

Ataxie de Friedreich : les expansions de triplets frappent encore

La maladie

Parmi les maladies neurologiques ou neuromusculaires héréditaires « classiques », dont le tableau avait été décrit au XIX^e siècle, l'ataxie de Friedreich était la dernière dont le gène n'était pas encore identifié, après les succès concernant les maladies de Duchenne, Steinert, Charcot-Marie-Tooth et de Huntington. Au terme d'un travail mené depuis huit ans dans notre équipe, en collaboration très étroite cette dernière année avec celle de Massimo Pandolfo à Houston, une approche de clonage positionnel strict a permis d'identifier le gène, de fonction inconnue, et a révélé de manière totalement inattendue, qu'une expansion de répétition trinucleotidique d'un type nouveau était responsable de la quasi-totalité des cas [1].

L'ataxie de Friedreich fut décrite en 1863 [2] par le neurologue allemand Nikolaus Friedreich (1825-1888). C'est une maladie autosomique récessive gravement invalidante, dont l'incidence est estimée à 1 pour 50 000 dans les populations européennes [3, 4], ce qui en fait la plus fréquente des ataxies héréditaires. Les premiers signes apparaissent en général entre les âges de 5 et 15 ans (et, par définition, toujours avant 25 ans). Cliniquement, elle se caractérise par une ataxie cérébelleuse avec instabilité à la marche et une dysarthrie rendant l'élocution très difficile, une perte des réflexes ostéotendineux et de la sensibilité profonde [5, 6]. Ces signes, liés à une dégénérescence des fibres sensitives des cordons postérieurs de la moelle épinière, évoluent de manière progressive et entraînent la perte de la

marche en moyenne vers l'âge de 20-30 ans. Une cardiomyopathie hypertrophique (qui peut être discrète) est retrouvée dans la quasi-totalité des cas; la scoliose est fréquente; enfin, les patients présentent un risque accru de diabète.

Au début des années 1980, des études peu convaincantes et contradictoires avaient suggéré des anomalies du métabolisme intermédiaire ou de la taurine (un dérivé de la cystéine, présent en quantité importante dans le système nerveux central), ou même de la réparation de l'ADN. Comme pour la plupart des maladies génétiques, en l'absence d'hypothèse fonctionnelle crédible, le clonage positionnel est apparu comme la seule stratégie possible.

Petite histoire d'une longue traque

L'analyse de liaison génétique fut entreprise par Sue Chamberlain, au départ avec les héroïques, mais peu efficaces, marqueurs sérologiques ou enzymatiques, puis, dans le laboratoire de Robert Williamson à Londres, en utilisant les RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*). En 1987, Paul Trouillas (Lyon), alors président du conseil scientifique d'une sympathique et active association de malades, l'AFAF, contacta l'un d'entre nous, pour suggérer qu'une recherche génétique soit entreprise. Le nombre de familles susceptibles de participer apparaissait suffisant, et une collecte fut organisée en 1987 par Yves Agid et Paul Trouillas. André Hanauer à Strasbourg entreprit de réunir les sondes polymorphiques nécessaires et débuta l'analyse de liaison. En mai 1988, Sue Chamberlain publia la localisation

sur le chromosome 9, par démonstration d'une liaison avec le marqueur RFLP *D9S15* (*m/s* n° 8, vol. 4, p. 528) [7]. Ce résultat fut très vite confirmé par André Hanauer, qui identifia un deuxième marqueur lié, *D9S5* [8], localisé en 9q13-q21 [9]. Dès 1990, les résultats des équipes londoniennes et strasbourgeoises [9,10] montraient que l'ataxie de Friedreich était génétiquement homogène, la maladie paraissant liée au chromosome 9 dans toutes les familles étudiées, et que le gène était très proche (moins de 2cM) des marqueurs *D9S5* et *D9S15*, eux-mêmes séparés par moins de 400 kilobases [11-13]. Nous démontrions l'existence d'un déséquilibre de liaison entre la maladie et ces marqueurs [14], confirmant leur très grande proximité, et suggérant la présence, chez les malades français, d'une mutation rendant compte d'au moins un tiers des allèles morbides (notre étude était, par ailleurs, la première à montrer que les microsatellites sont suffisamment stables pour être utilisés dans des analyses de déséquilibre de liaison, de manière particulièrement efficace grâce à leur grande informativité). C'était l'époque des premières banques de YAC, et grâce à des collaborations avec les laboratoires de David Schlessinger (Saint Louis, MI, USA) et de Daniel Cohen (CEPH), nous obtinons les clones YAC de la région [15, 16]. Une cartographie physique et génétique détaillée fut entreprise (par R. Fujita, G. Sirugo, F. Duclos et F. Rodius (Strasbourg, France), incluant la caractérisation systématique de microsatellites de la région [15-18] (plus d'une douzaine au total, sur une région de 1000 kilobases), et l'étude du déséquilibre de

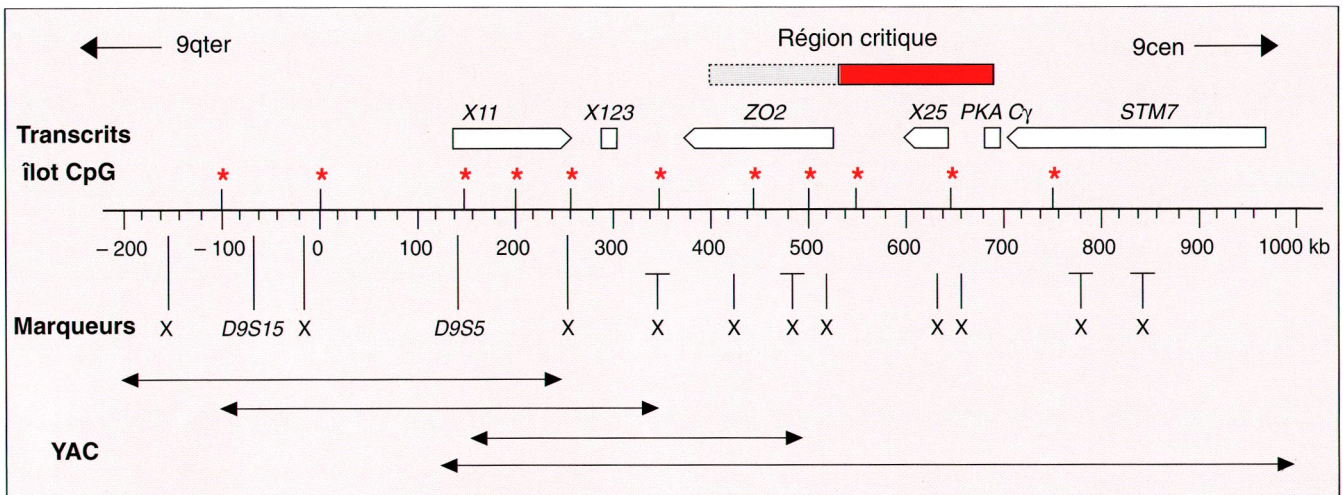


Figure 1. **Carte génétique, physique et transcriptionnelle autour du locus de l'ataxie de Friedreich.** Les îlots CpG, indicateurs potentiels d'extrémité 5' de gène sont indiqués par des étoiles rouges, les marqueurs multialléliques sont indiqués par des croix. Seul le nom des deux marqueurs liés initialement identifiés est donné (D9S15 et D9S5). La région critique est définie par les deux recombinaisons les plus proches du locus de l'ataxie de Friedreich. Elle est divisée en deux parties dont l'une, en pointillés, correspond à l'exclusion du gène ZO-2 sur la base de l'absence de mutation chez les malades. ZO-2: gène codant pour la protéine zona occludens-2 (protéine de jonction cellulaire), PKA C γ : gène de la protéine kinase A sous-unité C γ , X25 est le gène de l'ataxie de Friedreich, codant pour la frataxine.

liaison, notamment dans des populations génétiquement plus homogènes où l'ataxie de Friedreich apparaissait relativement fréquente (Cajuns de Louisiane, Île de la Réunion), et où un effet fondateur favorisa l'interprétation des résultats pour la localisation du gène morbide [16, 18]. D'autres équipes (Massimo Pandolfo à Milan, F. Palau à Valence en Espagne, et S. Mélançon à Montréal) se joignirent aux efforts de cartographie. Une collaboration internationale permit d'identifier un très petit nombre de familles comportant des recombinaisons méiotiques précieuses pour la localisation du gène AF [19, 20].

Une diversion

Cette recherche de familles recombinantes nous entraîna dans une diversion intéressante. Parmi quatre grandes familles consanguines tunisiennes avec diagnostic d'ataxie de Friedreich identifiées par le Pr. M. Ben Hamida à Tunis, deux n'étaient pas liées au chromosome 9, ce qui paraissait mettre en cause l'homogénéité génétique de la maladie [21]. Une analyse plus poussée montra qu'un déficit en vitamine E,

d'hérédité autosomique récessive était en cause. Cette entité paraissait très rare, car 11 cas seulement avaient été publiés depuis la description originale en 1981 [22]. Nous identifions rapidement quatre familles supplémentaires, toutes avec un diagnostic initial d'ataxie de Friedreich, mais qui apparaissaient recombinantes avec les marqueurs du chromosome 9. Mettant à profit leur consanguinité, une stratégie de cartographie par homozygotie permit de localiser rapidement le gène de l'AVED (*ataxia with vitamin E deficiency*) sur le chromosome 8 (*m/s n° 12, vol. 9, p. 1417*) [23]. Un bon gène candidat cloné par une équipe japonaise, codant pour une protéine de transfert hépatique du tocophérol, était retrouvé muté chez les malades [24]. Surtout, ce travail avait révélé que la moitié des familles avec diagnostic de Friedreich originaires des pays du Maghreb avaient, en fait, un déficit en vitamine E, et auraient pu bénéficier d'un traitement vitaminique peu coûteux, préventif de la neurodégénérescence.

L'hallali

Grâce à l'analyse des familles « recombinantes » et de l'homozygotie dans des familles consanguines, la région candidate fut progressivement restreinte par F. Rodius et F. Duclos à une région de 450 kb en 1993 [16], 300 kb en 1994 [25] et finalement de 150 kilobases début 1995 [17]. En parallèle, la recherche de gènes était effectuée dans notre laboratoire par amplification d'exon et par séquençage partiel et prédiction informatique d'exons, et ces gènes étaient systématiquement testés pour la présence de mutations. Nous faisons l'hypothèse que, comme dans pratiquement toutes les maladies récessives, il devait exister une grande diversité de mutations, hypothèse qui paraissait confirmée par la grande diversité des haplotypes dans les populations européennes. C'est ainsi que quatre gènes furent successivement identifiés (*m/s n° 3, vol. 9, p. 344*) [17, 25, 26], puis exclus (ainsi qu'un cinquième gène caractérisé par l'équipe de Sue Chamberlain [27]). À partir d'un exon amplifié, un nouveau gène (dénommé X25), assez petit, fut caractérisé grâce à la collaboration étroite entre notre

équipe et celle de Massimo Pandolfo (à Houston depuis 1994). Une recherche de mutations par technique SSCP (*single strand conformation polymorphism*) fut alors entreprise, et en juin 1995, une mutation non sens identifiée dans notre laboratoire. Notre enthousiasme ne fut que de courte durée, car cette mutation n'était présente à l'état hétérozygote que chez un seul malade, et aucune autre mutation n'était retrouvée dans la soixantaine de patients provenant de familles différentes (correspondant donc à 120 allèles mutés), après analyse de tous les exons. Une recherche de mutations, effectuée chez 125 autres patients à Naples et Valence, aboutit à l'identification d'une mutation hétérozygote de site d'épissage chez un patient espagnol, et d'un changement d'acide aminé (isoleucine en phénylalanine, également à l'état hétérozygote) dans trois familles du Sud de l'Italie, et dont il était *a priori* difficile de savoir s'il s'agissait d'une mutation fonctionnellement significative ou d'un polymorphisme rare. Ces résultats étaient troublants, et nous conduisirent à deux hypothèses mutuellement exclusives: soit ce gène était le bon, et il fallait supposer qu'il existait une mutation très largement prédominante que nous n'avions pas détectée, ou une région très chaude de mutations, située dans une région non codante ou dans un éventuel exon alternatif; soit, seconde hypothèse moins favorable, les deux mutations, détectées chacune à une fréquence très faible, ainsi que le gène muté, étaient sans rapport avec l'ataxie de Friedreich. En effet, des observations récentes avaient démontré que l'on pouvait retrouver dans la population générale, des mutations inactivant des gènes pourtant considérés comme fonctionnellement importants. C'est ainsi que des mutations nulles, c'est-à-dire aboutissant à l'absence d'expression de l'allèle muté, ont été retrouvées dans les gènes des récepteurs de la dopamine D5 (à l'état hétérozygote [28]) ou de la dopamine D4 (à l'état homozygote [29]) et, de manière encore plus étonnante, une mutation inactivant le gène codant pour une neurotrophine (le *ciliary neurotrophic factor* ou

CNTF) est présente à l'état homozygote chez 2% des japonais [30], alors que l'inactivation du même gène chez la souris entraîne une dégénérescence de motoneurons, à vrai dire modérée (*m/s n° 11, vol. 9, p. 1269*). Toutefois une observation troublante était faite à Strasbourg (V. Campuzano) et à Houston. Les transcrits du gène X25 étaient beaucoup plus faiblement détectés (par RT-PCR) dans des lignées lymphoblastoïdes de patients que chez les témoins. Massimo Pandolfo émit alors l'hypothèse d'une anomalie de transcription consécutive à une anomalie de méthylation au niveau des séquences régulatrices. En testant cette hypothèse, par *Southern blot*, il constata que tous les malades présentaient un fragment EcoRI anormal d'environ 11 kb, plus grand que celui présent dans la population témoin (8 kb), alors que les parents des malades présentaient les deux fragments. Ce fragment contient l'exon 1 et une partie du premier intron. L'observation fut confirmée à Strasbourg et Naples, à l'exception des patients pour lesquels une mutation ponctuelle avait été identifiée à l'état hétérozygote, et où le fragment anormal était présent, également à l'état hétérozygote, sur l'autre chromosome. L'existence d'une insertion et sa localisation dans l'intron furent établies chez Pandolfo par PCR de grands fragments (*long range PCR*). Cette région contient à l'état normal une répétition du trinucléotide GAA présente dans une séquence Alu (l'allèle le plus fréquent contenant 9 répétitions). M. Cossée (Strasbourg) amplifia et séquença cette région chez un malade, démontrant la présence d'une grande expansion de la répétition GAA. Cette expansion est instable lors de la transmission de parent à enfant, et la majorité des allèles pathologiques correspondent à 700-800 répétitions.

Un gène de fonction inconnue, conservé chez la levure

Le gène X25 est assez petit (environ 40 kb, 5 exons), et code pour une protéine de 210 acides aminés, qui ne ressemble à aucune protéine de fonction connue, et que nous avons appe-

lée frataxine (un épissage alternatif est susceptible d'engendrer une protéine de 171 acides aminés). Une prédiction informatique de peptide signal hydrophobe suggère qu'il pourrait s'agir d'une protéine sécrétée. Des résultats très préliminaires montrent la présence du message dans le système nerveux, le cœur et le pancréas, ce qui correspond assez bien aux traits de la maladie (neurodégénérescence, cardiomyopathie, risque accru de diabète). De manière étonnante, une très forte conservation d'une partie de la frataxine est retrouvée dans des protéines prédites par séquençage systématique de la levure et du ver *Caenorhabditis elegans*. L'inactivation du gène chez la levure, si elle donne un phénotype détectable, pourrait orienter la recherche de fonction. Nous espérons, évidemment, que l'analyse de cette fonction orientera vers des possibilités thérapeutiques (surtout si le caractère de protéine sécrétée se confirme).

Une mutation très inattendue

La découverte d'une expansion trinucléotidique est inattendue à plus d'un titre. C'est la première fois que ce mécanisme est mis en évidence dans une maladie autosomique récessive (les dix autres maladies dues à une expansion de triplets correspondant à des maladies autosomiques dominantes ou liées au chromosome X). Le phénomène d'anticipation, présent à des degrés divers dans ces maladies, ne peut être observé dans une maladie autosomique récessive, car le phénotype clinique ne se manifeste, sauf très rares exceptions, que dans une seule génération. Il s'agit clairement d'une mutation entraînant une forte diminution ou une perte de fonction, affectant la transcription ou, plus probablement, l'épissage. La perte de fonction est démontrée par l'équivalence avec les deux mutations ponctuelles inactivant clairement l'expression du gène, et retrouvées à l'état hétérozygote chez des malades porteurs de l'expansion sur l'autre allèle. La situation est donc beaucoup plus claire que pour la maladie de Steinert où, quatre ans après la découverte de l'expansion de répétition CTG, son

effet sur l'expression du gène *myotonic kinase* n'est pas encore éclairci (haplo-insuffisance, effet dominant négatif, gain de fonction, effet sur le gène adjacent?) et fait l'objet de controverses. En fait, la situation paraît assez similaire à celle du syndrome X fragile, où l'expansion entraîne une perte d'expression, et dans lequel de très rares autres mutations (délétions, déphasage du cadre de lecture) produisent chez les patients le même phénotype clinique. Il n'y a, en revanche, aucune similitude d'effet avec les expansions de CAG codant pour des polyglutamines, retrouvées dans diverses formes d'ataxies spino-cérébelleuses, où un gain de propriété toxique est en cause [31]. Plus inattendue encore est l'implication du trinucléotide GAA. En effet, tous les cas connus jusqu'ici ne concernaient que les trinucléotides CGG pour le syndrome X fragile (FRAXA) et quatre autres sites fragiles sensibles au folate sur les chromosomes X (FRAXE, FRAXF), 11 (FRA11B) ou 16 (FRA16), ou CTG/CAG (équivalents au niveau de l'ADN), impliqués dans la maladie de Steinert, dans la maladie de Huntington et dans quatre autres maladies neurodégénératives dites à expansion de polyglutamines. On pouvait donc se demander si d'autres motifs (trinucléotides ou autres) étaient susceptibles d'être impliqués dans des expansions. Deux articles récents, s'appuyant sur des études structurales et des modélisations des répétitions, suggéraient que l'instabilité de ces séquences, notable au-delà de 50 répétitions, était due à leur aptitude à engendrer des structures stables en épingle à cheveu [32, 33]. L'un des articles rapportait que les répétitions GAA seraient incapables de former de telles structures !

Comme pour plusieurs des autres maladies à expansion, l'importance du déséquilibre de liaison entre la maladie et les marqueurs proches, indique l'existence d'effets fondateurs. Des résultats préliminaires récents, obtenus avec des marqueurs plus proches du site de mutation que ceux utilisés antérieurement, suggèrent qu'un effet fondateur unique, et donc très ancien, pourrait concerner la grande majorité des malades d'ori-

gine européenne. S'agit-il directement d'un événement d'expansion massive, engendrant une mutation relativement stable et qui se serait largement répandue ou, plus probablement, d'un événement créant un allèle normal avec plus de répétitions que les autres (environ 20 % des allèles normaux ont entre 18 à 25 GAA), et pouvant servir de réservoir pour des mutations récurrentes évoluant sur plusieurs générations vers un allèle pathologique? Comme nous l'avons montré, ce dernier mécanisme rend compte de l'extraordinaire effet fondateur (commun aux populations européennes et japonaises), retrouvé dans la maladie de Steinert [34]. L'analyse de la répétition GAA dans la population normale, et chez les grands-parents de malades, doit permettre de répondre à cette question. La découverte de ce nouveau type d'expansion ouvre la possibilité d'une implication dans d'autres maladies autosomiques récessives, en particulier dans l'hémochromatose, où un déséquilibre de liaison particulièrement frappant est retrouvé dans plusieurs populations. Il sera également intéressant de rechercher des corrélations entre taille de l'expansion et sévérité du phénotype et, notamment, de voir si des expansions plus modérées pourraient être responsables de tableaux cliniques non attribués à l'ataxie de Friedreich, dont le critère de définition comporte un âge de début avant 25 (ou 20) ans, ou de savoir si l'homozygotie pour une perte complète de fonction est létale ou non. La présence d'une mutation pratiquement unique facilitera le diagnostic différentiel des neuropathies avec ataxie et permettra de répondre à une interrogation fréquente de la part des frères et sœurs des malades, concernant le risque d'avoir eux-mêmes un enfant atteint (le risque *a priori* n'est toutefois que de 0,3 % environ). Il sera possible de les rassurer complètement, en testant le conjoint pour la présence improbable (une chance sur 120) d'une expansion ■

TIRÉS À PART

M. Koenig.

Remerciements

Nous tenons à remercier tous les participants à ce travail : André Hanauer qui a débuté le travail, les étudiants et post docs qui se sont succédé, Ricardo Fujita, Giorgio Sirugo, Franck Duclos, François Rodius, Mireille Cossée, Victoria Campuzano, ainsi que Laurence Reutenauer, Serge Vicaire, Ingrid Colas et Frank Ruffenach pour leur aide technique, Frederic Plewniak pour l'informatique, Massimo Pandolfo et ses collègues pour une collaboration cruciale, efficace et agréable, Paul Trouillas, Yves Agid, Abdoulaye Seck, Alexis Brice, Mongi Ben Hamida et collègues, Claude Mignard (La Réunion) pour le recueil des familles et bien d'autres collaborateurs à diverses étapes (David Schlessinger, Daniel Cohen et Denis Le Paslier, Jean Weissenbach et Gabor Gyapay, Bronya Keats, Andréa Richter). Ce travail, réalisé dans un laboratoire de l'Inserm et du Cnrs, a bénéficié d'un soutien important et jamais démenti de l'AFM, et de contrats du GREG. *Last, but not least*, nous remercions l'Association Française de l'Ataxie de Friedreich (AFAF), ses présidentes Mesdames Sylvie Carbone et Geneviève Vachon, et toutes les familles (plus de 125) et les patients, pour leur coopération indispensable et leur confiance.

Michel Koenig
Victoria Campuzano
Mireille Cossée
Jean-Louis Mandel

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Cnrs, Inserm et Université Louis-Pasteur, BP163, 67404 Illkirch.

RÉFÉRENCES

1. Campuzano V, Montermini L, Moltó MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Cañizares J, Koutnikova H, Bidichandani S, Gellera C, Brice A, Trouillas P, De Michele G, Filla A, de Frutos R, Palau F, Patel PI, Di Donato S, Mandel JL, Coccozza S, Koenig M, Pandolfo M. Friedreich ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996 (sous presse).
2. Friedreich N. Uber degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Virchows Arch Pathol Anat* 1863; 26: 391-419.
3. Skre, H. (1980) *Epidemiology of spinocerebellar degeneration in Western Norway: hereditary diseases* (University of Tokyo press, Tokyo), p. 103.
4. Leone M, Brignolio F, Rosso MG, Curtini ES, Moroni A, Tribolo A, Schoffer D. Friedreich's ataxia: a descriptive epidemiological study in an Italian population. *Clin Genet* 1990; 38: 161-9.

RÉFÉRENCES

5. Geoffroy G, Barbeau A, Breton G, Lemieux B, Aube M, Leger C, Bouchard JP, *et al.* Clinical description and roentgenologic evaluation of patients with Friedreich ataxia. *Can J Neurol Sci* 1976; 3: 279-86.
6. Harding AE. Friedreich ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnosis criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 1981; 104: 589-620.
7. Chamberlain S, Shaw J, Rowland A, Wallis J, South S, Nakamura Y, von Gabain A, Farrall M, Williamson R. Mapping of mutation causing Friedreich ataxia to human chromosome 9. *Nature* 1988; 334: 248-50.
8. Fujita R, Agid Y, Trouillas P, Seck A, Tommasi-Davenas C, Driesel AJ, Olek K, Grzeschik KH, Nakamura Y, Mandel JL, Hanauer H, *et al.* Confirmation of linkage of Friedreich ataxia to chromosome 9 and identification of a new closely linked marker. *Genomics* 1989; 4: 110-1.
9. Hanauer A, Chery M, Fujita R, Driesel AJ, Gilgenkrantz S, Mandel JL. The Friedreich ataxia gene is assigned to chromosome 9q13-q21 by mapping of tightly linked markers and shows linkage disequilibrium with D9S15. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 133-7.
10. Chamberlain S, Shaw J, Wallis J, Rowland A, Chow L, Farral M, Keats B, Richter A, Roy M, Melançon S, Deufel T, Berciano J, Williamson R. Genetic homogeneity at the Friedreich ataxia locus on chromosome 9. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 518-21.
11. Pandolfo M, Sirugo G, Antonelli A, Weitnauer L, Ferretti L, Leone M, Dones I, Cerino A, Fujita R, Hanauer A, Mandel JL, Di Donato S. Friedreich ataxia in Italian Families: Genetic Homogeneity and Linkage disequilibrium with the marker Loci D9S5 and D9S15. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 228-35.
12. Wilkes D, Shaw J, Anand R, Riley J, Winter P, Wallis J, Driesel AG, Williamson R, Chamberlain S. Identification of CpG islands in a physical map encompassing the Friedreich ataxia locus. *Genomics* 1991; 9: 90-5.
13. Fujita R, Hanauer A, Vincent A, Mandel JL, Koenig M. Physical mapping of two loci (D9S5 and D9S15) tightly linked to Friedreich ataxia locus (FRDA) and identification of nearby CpG islands by pulse-field gel electrophoresis. *Genomics* 1991; 10: 915-20.
14. Fujita R, Hanauer A, Sirugo G, Heilig R, Mandel JL. Additional polymorphisms at marker loci D9S5 and D9S15 generate extended haplotypes in linkage disequilibrium with Friedreich ataxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1796-800.
15. Fujita R, Sirugo G, Duclos F, Abderrahim H, Le Paslier D, Cohen D, Brownstein BH, Schlessinger D, Mandel JL, Koenig M. A 530 kb YAC contig tightly linked to the Friedreich ataxia locus contains five CpG clusters and a new highly polymorphic microsatellite. *Hum Genet* 1992; 89: 531-8.
16. Rodius F, Duclos F, Wrogemann K, Le Paslier D, Ougen P, Billault A, Belal S, Munsenger C, Brice A, Dürr A, Mignard C, Sirugo G, Weissenbach J, Cohen D, Hentati F, Ben Hamida M, Mandel JL, Koenig M. Recombinations in individuals homozygous by descent localize the Friedreich Ataxia locus in a cloned 450-kb interval. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 1050-9.
17. Montermini L, Rodius F, Pianese L, Moltó MD, Cossée M, Campuzano V, Cavalcanti F, Monticelli A, Palau F, Gyapay G, Wenhert M, Zara F, Patel PI, Cocozza S, Koenig M, Pandolfo M. The Friedreich ataxia critical region spans a 150-kb interval on chromosome 9q13. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1061-7.
18. Sirugo G, Keats B, Fujita R, Duclos F, Purohit K, Koenig M, Mandel JL. Friedreich ataxia locus in Louisiana Acadians: demonstration of a founder effect by analysis of microsatellite-generated extended haplotypes. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 559-66.
19. Chamberlain S, Farrall M, Shaw J, Wilkes D, Carvajal J, Hillermann R, Doudney K, Harding AE, Williamson R, Sirugo G, Fujita R, Koenig M, Mandel JL, Palau F, Monros E, Vilchez J, Prieto F, Richter A, Vanasse M, Melançon S, Coccoza S, Redolfi E, Cavalcanti F, Pianese L, Filla A, Di Donato S, Pandolfo M. Genetic recombination events which position the Friedreich ataxia locus proximal to the D9S15/D9S5 linkage group on chromosome 9q. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 99-109.
20. Belal S, Kyroula P, Sirugo G, Ben Hamida C, Panos I, Hentati F, Beckmann J, Koenig M, Mandel JL, Ben HM, Middleton LT. Study of large inbred Friedreich ataxia families reveals a recombination between D9S15 and the disease locus. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1372-6.
21. Ben Hamida M, Belal S, Sirugo G, Ben Hamida C, Panayides K, Ioannou P, Beckmann J, Mandel JL, Hentati F, Koenig M, Middleton L. Friedreich's ataxia phenotype not linked to chromosome 9 and associated with selective autosomal recessive vitamin E deficiency in two inbred Tunisian families. *Neurology* 1993; 43: 2179-83.
22. Burck U, Goebel HH, Kuhlendahl HD, Meier C, Goebel KM. Neuromyopathy and vitamin E deficiency in man. *Neuropediatrics* 1981; 12: 267-78.
23. Ben Hamida C, Doerflinger N, Belal S, Linder C, Reutenauer L, Dib C, Gyapay G, Vignal A, Le Paslier D, Cohen D, Pandolfo M, Mokini V, Novelli G, Hentati F, Ben Hamida M, Mandel JL, Koenig M. Localization of Friedreich ataxia phenotype with selective vitamin E deficiency to chromosome 8q by homozygosity mapping. *Nature Genet* 1993; 5: 195-200.
24. Ouahchi K, Arita M, Kayden HJ, Hentati F, Ben Hamida M, Sokol R, Arai H, Inoue K, Mandel JL, Koenig M. Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the α -tocopherol transfer protein. *Nature Genet* 1995; 9: 141-5.
25. Duclos F, Rodius F, Wrogemann K, Mandel JL, Koenig M. The Friedreich ataxia region: characterization of two novel genes and reduction of the critical region to 300 kb. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 909-14.
26. Duclos F, Boschert U, Sirugo G, Mandel J-L, Hen R, Koenig M. Gene in the region of the Friedreich ataxia locus encodes a putative transmembrane protein expressed in the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 109-13.
27. Carvajal J, Pook MA, Doudney K, Hillermann R, Wilkes D, Al-Mahdawi S, Williamson R, Chamberlain S. Friedreich ataxia: a defect in signal transduction? *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1411-9.
28. Sobell JL, Lind TJ, Sigurdson DC, Zald DH, Snitz BE, Grove WM, Heston LL, Sommer SS. The D5 dopamine receptor gene in schizophrenia: identification of a nonsense change and multiple missense changes but lack of association with the disease. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 507-14.
29. Nothen MM, Cichon S, Hemmer S, Hebebrand J, Remschmidt H, Lehmkuhl G, Poustka F, Schmidt M, Catalano M, Fimmers R, Körner J, Rietschel M, Propping P. Human dopamine D4 receptor gene frequent occurrence of a null allele and observation of homozygosity. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 2207-12.
30. Takahashi R, Yokoji H, Misawa H, Hayashi M, Hu J, Deguchi T. A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nature Genet* 1994; 7: 79-84.
31. Trottier Y, Lutz Y, Stevanin G, Imbert G, Devys D, Cancel G, Saudou F, Weber C, David G, Tora L, Agid Y, Brice A, Mandel JL. Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature* 1995; 378: 403-6.
32. Gacy AM, Goellner G, Juranic N, Macura S, McMurray CT. Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures *in vitro*. *Cell* 1995; 81: 533-40.
33. Chen X, Mariappan SVS, Catasti P, Ratliff R, Moyzis RK, Laayoun A, Smith SS, Bradbury EM, Gupta G. Hairpins are formed by the single DNA strands of the fragile X triplet repeats: structure and biological implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 92: 5199-203.
34. Imbert G, Kretz C, Johnson K, Mandel JL. Origin of the expansion mutation in myotonic dystrophy. *Nature Genet* 1993; 4: 72-6.