajabally Y, Shaw P. 2009. New pedigrees and novel mutation expand the phenotype of REEP1-associated hereditary spastic paraplegia (HSP). *Neurogenetics* 10:105–110.
- Ito D, Suzuki N. 2009. Seipinopathy: a novel endoplasmic reticulum stress-associated disease. *Brain* 132:8–15.
- Klebe S, Lacour A, Durr A, Stojkovic T, Depienne C, Forlani S, Poëa-Guyon S, Vuillaume I, Sablonniere B, Vermersch P, Brice A, Stevanin G. 2007. NIPA1 (SPG6) mutations are a rare cause of autosomal dominant spastic paraplegia in Europe. *Neurogenetics* 8:155–157.
- Letellier T, Malgat M, Coquet M, Moretto B, Parrot-Roulaud F, Mazat JP. 1992. Mitochondrial myopathy studies on permeabilized muscle fibers. *Pediatr Res* 32:17–22.
- Liu SG, Che FY, Heng XY, Li FF, Huang SZ, Lu de G, Hou SJ, Liu SE, Wang Q, Wang HP, Ma X. 2009. Clinical and genetic study of a novel mutation in the REEP1 gene. *Synapse* 63:201–205.
- Loiseau D, Chevrollier A, VERNY C, Guillet V, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, Ferre M, Malinge MC, Guichet A, Nicolas G, Amati-Bonneau P, Malthiery Y, Bonneau D, Reynier P. 2007. Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol* 61:315–323.
- McDermott CJ, Taylor RW, Hayes C, Johnson M, Bushby KM, Turnbull DM, Shaw PJ. 2003. Investigation of mitochondrial function in hereditary spastic paraparesis. *Neuroreport* 14:485–488.
- Merkwirth C, Langer T. 2008. Mitofusin 2 builds a bridge between ER and mitochondria. *Cell* 135:1165–1167.
- Namekawa M, Ribai P, Nelson I, Forlani S, Fellmann F, Goizet C, Depienne C, Stevanin G, Ruberg M, Durr A, Brice A. 2006. SPG3A is the most frequent cause of hereditary spastic paraplegia with onset before age 10 years. *Neurology* 66:112–114.
- Noensie EN, Dietz HC. 2001. A strategy for disease gene identification through nonsense-mediated mRNA decay inhibition. *Nat Biotechnol* 19:434–439.
- Osman C, Voelker DR, Langer T. 2011. Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J Cell Biol* 192:7–16.
- Park SH, Zhu PP, Parker RL, Blackstone C. 2010. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest* 120:1097–1110.
- Polo JM, Calleja J, Combarros O, Berciano J. 1993. Hereditary "pure" spastic paraplegia: a study of nine families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56:175–181.
- Saito H, Kubota M, Roberts RW, Chi Q, Matsunami H. 2004. RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell* 119:679–691.
- Salameh JS, Shenoy AM, David WS. 2009. Novel SPG3A and SPG4 mutations in two patients with Silver syndrome. *J Clin Neuromuscul Dis* 11:57–59.
- Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner TT. 2008. Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol* 7:1127–1138.
- Schlang KJ, Arning L, Epplen JT, Stemmler S. 2008. Autosomal dominant hereditary spastic paraplegia: novel mutations in the REEP1 gene (SPG31). *BMC Med Genet* 9:71.
- Schlipf NA, Beetz C, Schule R, Stevanin G, Erichsen AK, Forlani S, Zaros C, Karle K, Klebe S, Klimpe S, Durr A, Otto S, Tallaksen CM, Riess O, Brice A, Bauer P, Schols L. 2010. A total of 220 patients with autosomal dominant spastic paraplegia do not display mutations in the SLC33A1 gene (SPG42). *Eur J Hum Genet* 18:1065–1067.
- Stevanin G, Ruberg M, Brice A. 2008. Recent advances in the genetics of spastic paraplegias. *Curr Neurol Neurosci Rep* 8:198–210.
- Tzschach A, Graul-Neumann LM, Konrat K, Richter R, Ebert G, Ullmann R, Neitzel H. 2009. Interstitial deletion 2p11.2-p12: report of a patient with mental retardation and review of the literature. *Am J Med Genet A* 149A:242–245.
- Waterham HR, Koster J, van Roermund CW, Mooyer PA, Wanders RJ, Leonard JV. 2007. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med* 356:1736–1741.
- Windpassinger C, Auer-Grumbach M, Irobi J, Patel H, Petek E, Horl G, Malli R, Reed JA, Dierick I, Verpoorten N, Warner TT, Proukakis C, Van den Bergh P, Verellen C, Van Maldergem L, Merlini L, De Jonghe P, Timmerman V, Crosby AH, Wagner K. 2004. Heterozygous missense mutations in BSLCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome. *Nat Genet* 36:271–276.
- Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Gorman GS, Lourenco CM, Wright AF, Auer-Grumbach M, Toscano A, Musumeci O, Valentino ML, Caporali L, Lamperti C, Tallaksen CM, Duffey P, Miller J, Whittaker RG, Baker MR, Jackson MJ, Clarke MP, Dhillon B, Czermin B, Stewart JD, Hudson G, Reynier P, Bonneau D, Marques W. Jr, Lenaers G, McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM, Votruba M, Zeviani M, Carelli V, Bindoff LA, Horvath R, Amati-Bonneau P, Chinnery PF. 2010. Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. *Brain* 133:771–786.
- Zuchner S, Mersyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM, Vance JM. 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36:449–451.
- Zuchner S, Wang G, Tran-Viet KN, Nance MA, Gaskell PC, Vance JM, Ashley-Koch AE, Pericak-Vance MA. 2006. Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31. *Am J Hum Genet* 79:365–369.

## Article n°2

Molecular and biochemical characterization of SPG5 patients and development of a zebrafish model

Julie Lavie, Julie Pilliod, Angele Tingaud, Foudil Lamari, Pharm D, Magali Bordier, Paola Galli, Guillaume Banneau, Christelle Durand, Cécile Cazeneuve, Fanny Mochel, Perrine Charles, Sylvie Odent, Amir Boukhris, Christelle Thauvin, Sylvie Forlani, Marie-Lorrain Morin, Sandra Benaich, Fabien Lesne, Alexis Brice, Didier Lacombe, Alexandra Durr, Giovanni Stevanin, Isabelle Coupry, Patrick Babin, Cyril Goizet

*En préparation*