

Université de Montréal

Criblage génétique et caractérisation fonctionnelle des mutations dans les différentes sous-unités du récepteur GABA_A associées à l'épilepsie génétique généralisée

par

Programme de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en sciences biomédicales

28 octobre 2014

© Pamela Lachance-Touchette, 2014

Résumé

Les épilepsies génétiques généralisées (ÉGGs) sont un groupe de syndromes épileptiques hétérogènes qui se manifestent habituellement durant les périodes de l'enfance et de l'adolescence. Les ÉGGs représentent 30% de toutes les épilepsies. Il n'existe présentement aucun remède à l'épilepsie génétique généralisée. Au sein de ce groupe d'épilepsies, les sujets sont le plus souvent dépourvus de lésions cérébrales, ce qui signifie que les facteurs génétiques jouent un rôle important dans l'étiologie de la maladie. Au cours des dernières années, plusieurs gènes impliqués dans des formes familiales d'ÉGG ont été identifiés. La majorité d'entre elles codent pour des canaux ioniques incluant le récepteur-ligand GABA_A (RGABA_A). De ce groupe, des mutations ont été identifiées dans quatre sous-unités du récepteur GABA_A. Dans un premier temps, l'objectif général de cette thèse vise l'évaluation de la composante génétique de notre cohorte d'ÉGG expliquée par les gènes codant pour les sous-unités du récepteur GABA_A. Puis, dans un second souffle, le rôle des variants identifiés est défini et analysé afin de mieux cerner leurs impacts dans la pathogénèse de ce phénotype.

La première partie du projet consiste en une analyse exhaustive des mutations existantes dans la partie codante des 19 gènes GABRA pour des patients atteints d'ÉGG. En criblant des familles québécoises avec ÉGG, nous avons identifié 22 variants rares incluant 19 faux-sens et 3 non-sens dans 14 sous-unités du RGABA_A. En séquençant ces gènes dans une grande cohorte de cas et de contrôles, nous avons établi le profil des variations rares pour ceux-ci. Ces données suggèrent qu'une proportion significative (8%) des patients atteints d'ÉGG ont des variants rares sur les gènes du RGABA_A. La deuxième partie porte directement sur certains gènes identifiés lors de la première partie. De ce groupe, cinq nouvelles mutations ont été découvertes dans des gènes déjà associés à l'épilepsie (*GABRA1* et *GABRG2*). Nous avons constaté l'impact de ces mutations dans les mécanismes génétiques de l'épilepsie, en mesurant les effets des variants sur la structure et la fonction du récepteur GABA_A. La troisième partie se concentre sur notre hypothèse, voulant que les RGABA_A mutants altèrent l'effet du GABA durant le développement du système nerveux central (SNC). L'objectif principal vise à déterminer la contribution relative de chacune des sous-unités mutées dans le développement du SNC. Ainsi, nous avons démontré qu'une telle perte de fonction a un impact significatif sur le développement des synapses GABAergiques et glutamatergiques ainsi que sur la plasticité des circuits corticaux.

Nos résultats nous ont permis de préciser comment les mutations dans les gènes GABRA peuvent mener à l'ÉGG. Éventuellement, la caractérisation moléculaire de ces mutations contribuera à l'élaboration de nouveaux outils diagnostiques et facilitera la mise au point de traitements mieux ciblés pour les gens atteints de cette condition neurologique chronique.

Mots-clés: Épilepsie génétique généralisée, récepteur GABA_A, génétique

Abstract

Genetic generalized epilepsy (GGE) syndrome is a group of epilepsy disorders that occur early in childhood and adolescence. Genetics generalized epilepsies (GGE) account for approximately 30 % of all epilepsy syndromes. There is currently no cure for GGE. Although patients with GGE typically have no anatomical brain abnormalities, the root cause of these conditions is considered to be genetic in origin. An increasing number of genes predisposing to epilepsy have been identified over the past ten years. It has emerged in many cases that the causative genes for inherited epilepsies code for ion-channels such as the GABA_A receptor (GABA_AR). Among these genes, mutations in four subunits of the GABA_A receptor appear to be an important cause of familial epilepsy. The main aim of the present thesis is to better characterize the genetic component of our GGE cohort explain by GABRA genes and evaluated the critical role of these variants in the pathogenesis of this phenotype.

The first part of our project was to investigate the impact of rare variants of GABA_AR in GGE, we screened the coding regions of 19 genes encoding for all the known subunits of the GABA_AR in unrelated GGE patients, including familial cases. Overall, approximately 8% of our GGE individuals have novel GABRA mutations, including 19 missenses and 3 nonsenses including 1 frameshift mutation. By sequencing those genes in a large cohort of cases and controls, we were able to establish the profile of rare variants for these genes. Our data suggest that a significant proportion of GGE patients share rare variants in GABRA genes. The second part of the work builds on the genes bearing mutations identified in the sequencing analysis. Among this group, five novel mutations have been so far associated to this syndrome (*GABRA1* and *GABRG2*). We characterized the gating properties of GABA-evoked currents and the subcellular localization of the mutated subunits by expressing recombinant GABA_A receptors *in vitro*. The third part of the work aimed to characterize the impact of mutated GABA_A receptors on synapse formation and development of neuronal networks. By knocking down these genes in cortical organotypic slices, we provided a better understanding of the specific and distinct neural circuit alterations caused by different *GABRA1* mutations and help define the pathophysiology of genetic generalized epilepsy syndromes.

We believe that these findings will allow a better understanding of the genetic mechanisms underlying the disease and involve mutations in GABA_A receptors in critical mechanisms leading to epilepsy. Eventually, our results could lead to a better diagnosis and counteract the devastating effects of some GGEs early on before this complex condition has had the opportunity to be established.

Keywords: Genetic generalized epilepsy, GABA_A receptor, genetics

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XI
REMERCIEMENTS	III
1. INTRODUCTION	5
1.1 ÉPILEPSIE GÉNÉTIQUE GÉNÉRALISÉE: PRÉSENTATION CLINIQUE.....	7
1.1.1 Révision de la terminologie et des concepts des épilepsies	8
1.1.3 Diagnostic.....	12
1.1.3 Traitements et contrôle de l'épilepsie	12
1.1.4 Épidémiologie	13
1.2 ÉTIOLOGIE.....	15
1.2.1 Introduction.....	15
1.2.2 Les études de liaisons.....	17
1.2.3 Les études d'association génomique (GWAS).....	21
1.2.4 Les études de variations structurales.....	22
1.2.5 Les études de reséquençage.....	23
1.2.6 Canalopathie et autres évidences génétiques.....	26
1.3 PATHOGÉNÈSE MOLÉCULAIRE.....	28
1.3.1 Structure et fonction du $RGABA_A$	28
1.3.2 Distribution et diversité structurale du $RGABA_A$	30
1.3.3 Évolution génomique des gènes du $RGABA_A$ chez l'homo sapiens	31
1.3.4 L'implication du $RGABA_A$ dans le développement cérébral	33
1.4 PROBLÉMATIQUE.....	35
2. RESÉQUENÇAGE DE $GABRB3$ CHEZ DES FAMILLES CANADIENNES-FRANÇAISES AVEC ÉPILEPSIE GÉNÉTIQUE GÉNÉRALISÉE	38

2.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE.....	38
2.1.1 Contribution des auteurs	38
2.2 SCREENING OF <i>GABRB3</i> IN FRENCH-CANADIAN FAMILIES WITH IDIOPATHIC GENERALIZED EPILEPSY.....	39
2.2.1 Abstract	39
2.2.2 Introduction.....	39
2.2.3 Materials and Methods.....	40
2.2.4 Results	41
2.2.5 Discussion	42
2.2.6 Tableaux et figures.....	44
3. NOUVELLES MUTATIONS DÉCOUVERTES DANS LES SOUS-UNITÉS A1 ET Γ2 DU RÉCEPTEUR GABA_A DANS DES FAMILLES ASSOCIÉES À L'ÉPILEPSIE GÉNÉTIQUE GÉNÉRALISÉE	46
3.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE.....	46
3.1.1 Contribution des auteurs	46
3.2 NOVEL A1 AND Γ 2 GABA _A RECEPTOR SUBUNIT MUTATIONS IN FAMILIES WITH IDIOPATHIC GENERALIZED EPILEPSY	48
3.2.1 Abstract	48
3.2.2 Introduction.....	49
3.2.3 Materials and Methods.....	50
3.2.4 Results	56
3.2.5 Discussion	63
3.2.6 Tableaux et figures.....	67
4. CRIBLAGE GÉNÉTIQUE ET ANALYSE MUTATIONNELLE DES GÈNES GABA_A.....	82
4.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE.....	82
4.1.1 Contribution des auteurs	83
4.2 EXCESS OF RARE VARIANTS IN GABA _A RECEPTOR GENES IN PATIENTS WITH GENETIC GENERALIZED EPILEPSY	84
4.2.1 Abstract	84
4.2.2 Introduction.....	84
4.2.3 Materials and Methods.....	86
4.2.4 Results	89
4.2.5 Discussion	92

4.2.6 Tableaux et figures.....	95
5. LE RÔLE MAJEUR DES RÉCEPTEURS GABA_A MUTANTS DANS LA PATHOGENÈSE DE L'ÉPILEPSIE GÉNÉTIQUE GÉNÉRALISÉE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DU SNC.....	104
5.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE.....	104
5.1.1 Contribution des auteurs.....	105
5.2 SINGLE-CELL GENETIC EXPRESSION OF MUTANT GABA _A RECEPTORS CAUSING HUMAN GENETIC EPILEPSY ALTERS DENDRITIC SPINE AND GABA _A ERGIC BOUTON FORMATION IN A MUTATION-SPECIFIC MANNER.....	106
5.2.1 Abstract.....	106
5.2.2 Introduction.....	107
5.2.3 Materials and methods.....	109
5.2.4 Results.....	112
5.2.5 Discussion.....	115
5.2.6 Tableaux et figures.....	119
6. DISCUSSION.....	126
6.1 MANIFESTATIONS CLINIQUES ASSOCIÉES À DES SOUS-UNITÉS MUTANTES DU RGABA _A	126
6.1.1 Les syndromes épileptiques.....	126
6.1.2 Autres syndromes neurologiques.....	130
6.2 MODÈLE ANIMAUX DESTINÉS À L'ÉTUDE DU RGABA _A	132
6.3 ALTÉRATION DES FONCTIONS DU RGABA _A MUTANT.....	138
6.3.1 Investigations in silico des mutations dans les sous-unités du RGABA _A	138
6.3.2 Études in vitro et investigations des propriétés biophysiques des RGABA _A mutants.....	143
6.3.3 Investigations en culture neuronale des mutations dans les sous-unités du RGABA _A	147
6.4 AVANTAGES ET LIMITES DE NOS APPROCHES.....	150
6.4.1 Regard sur l'avenir de la neurogénétique.....	151
6.4.2 Discussion sur le gène GABRB3.....	153
6.4.3 Discussion sur les gènes GABRA1 et GABRG2.....	155
6.4.4 Approches émergentes dans le dépistage des gènes « épileptiques ».....	156
6.5 PERSPECTIVES ET PISTES À EXPLORER POUR DES ÉTUDES FONCTIONNELLES ULTÉRIEURES.....	160
6.5.1 Continuité sur notre modèle actuel.....	160
6.5.2 Limites du modèle.....	161
6.5.3 Autres modèles d'avenir.....	162
6.6 LES ENJEUX DE NOS RECHERCHES.....	164

7. BIBLIOGRAPHIE.....	166
ANNEXE I : CURRICULUM VITÆ.....	I

Liste des tableaux

Tableau 1.1.1. Proposition de la ILAE pour une révision de la terminologie et de l'organisation des crises et des épilepsies.....	9
Tableau 1.1.1.1. Classification des crises généralisées.....	11
Tableau 1.2.2. Études de liaison sur des cohortes de familles épileptiques	19
Tableau 1.2.6. Liste des gènes de prédisposition à aux épilepsies génétiques chez l'Humain	26
Tableau 2.2.6.1. Table 1. Inventory of the <i>GABRB3</i> variants found in our IGE cohort.....	44
Tableau 3.2.6.1. Table 1. Mutations identified in GABA _A receptor genes	67
Tableau 3.2.6.2. Table 2. Desensitization and off-kinetics of WT and mutant GABA _A receptors	68
Tableau 3.2.6.12. Supplemental Table 1. Clinical manifestations of the 16 affected individuals carrying novel GABA _A receptor mutations	80
Tableau 4.2.6.1. Table 1. Summary of mutations in GABA _A receptor subunit genes associated with genetic epilepsy syndromes	95
Tableau 4.2.6.2. Table 2. Rare and disruptive variants found in patients with GGE detected by candidate gene targeted resequencing.....	96
Tableau 4.2.6.6. Supplementary Table 1. Clinical features of patients and related family members carrying novel GABA _A receptor mutations.....	102
Tableau 4.2.6.7. Supplementary Table 2. Low coverage regions excluded from the analysis	103
Tableau 4.2.6.8. Supplementary Table 3. The sum of variants identified in controls in GABRA genes	103
Tableau 6.1.1. Liste des variants des sous-unités du récepteur GABA _A associés à l'épilepsie	129
Tableau 6.2.1. Liste des modèles de souris knock-out et knock-in pour les gènes <i>GABRD</i> , <i>GABRG2</i> , <i>GABRA1</i> et <i>GABRB3</i>	133
Tableau 6.3.1.1. Sommaire des prédictions <i>in silico</i> pour les variants connus des gènes GABRA associés à l'épilepsie	139
Tableau 6.3.1.2. Distribution des scores <i>in silico</i> par programme et par gène	141

Tableau 6.3.1.3. Distribution des scores RVIS pour 54 gènes épileptiques 142

Liste des figures

Figure 1.2.1. L'architecture génétique des épilepsies	17
Figure 1.2.4. Réseaux de collaborations internationales de cliniciens, de bioinformaticiens et de biologistes visant à étudier la génétique des épilepsies présentement en cours.....	22
Figure 1.3.2. Modèle du récepteur GABA _A	31
Figure 1.3.3. Clusters et localisation chromosomique des gènes du récepteur GABA _A	32
Figure 1.3.4. Homéostasie du chlore intracellulaire [Cl ⁻] _i au cours du développement.....	34
Figure 1.4.1. Plan expérimental	36
Figure 2.2.6.2. Figure 1. A French-Canadian family with childhood absence epilepsy and related phenotypes	45
Figure 3.2.6.3. Figure 1. Segregation profiles of the novel GABA _A receptor mutants in French Canadian families affected with IGE and related phenotypes	69
Figure 3.2.6.4. Figure 2. Sequencing of the K353delins18X mutation in <i>GABRA1</i>	70
Figure 3.2.6.5. Figure 3. Mutant $\alpha 1$ subunits co-localize with the endoplasmic reticulum (ER)	71
Figure 3.2.6.6. Figure 4. Surface expression of the mutant $\alpha 1$ subunits.....	72
Figure 3.2.6.7. Figure 5. Functional profile of wild-type and mutant GABA _A receptors.....	73
Figure 3.2.6.8. Figure 6. $\alpha 1$ K353delins18X –containing GABA _A receptors fail to express at the cell's surface	74
Figure 3.2.6.9. Figure 7. The $\alpha 1$ D219N subunit disrupts receptor re-equilibration kinetics .	75
Figure 3.2.6.10. Figure 8. The $\gamma 2$ P83S subunit assembles with wildtype $\alpha 1$ and $\beta 2$ GABA _A receptor subunits	77
Figure 3.2.6.11. Figure 9. The $\gamma 2$ P83S subunit does not abolish diazepam sensitivity	78
Figure 3.2.6.13. Supplemental Figure 1. Peptide sequence alignment of a portion of the <i>GABRA1</i> and <i>GABRG2</i> proteins from different species	81
Figure 4.2.6.3. Figure 1. Sequencing of the f151sfs*19 mutation in <i>GABRG2</i> gene	98
Figure 4.2.6.4. Figure 2. Segregation profiles of the novel GABA _A receptor mutants in families affected with GGE and related phenotypes.....	99
Figure 4.2.6.5. Figure 3. Box-plot diagrams showing the <i>in silico</i> scores for all rare variants in GABRA genes between the two groups (cases vs controls).....	100

Figure 5.2.6.1. Figure 1. Schematic of the experimental approach	119
Figure 5.2.6.2. Figure 2. $\alpha 1$ -A322D expression induces a significant increase in the number and maturation of dendritic spines in cortical pyramidal cells	120
Figure 5.2.6.3. Figure 3. $\alpha 1$ -A322D expression induces a significant increase in synapses formed by GABAergic cortical basket cells	122
Figure 5.2.6.4. Supplementary Figure 1. $\alpha 1$ -A322D expression induces a significant increase in spines density in cortical pyramidal cells	124
Figure 6.4.4.2. Modèles génétiques pour l'étude de l'épilepsie génétique généralisée	158
Figure 6.6.1. Ce diagramme illustre le concept « <i>from bench to bedside</i> »	165

Liste des sigles et abréviations

AD : autosomique dominante	JME : épilepsie myoclonique juvénile
ADNFLE : épilepsie autosomique dominante à crises frontales nocturnes	KI : knock-in
ADLTE : épilepsie latérale du lobe temporal autosomique dominante	KO : knock-out
BZD : benzodiazépine	Mb : mégabase
CAE : épilepsie absence de l'enfant	MEG : magnétoencéphalographie
CNFB : convulsions néonatales familiales bénignes	mIPSC : courant post-synaptique miniature GABAergique
CNV : variation du nombre de copies	nAChR : récepteur nicotinique de l'acétylcholine
DZ : diazepam	NGS : séquençage de nouvelle génération
ECoG : électrocorticographie	NMD : <i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
EEG : électroencéphalogramme	OMS : Organisation mondiale de la Santé
ÉGG : épilepsies génétiques généralisées	PA : potentiel d'action
ER : réticulum endoplasmique	PTC : codon stop prématuré
ERAD : <i>endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation</i>	RGABA _A : récepteur GABA _A
GABA : acide γ -amino butyrique	SEEG : stéréoélectroencéphalographie
GAD : glutamate décarboxylase	SLI : stimulation lumineuse intermittente
GDP : potentiel dépolarisant géant ou <i>giant depolarizing potential</i>	SNC : système nerveux central
GERP : <i>The Genomic Evolutionary Rate Profiling</i>	S2D : Projet Synapse2Disease
GWAS : études d'association génomique	TSA : troubles du spectre autistique
IFC : réseau de circuits fluidiques intégrés	TSC : sclérose tubéreuse - <i>Tuberous Sclerosis Complex</i>
ILAE : Ligue Internationale contre l'Épilepsie	SABP : trouble schizo-affectif de type bipolaire
	SWD : pointes-ondes
	WGS : séquençage du génome entier
	WT : forme sauvage

À ma mère

Parce que quand on veut, on peut...

Remerciements

Une thèse s'écrit seul mais se construit en équipe. Je suis une femme qui aime travailler en groupe. De mon point de vue, pour naviguer avec succès dans l'univers de la science, il faut se regrouper en banc. Mon banc à moi a été composé de drôles de poissons!

En premier lieu, je tiens à remercier mes amis (Caro Ma, Caro Me et Max) avec qui j'ai partagé ma vie matin, midi et soir au cours de ces dernières années. Je n'ai peut-être pas eu de *Nature Genetics*, mais j'ai gagné l'amitié de trois individus formidables. Travailler ne sera plus jamais pareil sans vous. Vive les consanguins!

Un merci tout spécial à mon directeur, Patrick Cossette. Un premier merci pour m'avoir offert ce magnifique projet. Tu m'avais déjà convaincue, lorsqu'au cours de l'entrevue tu as comparé les généticiens à des chasseurs! Un deuxième pour ta confiance (en toi, en nous). Et enfin, un dernier pour m'avoir donné les moyens de nos ambitions. L'argent ça ne change pas le monde sauf que...

L'écosystème d'un centre de recherche est bien spécial. Je veux remercier tous mes collègues qui ont rendu cet univers si riche. On s'attache à *ces petites bêtes là* (Alexandre, Anaïs, Bouchra, les Dan, Édouard, Hélène, Lamia, Loubna, Martine, Marylise, Maude, Nathalie, Ousmane, Patrick D., Pascale, Simon, Simonne, et bien d'autres)!

Pour évoluer, une espèce doit s'adapter à son environnement. La compétitivité présente dans notre milieu de recherche nous a poussé à établir de fructueuses collaborations avec des équipes formidables. Derek, Patricia, Graziella et Mayukh : vous avez été essentiels au succès de ce projet multidisciplinaire. La passion qui vous habite m'a donné la force de sortir de ma zone de confort, de m'intégrer à votre milieu et d'ainsi grandement rehausser la qualité de ce projet.

Un dernier et précieux merci à ma famille. Chacun des membres des Bédard-Barrette-Lachance-Touchette ont joué un rôle de près ou de loin dans la réalisation de cette thèse. Lise, Gilles, Jeannine et Jacques : Merci d'avoir gardé mon petit homme tout au long de cette rédaction. Sans vous, je n'aurais pas eu la force de finir. Ginette, Richard, Gaby, Lolo et Clau, merci de m'avoir permis de faire du sport afin de m'aérer les neurones! Maman, merci de

t'être battue pour mon éducation, à grands coups de « *je le veux* ». David, mon homme, le mâle de ma vie, celui qui a porté sur ses épaules le fardeau financier et émotif de ce doctorat, merci d'être mon homme fort du Québec. Je t'aime!

Pamela

1. Introduction

L'épilepsie est une condition neurologique commune affectant des individus de tout âge. Cette maladie est connue de l'humanité depuis des lustres, en effet, dès l'Antiquité les crises épileptiques ont été décrites dans la littérature ayurvédique et grecque. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) estime que le nombre de sujets épileptiques à travers le monde est d'environ 50 millions¹. L'épilepsie frappe sans distinction l'ensemble des groupes ethniques, des régions géographiques et des strates sociales. Elle touche aussi bien les hommes que les femmes et ce peu importe l'âge. Selon Épilepsie Canada, l'épilepsie est une des maladies neurologiques handicapante les plus répandues au Canada, avec près de 300 000 canadiens et canadiennes aux prises avec cette dernière au quotidien². L'épilepsie a suscité pendant des siècles la crainte et l'incompréhension. Encore aujourd'hui, les personnes atteintes et leurs familles peuvent faire face à la discrimination et subir la stigmatisation sociale. Les conséquences médicales, professionnelles, sociales, culturelles et économiques qu'entraînent l'épilepsie en font un problème de santé publique majeur (besoins en terme de soins de santé, décès prématurés, perte de productivité, troubles psychosociaux, etc.). La Banque Mondiale a publié en 1993 un rapport indiquant que l'épilepsie représentait en moyenne 0,7% de la charge de morbidité¹ dans le monde³. Cette maladie chronique est par ailleurs responsable d'environ 115 000 décès par année, tous groupes démographiques confondus³. Au total, les personnes atteintes d'épilepsie ont un taux de mortalité de 1,6 à 11,4 fois plus élevé que la population en général⁴. Bien que les répercussions sociales varient d'un pays à l'autre, en moyenne 30% des personnes atteintes d'épilepsie auront des troubles dépressifs à un moment ou l'autre de leur vie⁵. L'épilepsie est également une maladie coûteuse : en 1993, une étude réalisée au Royaume-Uni a estimé le coût direct de la maladie à 1,96 milliards de dollars US, ce qui représente 2.5% du budget total en santé de ce pays⁶. En 1994, les États-Unis ont pour leur part dépensé 4,224 milliards de dollars US en soins de santé directement reliés à l'épilepsie⁷. Dans ce contexte, les études génétiques sont indispensables pour déterminer la contribution des facteurs génétiques dans l'apparition des manifestations

¹ Une mesure basée sur le temps et combinant les années de vie perdues à cause de la mortalité prématurée et le temps vécu dans un état de santé qui n'est pas optimal.

épileptiques. La découverte de gènes prédisposant à l'épilepsie est une stratégie prometteuse pour identifier les mécanismes pathogéniques de la maladie, et ainsi permettre le développement de traitements plus efficaces. Cependant, les progrès actuels dans l'identification des gènes de prédisposition à l'épilepsie ont été largement limités à l'étude des formes familiales rares de la maladie. Les gènes impliqués dans les formes les plus communes d'épilepsie, où l'influence génétique est complexe, n'en est qu'à ses premiers balbutiements.

1.1 Épilepsie génétique généralisée: présentation clinique

Dans le but de bien couvrir le sujet principal du présent ouvrage traitant de l'étiologie génétique de l'épilepsie génétique généralisée, une courte présentation clinique de la maladie s'avère nécessaire. La Ligue Internationale contre l'Épilepsie (ILAE) définit actuellement la crise épileptique comme étant : « une présence transitoire de signes et/ou symptômes dus à une activité neuronales excessive ou synchrone anormale dans le cerveau »⁸. L'ILAE définit l'épilepsie comme étant : « un trouble cérébral caractérisé par une prédisposition durable à générer des crises épileptiques et par les conséquences neurobiologiques, cognitives, psychologiques et sociales de cette affection. La définition de l'épilepsie requiert la survenue d'au moins une crise épileptique »⁸. L'ILAE présente l'épilepsie comme étant : « une maladie cérébrale définie par l'une des conditions suivantes »:

1. Au moins deux crises non provoquées (ou réflexes) survenant à plus de 24 heures d'intervalle.
2. Une crise non provoquée (ou réflexes) si la probabilité d'une autre crise au cours des 10 années suivantes est similaire au risque général de récurrence après deux crises non provoquées (au moins 60%).
3. Diagnostic d'un syndrome épileptique.

Bien qu'il existe des définitions alternatives de l'épilepsie⁹⁻¹¹, ce sera la définition retenue dans l'ensemble de nos travaux.

1.1.1 Révision de la terminologie et des concepts des épilepsies

En 2009, une réflexion a été amorcée au sein de la Commission de Classification et de Terminologie, car la dernière classification proposée de la ILAE datait de 1989. En 2010, la communauté scientifique a procédé à une réorganisation des termes utilisés dans le domaine de la recherche en épilepsie¹². Cette nouvelle classification pose en fait les bases d'un reclassement des entités existantes, permettant d'intégrer les nouvelles connaissances portant sur les mécanismes pathophysiologiques, pharmacologiques et pathogéniques impliqués. Cette nouvelle classification, présentée dans le tableau 1.1.1, est le reflet des connaissances actuelles.

Tableau 1.1.1. Proposition de la ILAE pour une révision de la terminologie et de l'organisation des crises et des épilepsies

<p>Syndromes électro-clinique classés par âge de début des crises</p> <ul style="list-style-type: none"> • Période néonatale (<44 semaines gestationnelles) <ul style="list-style-type: none"> • Épilepsie néonatale familiale bénigne (BFNE) • Encéphalopathie myoclonique précoce (EME) • Syndrome d'Ohtahara • Nourrisson (<1 an) <ul style="list-style-type: none"> • Épilepsie du nourrisson à crises focales migrantes • Syndrome de West • Épilepsie myoclonique infantile (MEI) • Épilepsie bénigne du nourrisson • Syndrome de Dravet • Encéphalopathie myoclonique dans une maladies non progressives • Enfant (1-12 ans) <ul style="list-style-type: none"> • Convulsions fébriles plus (FS+) (peu débuter avant 1 an) • Syndrome de Panayiotopoulos • Épilepsie à crises myoclonono atoniques • Épilepsie bénigne avec pointes centrotemporales (BECTS) • Épilepsie autosomique dominante à crises frontales nocturnes (ADNFLE) • Épilepsie à crises occipitales de début tardif (type Gastaut) • Épilepsie avec absences myocloniques • Syndrome de Lennox-Gastaut • Encéphalopathie épileptique avec pointe-ondes continues au cours du sommeil (CSWS) • Syndrome de Landau-Kleffner (LKS) • Épilepsie-absence de l'enfant (CAE) • Adolescence (12-18 ans) et Adulte (>18 ans) <ul style="list-style-type: none"> • Épilepsie-absences de l'adolescent (JAE) • Épilepsie myoclonique juvénile (JME) • Épilepsie à crises généralisées tonico-cloniques prédominantes • Épilepsie myoclonique progressive (PME) • Épilepsie autosomique dominante avec crises à symptomatologie auditive (ADEAF) • Autres formes d'épilepsie temporale familiale • Épilepsies dont l'âge de début est moins spécifique <ul style="list-style-type: none"> • Épilepsie focale familiale à foyer variable (enfant et adulte) • Épilepsies réflexes
<p>Constellations</p> <ul style="list-style-type: none"> • Épilepsie temporale méssiale avec sclérose hippocampique (MTLE with HS) • Syndrome de Rasmussen • Épilepsie à crises gélastiques et hamartome hypothalamique • Hémiconvulsion-hémiplégie-épilepsie • Épilepsies qui ne peuvent pas être classées dans une des catégories sus-citées et qui ne peuvent être reconnues par la présence ou l'absence d'une anomalie structurelle ou métabolique (préssumé causale) et sur la base du mode de début de la crise (généralisées vs focales)
<p>Épilepsies en relation avec une anomalie structurale-métabolique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Malformations du développement cortical (hémimégalencéphalie, hétérotopies, etc) • Syndromes neurocutanés (sclérose tubéreuse complexe, Sturge-Weber, etc) • Tumeur • Infection • Traumatisme
<p>Angiome</p> <ul style="list-style-type: none"> • Souffrance périnatale • Accident vasculaire • Etc
<p>Épilepsies de causes inconnues</p>
<p>Conditions associées à des crises épileptiques et qui ne sont pas diagnostiquées comme une forme d'épilepsie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Crises néonatales bénignes (BNS) • Crises fébriles (FS)

*Modifié de Berg *et al.*, 2010

Cette nouvelle classification n'est plus basée sur les causes étiologiques supposées mais sur les âges d'apparition. L'objectif d'une telle démarche est de permettre l'intégration dans le futur de nouvelles modifications. Elles sont fondées sur une meilleure connaissance des mécanismes responsables de l'apparition des crises et appuyées par des arguments scientifiques: génétiques, physiopathologiques, de réponse ou de résistance aux traitements médicamenteux.

Nous n'aborderons ici que les termes et concepts utiles à l'appréciation de cette thèse. La révision de la nouvelle nomenclature et la classification des crises ne seront donc pas entièrement traitées. Les termes utilisés dans le tableau 1.1.1 sont ceux qui sont redéfinis par la Ligue Internationale contre l'Épilepsie.

1.1.1.1 Crises épileptiques généralisées

Crises épileptiques généralisées : il a été précisé que ces crises originent d'une population de neurones et que la décharge implique rapidement des réseaux à distribution bilatérale. Il est maintenant bien compris que les crises généralisées ne concernent pas nécessairement l'ensemble du cerveau, mais plutôt des réseaux neuronaux¹². À l'électroencéphalogramme, le phénomène se traduit par des anomalies paroxystiques bilatérales synchrones. La perte de conscience demeure l'expression clinique commune à tous les types de crises généralisées.

À présent, le concept de crises généralisées ou focales ne s'applique plus à la classification des syndromes électrocliniques. Il est destiné à séparer les manifestations cliniques de la pathologie sous-jacente qui les a produites. Les syndromes électrocliniques actuellement reconnus sont présentés dans le tableau 1.1.1. Le tableau 1.1.1.1 présente quant à lui les différents types de crises généralisées qui constituent les syndromes à l'étude dans cette thèse. À noter que les termes épilepsie et syndrome sont utilisés comme des équivalences depuis le

rapport de 1989 de la Commission (*Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1989)*).

Tableau 1.1.1.1. Classification des crises généralisées

Tonico-cloniques (quelle que soit la combinaison)
Absences <ul style="list-style-type: none">• Typiques• Atypiques• Absences avec caractéristique particulière<ul style="list-style-type: none">• Absences Myocloniques• Absences avec Myoclonies Palpébrales
Myocloniques <ul style="list-style-type: none">• Myocloniques• Myoclonos atoniques• Myoclonos toniques
Cloniques
Toniques
Atoniques

*Modifié de Berg *et al.*, 2010

1.1.1.2 Idiopathique vs génétique

Avant 2010, le mot « idiopathique » était utilisé pour nommer un groupe d'épilepsie dont la cause ne pouvait être identifiée. Plusieurs auteurs tels que Wong *et al.*, 2010 ainsi que Berg *et al.*, 2010 ont vivement questionné l'usage de ce terme. Avec raison puisque « idios » signifie, en grecque ancien, à part, à l'écart, en particulier, ce qui signifie à tort que cette pathologie est isolée et sans cause ou maladies associées. Les vingt dernières années de recherche nous ont révélé que des facteurs génétiques jouaient un rôle de premier ordre dans cette maladie. Plusieurs gènes impliqués dans des formes familiales d'ÉGG ont été identifiés.

En ce qui a trait à l'étiologie, les termes idiopathiques, cryptogéniques et symptomatiques ont été remplacés par des termes plus significatifs tels que génétiques, métaboliques-structurels et inconnus. Le concept d'épilepsie génétique exprime tout simplement le fait que les crises sont le résultat principal de mutations génétiques identifiées ou présumées chez le porteur. Il y a ici une intention de la ILAE d'établir un lien génotype-phénotype à même cette nouvelle réorganisation étiologique. Bien sûr, ce changement crée quelques zones grises où l'évidence génétique est déduite d'études familiales et reste encore à être identifiée. À l'opposé, un test diagnostique du gène *SCN1A* est maintenant disponible vu le rôle central que ce gène joue dans le syndrome de Dravet. L'utilisation du terme génétique n'exclut pas une possible contribution de facteurs environnementaux dans l'expression de la maladie¹².

1.1.3 Diagnostic

Le diagnostic d'épilepsie repose majoritairement sur l'examen clinique avec les données électroencéphalographiques et d'imagerie ainsi que sur l'interrogatoire du patient et/ou de sa famille. En effet, associée aux données cliniques, la réalisation d'un électroencéphalogramme (EEG) demeure un outil diagnostique de premier ordre. L'EEG enregistre l'activité électrique cérébrale sur une période de temps déterminée (de l'ordre de la milliseconde). Cet outil contribue à localiser les différentes structures cérébrales impliquées et à fournir une évaluation de l'étendue de la propagation d'une crise. D'autres méthodes d'exploration cérébrale telles que la magnétoencéphalographie (MEG), l'EEG invasive (la stéréoélectroencéphalographie (SEEG) et l'électrocorticographie (ECoG)) ainsi que les méthodes d'imagerie sont également utilisées.

1.1.3 Traitements et contrôle de l'épilepsie

Actuellement, le traitement de l'épilepsie ne vise pas la cause de la maladie. Ce dernier est plutôt dirigé contre les symptômes, soient les crises épileptiques, qui peuvent être convulsives ou non-convulsives. Il y a actuellement de nombreux antiépileptiques (environ 20) disponibles utilisés en monothérapie ou en association. Les premiers antiépileptiques ont été identifiés autour des années 1920. Le traitement prescrit ainsi que sa posologie sont

régulièrement réévalués en vue d'atteindre un contrôle complet des crises, ou à tout le moins, de diminuer leurs fréquences avec un minimum d'effets indésirables.

Cependant, jusqu'à 30% des individus épileptiques continuent à présenter des crises incontrôlables malgré un traitement pharmacologique. L'épilepsie réfractaire est associée à une morbidité et à une mortalité significative. Au niveau mondial, les coûts associés à l'épilepsie sont supérieurs à 23 milliards de dollars canadiens par année, ce qui équivaut au fardeau financier du cancer du poumon chez l'homme et du sein chez la femme^{13,14}. Il n'existe pas de traitement préventif de la maladie. De plus, parmi les individus qui répondent au traitement (70%), une proportion significative présente des effets secondaires indésirables qui sont incapacitants et parfois même dangereux¹⁵. La raison de cette variabilité dans la réponse aux antiépileptiques n'est pas connue. Pour les patients dit pharmacorésistants, des traitements antiépileptiques de dernière génération tels que le gabapentine, le levetiracetam, le pregabalin et le zonisamide ont été commercialisés entre 1986 et 2005. Ils peuvent être utilisés en complément des traitements antiépileptiques traditionnels¹⁶.

Le traitement chirurgical peut être envisagé chez certains individus. Il n'est réservé qu'aux patients présentant des épilepsies réfractaires. Ces sujets épileptiques ont pour la plupart testé plusieurs traitements antiépileptiques sans succès. Cette intervention consiste à supprimer ou à isoler la zone responsable du déclenchement des crises (zone épileptogène). Une étude rétroactive de 26 ans de suivi médical révèle toutefois que même si la chirurgie n'est pas l'option privilégiée dans la pratique médicale actuelle, elle permet de supprimer les crises chez près de 50% des patients épileptiques et elle parvient à améliorer la qualité de vie pour 80% des épilepsies réfractaires¹⁷. D'autres approches peuvent être utilisées afin de mieux maîtriser les crises, dont notamment la diète cétoène, la stimulation du nerf vague par un implant, de même que la callosotomie.

1.1.4 Épidémiologie

À l'échelle mondiale plus de 50 millions d'individus souffrent d'épilepsie¹⁸. La prévalence est un outil de mesure tenant compte de la sévérité ainsi que de la chronicité de la

maladie dans une population. Elle comptabilise à la fois les nouveaux cas et ceux diagnostiqués antérieurement. Elle est définie par le nombre de sujets atteints dans une population à un moment donné. En Amérique du Nord, les données suggèrent une prévalence de 5-10/1000¹⁹. La prévalence globale de la population canadienne de ce trouble neurologique est estimée à 0,6%¹⁹.

L'incidence mesure la fréquence d'apparition d'une maladie dans une population et est déterminée par le nombre de nouveaux cas d'épilepsie apparaissant dans une population pour une période de temps. À l'échelle mondiale, l'incidence de l'épilepsie ajustée selon l'âge se situe entre 16 et 51 /100 000 personnes /années selon la population à l'étude²⁰. Il n'y a pas de consensus quant à la variation de l'incidence en fonction du sexe. Certaines études rapportent une incidence significativement plus élevée chez les hommes que chez les femmes^{21,22} tandis que d'autres dénotent une absence de différence entre les sexes²³⁻²⁵. Le taux d'incidence spécifique de la première crise non-provoquée oscille entre 56,8 et 77 atteints par 100 000 habitants par an dans la première année de vie^{21,22,24}. Au Canada, l'incidence est estimée entre 15 et 500 nouveaux cas par année²⁶. Le taux d'incidence est plus élevé chez les groupes d'âge 0-1 ans et ≥ 75 ans. Plusieurs facteurs étiologiques fortement liés à l'âge tels que les événements périnataux, les maladies infectieuses, les processus neurodégénératifs ou les événements vasculaires cérébraux peuvent expliquer les taux plus élevés apparaissant dans ces tranches d'âge²⁷.

1.2 Étiologie

1.2.1 Introduction

L'hypothèse génétique de l'épilepsie n'est plus contestée. Les études épidémiologiques portant sur des paires de jumeaux monozygotes et dizygotes ainsi que sur de grandes familles d'épileptiques ont démontré à maintes reprises sa composante héréditaire. Ces observations ont permis d'établir des assises solides pour les études génétiques subséquentes, en illustrant hors de tout doute l'apport important de la composante héréditaire reliée au développement de la maladie. Ces résultats nous permettent également de conclure que l'environnement est appelé à jouer un rôle dans l'architecture de la maladie. Distinguer l'apport des composantes génétiques et environnementales est crucial afin de comprendre la pathogénèse des épilepsies.

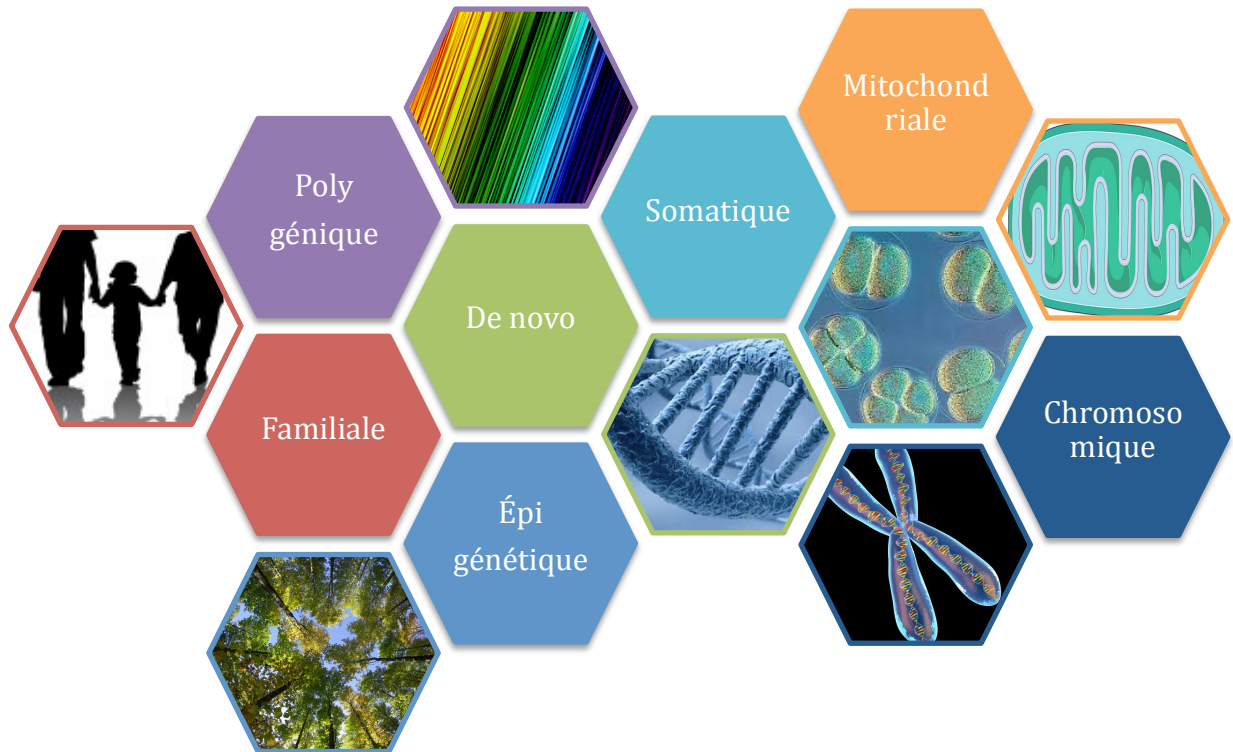
Parmi les syndromes épileptiques, les épilepsies génétiques généralisées (ÉGG) sont celles qui possèdent la plus grande composante héréditaire et comptent pour environ 40% des épilepsies. L'ensemble des études d'agrégations familiales et de jumeaux réalisées, a permis d'identifier une augmentation majeure de la concordance entre les jumeaux monozygotes comparés aux jumeaux dizygotes²⁸⁻³¹.

Chez les jumeaux identiques avec ÉGG, le niveau de concordance est de 94%, ce qui suggère une étiologie génétique presque complète pour ce syndrome^{32,33}. Pour la majorité des ÉGGs, il n'est pas toujours possible d'identifier un mode défini de transmission et l'expression de la maladie (souvent très variable intra et interfamiliale) est influencée par une multitude de facteurs environnementaux. Le risque relatif d'être atteint pour un membre de la famille d'une personne souffrant d'ÉGG (λ_R), est pratiquement de 100 pour des jumeaux monozygotes (λ_M), mais de seulement 7.5 pour des frères/sœurs (λ_S), et de 1.5 pour des neveux/nièces (λ_N)^{32,34-36}. Une telle diminution du λ_R pour chacun des degrés de parenté suggère une interaction multiplicative (épistasique) de plusieurs loci, contribuant à la prédisposition génétique générale aux crises^{33,37}. Toutefois, notre groupe ainsi que d'autres équipes, ont identifié de grandes familles d'épilepsie génétique (focale et généralisée), où le mode de transmission était

compatible avec des traits monogéniques³⁸⁻⁴¹. À la fin des années 90, l'équipe de Dr Berkovic a relevé une concordance plus élevée pour les épilepsies de types idiopathiques et symptomatiques que pour les épilepsies partielles. La fréquence élevée des monozygotes concordants avec le même syndrome majeur suggère qu'il existe des déterminants génétiques « syndromes-spécifiques »^{32,34}. De façon générale, ces observations cliniques indiquent que certaines familles sont clairement monogéniques, tandis que pour d'autres elles reflètent une combinaison d'agents génétiques à l'intérieur desquels une transmission polygénique est plus probable⁴².

Notre connaissance de l'architecture génétique des épilepsies s'enrichie au fil des nouvelles découvertes. Nous verrons dans les prochaines sections les diverses méthodes utilisées afin d'arriver à cette mosaïque. Avec l'avènement du séquençage de nouvelle génération (NGS), il est devenu difficile de présenter un tableau dénombrant l'intégralité des gènes prédisposant à l'épilepsie chez l'humain. Afin de bien servir les objectifs de cette thèse, nous discuterons principalement de quelques gènes ayant eu un fort impact sur l'étiologie génétique de l'ÉGG. Notons toutefois qu'il reste encore beaucoup à faire dans ce domaine et que certaines avenues doivent toujours être explorées. À ce jour, une infime quantité de travaux ont exploré le rôle des mutations somatiques ou mitochondriales ainsi que le rôle de l'épigénétique dans l'expression du phénotype épileptique.

Figure 1.2.1. L'architecture génétique des épilepsies



1.2.2 Les études de liaisons

Avant la venue des études d'association pangénomique (GWAS) et du séquençage à haut débit (NGS), différentes stratégies pouvaient être utilisées pour localiser et identifier les gènes prédisposant à des phénotypes complexes chez l'homme (ex : des analyses de liaisons paramétriques, des analyses de liaisons non-paramétriques ou des études d'association génétique). Les études de liaisons s'appliquent bien à des maladies à profil monogénique. Ces phénotypes sont transmis selon un modèle d'hérédité mendélien (récessif ou dominant par exemple). Ces analyses génétiques s'appuient sur la co-ségrégation de blocs de recombinaison (haplotypes) avec un trait génétique (maladie) au sein d'une famille. En d'autres mots, on évalue l'hypothèse d'une liaison génétique entre un gène causal et les marqueurs étudiés en identifiant les haplotypes spécifiques aux membres atteints d'une famille. Pour ces études, on utilise une carte génétique de référence où les distances sont exprimées en centimorgan (cM). Cette unité de mesure reflète la fréquence de recombinaison, de même que la probabilité

d'occurrence en pourcentage que deux marqueurs génétiques soient séparés par un enjambement (*crossing-over*) (1cM=1% de recombinaison). L'échange de matériel génétique a lieu lors de la méiose et provoque la fragmentation du génome en blocs de recombinaisons de tailles variables. Le projet HapMap, débuté en 2002, visait à identifier le maximum de SNPs dans le génome humain et à établir leurs cartes de répartition dans quatre différentes populations⁴³. Les données de ce projet ont permis de cartographier la diversité génétique de l'espèce humaine. Ils ont également identifié des « tagSNPs », un sous-ensemble de marqueurs en déséquilibre de liaison avec tous les autres le long d'un chromosome. Ces derniers s'avèrent donc les plus représentatifs de l'information génétique de l'ensemble, ce qui a permis d'utiliser un nombre minimal et optimal de polymorphimes à simple nucléotide (SNPs pour *Single Nucleotide Polymorphisms*) lors de nos analyses de liaisons subséquentes.

Grâce aux efforts considérables réalisés au début du 21^e siècle, la recherche portant sur des variations génétiques communes prédisposant aux différents syndromes épileptiques a permis l'identification de plusieurs loci potentiels qui pourraient avoir un effet mineur sur le phénotype de l'épilepsie⁴⁴⁻⁴⁷. En effet, plusieurs études de liaison ont associé la région du bras court du chromosome 6p21 (incluant le système HLA) à l'épilepsie génétique généralisée dans des familles avec multiples atteints⁴⁸⁻⁵⁰. Les loci 7q32 et 16p13 ont été associés à une susceptibilité à la photosensibilité, un trait souvent retrouvé chez les patients ÉGG⁴⁴. De plus, plusieurs autres loci prédisposant aux ÉGGs ont été identifiés dans des études de liaison à l'échelle génomique sur les segments chromosomiques 6p11⁵¹, 8p12⁵², 8q24⁵³ et 15q14⁵⁴. Le succès de la plupart des travaux s'est avéré mitigé, car seulement une faible proportion de ces découvertes a été répliquée dans des études indépendantes^{55,56}. Il n'en demeure pas moins que la majorité des gènes présentés ultérieurement dans le tableau 1.2.6 découle du reséquençage des régions candidates identifiées par ces études de liaison.

Tableau 1.2.2. Études de liaison sur des cohortes de familles épileptiques

Auteurs	Année	Phénotypes	Locus	Transmissions	Familles
Greenberg D.A. <i>et al.</i>	1988	JME	6p21	AR, AD	24
Weissbecker <i>et al.</i>	1991	JME	6p	AD	23
Durner <i>et al.</i>	1991	JME	6p	AD	21
Lewis <i>et al.</i>	1993	BFNC	8q24	AD	1
Liu A. W. <i>et al.</i>	1995	JME	6p21.2-p11	AD	8
Zara <i>et al.</i>	1995	GGE	8q24	AD	10
Philips <i>et al.</i>	1995	ADNFLE	20q13	AD	1
Wallace <i>et al.</i>	1996	FS	8q13-21	AD	1
Elmslie F.V. <i>et al.</i>	1997	JME	15q14	AD	34
Fong G.C. <i>et al.</i>	1998	CAE	8q24	AD	6
Wallace <i>et al.</i>	1998	GEFS+	19q13.1	AD	1
Durner <i>et al.</i>	1999	GGE	8p12	AD	88
Baulac <i>et al.</i>	1999	GEFS+	2q21-q33	AD	1
Moulard <i>et al.</i>	1999	GEFS+	2q24-q33	AD	1
Pieffer <i>et al.</i>	1999	FS	2q23-24	AD	1
Sander T. <i>et al.</i>	2000	GGE	3q26	AD	130
Sander T. <i>et al.</i>	2000	GGE	14q23	AD	130
Zara F. <i>et al.</i>	2000	GGE	16p13	AR	1
Durner <i>et al.</i>	2001	GGE	18q12	AR	91
Wallace R.H. <i>et al.</i>	2001	CAE/FS	5q31.1-q33.1	AD	1
Cossette P. <i>et al.</i>	2002	JME	5q34-q35	AD	1
Bai <i>et al.</i>	2002	JME	6p12-p11	AD	31
Baykan B. <i>et al.</i>	2004	GGE	9q32-33	AR	1
Mantegazza <i>et al.</i>	2005	FS	2q24	AD	1
Tauer U. <i>et al.</i>	2005	PPR	6p21.1	AR	19
Tauer U. <i>et al.</i>	2005	GGE	13q31.3	AR	25
Puranam R.S. <i>et al.</i>	2005	GGE	10q25-q26	AD	11
Pinto D. <i>et al.</i>	2005	PPR	7q32	AD	16
Pinto D. <i>et al.</i>	2005	PPR	16p13	AD	16
Kapoor A. <i>et al.</i>	2007	JME	5q12-q14	AD	1
Tanaka M. <i>et al.</i>	2008	CAE	15q11-q12	AD	48
Cossette P. <i>et al.</i>	2008	GGE	10p11	AD	28
Kapoor A. <i>et al.</i>	2008	GGE	3q13.3-q21	AD	1

Abbreviations: AD, autosomique dominant; AR, autosomique récessif; BFNC, convulsions néonatales familiales bénignes; GGE, épilepsie génétique généralisée; CAE, épilepsie-absence de l'enfance; JME, épilepsie myoclonique juvénile; FS, convulsions fébriles; GEFS+,

épilepsie généralisée avec convulsions fébriles plus; PPR, photosensibilité ou réponse photoparoxysmal.

La recherche portant sur des variations génétiques rares ayant un impact plus grand sur le phénotype épileptique (incluant l'étude des épilepsies monogéniques) est la plus concluante à ce jour⁵⁷. À l'exception des troubles épileptiques récessifs rares et des syndromes liés à l'X, les analyses de ségrégation familiale, dont le but est d'estimer la contribution des facteurs génétiques au phénotype, ont rapporté que la majorité des épilepsies mendéliennes sont transmises de manière autosomique dominante (AD) avec une pénétrance réduite. Les études de liaisons classiques chez ce genre de familles épileptiques nécessitent généralement 10 individus et plus atteints d'un trait AD, ce qui les rend difficile à réaliser. Suite aux études de liaison, le séquençage des gènes localisés dans les régions chromosomiques liées a mené à la découverte d'un grand nombre de gènes causatifs (Tableau 1.2.6). Une de ces fructueuses études (Cossette et *al.*, 2002) est l'assise sur laquelle les hypothèses de cette thèse originent. Comme approche alternative, plusieurs groupes de recherche ont travaillé en combinant de plus petites familles (environ 3 atteints et plus)^{42,58,59}.

Malgré le fait que les formes monogéniques d'épilepsie sont rares dans la population, les études génétiques portant sur ces familles ont permis d'identifier plus d'une trentaine de gènes prédisposant à l'épilepsie chez l'humain. Ces travaux ont mis en lumière les premiers mécanismes moléculaires impliqués dans l'ÉGG (Tableau 1.2.6). Suite à la publication du locus sur le chromosome 20q13.2-q13.3 lié à l'épilepsie autosomique dominante à crises frontales nocturnes (ADNFLE), la première mutation pathogénique a été rapportée en 1995 dans le gène *CHRNA4*, codant pour la sous-unité $\alpha 4$ du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR) chez une famille diagnostiquée ADFNLE⁶⁰⁻⁶². Une méthodologie similaire a entraîné la localisation d'un locus pour des familles atteintes de convulsions néonatales familiales bénignes (CNFB) sur le chromosome 20 en position 20q13.2^{63,64}. Un 2^e locus pour CNFB a été découvert sur le chromosome 8q⁶⁵. En 1998, deux équipes indépendantes ont identifié, au locus 20q13.2, des mutations dans le gène *KCNQ2* liés aux CNFB^{66,67}. Dans la seconde région candidate 8q, un gène codant pour un autre canal potassique, *KCNQ3*, dans lequel des mutations coségrègent avec le même phénotype a été rapporté⁶⁸.

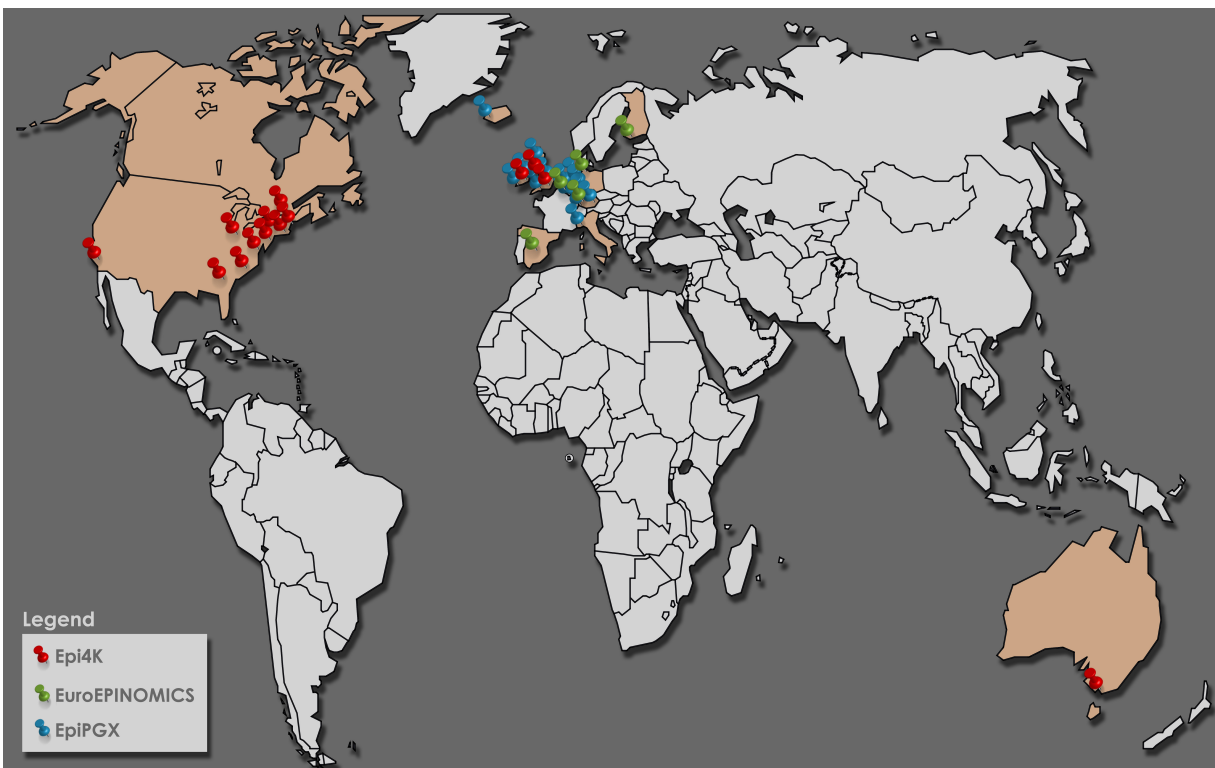
1.2.3 Les études d'association génomique (GWAS)

La principale différence entre les études de liaison et les études d'association réside dans les groupes à comparer. Dans une étude de liaison, les génotypes sont comparés entre les membres d'une même famille alors que dans les études d'association, cette comparaison est obtenue à l'aide d'une population contrôle. Cette approche vise notamment à démontrer la présence en excès d'un allèle donné chez un groupe de patients comparativement à un groupe de témoins sélectionnés. On mesure donc ici la fréquence allélique entre les cohortes. À noter qu'une association positive entre un marqueur et un phénotype n'est pas garante de l'identification de la mutation causative. En effet, le variant causal n'est pas nécessairement le SNP identifié et peut se retrouver en déséquilibre de liaison avec celui-ci. Subséquemment, il faudra séquencer la région en déséquilibre de liaison avec le marqueur afin d'identifier la mutation causative. Cette approche est plus puissante pour les traits complexes où le risque relatif des effets génétiques est faible.

La première étude du genre dans le domaine de l'épilepsie a été publiée en 2010⁶⁹. Elle était basée sur l'analyse d'une cohorte de 3445 patients et 6935 contrôles caucasiens, incluant des épilepsies focales de types métabolique-structurel et inconnus (tumeurs, traumatismes crâniens et traumatismes). Les auteurs n'ont pas identifié d'association significative (seuil de signification établi à $p < 10^{-8}$). Quelques loci ont rejoint un seuil de signification intéressant avec des valeurs de $p < 10^{-6}$ – 10^{-7} . La deuxième étude a étudié 1087 patients et 3444 contrôles d'origine chinoise avec un phénotype d'épilepsie focal de causes métabolique-structurel et inconnu⁷⁰. Cette étude s'est soldée par l'établissement d'une association significative entre des marqueurs génétiques localisés dans le gène *CAMSAP1L1* et l'épilepsie. En 2012, les consortiums EPICURE et EMINet ont effectué un GWAS chez plus de 3000 patients ÉGG et près de 4000 contrôles européens (Figure 1.2.4). Cela a permis d'identifier 2 loci de susceptibilité à la maladie. En effet, des associations positives avec le SNP rs13026414 au locus 2p16.1 et avec le SNP rs72823592 au locus 7q21.32 ont été établies pour leur cohorte ÉGG. Dans un 2^e temps, une analyse portant sur des syndromes épileptiques spécifiques a démontré une association significative chez les patients atteints d'épilepsie avec absence au locus chromosomique 2q22.3 et au locus 1q43 chez les patients avec épilepsie myoclonique juvénile

(JME) ⁷¹. Les GWAS effectués sur des cohortes d'épileptiques se sont faits tardivement dans l'avènement des GWAS (2008-2009). Ce « retard » a peut-être joué à notre avantage, puisque ces travaux ont bénéficié de grands consortiums internationaux et n'ont majoritairement pas souffert d'un manque de puissance statistique. Ils ont démontré la nécessité d'utiliser des cohortes de cas-témoins importantes. Seule l'hétérogénéité phénotypique de certaines cohortes leur a été nuisible.

Figure 1.2.4. Réseaux de collaborations internationales de cliniciens, de bioinformaticiens et de biologistes visant à étudier la génétique des épilepsies présentement en cours



1.2.4 Les études de variations structurales

D'autres études se sont principalement concentrées sur de larges insertions, délétions ou duplications regroupées sous le terme « variations du nombre de copies » (CNVs). Elles sont habituellement de plus de 1000 nucléotides et peuvent s'étendre sur plusieurs mégabases (Mb) englobant de longs fragments chromosomiques. L'analyse des variations structurales a été fructueuse en épilepsie. Des CNVs communs tels que la microdélétion de 1,5Mb sur le chromosome 15q13.3, les délétions dans les gènes *AUTS2* et *CNTNAP2* ont été identifiées

dans divers spectrums de patients épileptiques⁷²⁻⁷⁴. Fait à noter, certains CNVs associés à l'épilepsie (microdélétions aux régions 15q11.2, 15q13.3, or 16p13.11) ont également été reliés à divers syndromes neurologiques comme le retard mental, l'autisme ou la schizophrénie^{72,75-78}. Finalement, d'autres études ont réussi à répliquer les résultats d'association précédemment obtenus^{79,80}. Dans le cas des encéphalopathies épileptiques, les CNVs *de novo* rares expliquent environ 8% des cas⁸¹. Jusqu'à présent, les variations structurelles représentent les facteurs de risques les plus communs associés à l'épilepsie.

1.2.5 Les études de reséquençage

1.2.5.1 Le séquençage par méthode de Sanger

L'approche par gènes candidats a grandement contribué au tableau présenté ci-dessous (Tableau 1.2.6). Certaines de ces études sont détaillées dans la section 1.2.6 et dans le chapitre 6. La plupart ont été réalisées à la suite des études de liaison décrites précédemment. Avant l'arrivée des nouvelles technologies de séquençage, c'était la technologie de séquençage la plus utilisée. Les gènes sont sélectionnés selon une liste de critères souvent subjectifs (catégorie, fonction, localisation, expression). Malgré le succès de cette méthode, il s'avère important de noter que les mutations dans ces gènes ne seraient responsables que d'une faible proportion des cas d'épilepsie. Par contre, la somme des mutations dans l'ensemble d'une catégorie de gènes pourrait expliquer un nombre significatif des cas familiaux d'ÉGG. C'est sur cette prémisse que se base le concept de canalopathie traité plus loin. Enfin, des variations dans le nombre de copies de régions génomiques (CNVs), soit des micro-délétions ou micro-duplications ont également été répliquées dans plusieurs cohortes par cette méthode^{72,74,79,80}.

Le succès le plus retentissant se retrouve dans les cohortes de patients atteints du syndrome de Dravet, car la base génétique de plus de 75% des cas est attribuable à des mutations dans *SCN1A*. Il est intéressant de noter que 90% des mutations du gène codant pour la sous-unité $\alpha 1$ du canal sodique sont *de novo*⁸².

1.2.5.2 Le séquençage à haut-débit

L'arrivée des nouvelles technologies de séquençage (NGS) sur la scène de la recherche en génétique a complètement modifié notre approche expérimentale. À titre comparatif, la puce d'hybridation génomique comparative (CHG array) est au karyotype ce que le séquençage à haut-débit est au séquençage Sanger. Il est désormais possible de séquencer un génome ou un exome entier pour un prix modeste (moins de 3000\$ US). Ces technologies ont nécessité le développement de plateformes d'analyse avec des capacités de stockage de données bioinformatiques importantes. Dans le domaine de la génétique des épilepsies, le consortium Epi4K fut le premier à présenter leur analyse sur des données d'exomes de 264 trios (proband et parents)⁸³. 329 mutations *de novo* ont été identifiées incluant des variants *de novo* dans des gènes déjà associés à l'épilepsie tels que *SCN1A*, *STXBPI*, *SCN2A*, *CDKL5*, *KCNT1* et *DCX*. Pour certains de ces gènes, particulièrement *SCN1A* et *SCN2A* qui ont été originalement associés au syndrome de Dravet, ils suggérèrent d'étendre leur spectre phénotype aux spasmes infantiles (IS) et au syndrome Lennox-Gastaut (LGS). Les mutations dans les gènes déjà associées à des encéphalopathies épileptiques (EE) expliquent environ 10% de leur cas. La majorité des mutations *de novo* a été retrouvée dans des gènes n'ayant pas été préalablement liés à l'épilepsie. Au total, les mutations retrouvées dans environ 15% des patients ont été considérées comme impliquées dans la maladie. Pour ce faire, le variant devait se retrouver soit dans un gène déjà associé aux encéphalopathies épileptiques, soit se retrouver plus fréquemment que prévu par le hasard ou soit se retrouver dans des gènes considérés « intolérants » (basé sur le score IRVS traité dans le chapitre 6). Un mois plus tard, deux publications ont conjointement mis en lumière le rôle de *GRIN2A* dans plusieurs syndromes épileptiques tels que l'épilepsie partielle idiopathique avec paroxysmes rolandiques, l'aphasie-épilepsie, les épilepsies de l'enfance et les encéphalopathies épileptiques avec troubles du langage. *GRIN2A* code pour la sous-unité NR2A du récepteur NMDA. En combinant le séquençage à haut-débit d'un panel de 265 gènes, le reséquençage direct par Sanger et l'hybridation génomique comparative à haute résolution, Lemke et al., 2013 ont détecté des mutations dans *GRIN2A* chez 27 individus de leur cohorte de 359 patients avec épilepsie focale idiopathique⁸⁴. Pour leur part, Lesca et al. ont démontré que près de 20% de leurs cas sporadiques ou familiaux avec des syndromes épileptiques rares de l'enfant (*syndrome* de

Landau-Kleffner, encéphalopathie épileptique avec pointes-ondes continues au cours du sommeil et épilepsie rolandique) ont des mutations dans ce même gène⁸⁵. Finalement, Carvill et al., ont criblé 65 gènes par séquençage haut débit chez 500 patients avec encéphalopathie épileptiques⁸⁶. Ils ont identifié des mutations « pathogéniques » chez 10% de leur cohorte. Des mutations de novo dans *CHD2* and *SYNGAP1* expliquent respectivement 1,2% et 1% de leurs cas. D'autres variants dans des gènes déjà associés à l'épilepsie tel *SCN1A*, *SCN2A* et *SCN8A* ont également été répertoriés. Sommairement, ces études illustrent le rôle des mutations *de novo* ainsi que la grande hétérogénéité génétique des EEs.

Malgré ces récents progrès, établir un diagnostic génétique chez un patient peut être difficile car nous devons considérer à la fois l'hétérogénéité génétique et la pénétrance incomplète d'un syndrome épileptique, ainsi que l'hétérogénéité phénotypique d'un gène donné.

1.2.6 Canalopathie et autres évidences génétiques

Tableau 1.2.6. Liste des gènes de prédisposition à aux épilepsies génétiques chez l'Humain

Gènes	Protéines produites	Syndromes épileptiques
<i>Canaux ioniques dépendants du voltage</i>		
Canaux sodiques		
<i>SCN1A</i>	Nav1.1	GEFS+, épilepsie partielle avec FS
<i>SCN1B</i>	sous-unité β 1	GEFS+
<i>SCN2A</i>	Nav1.2	BFNIS
Canaux potassiques		
<i>KCNQ2</i>	Kv7.2	BFNS
<i>KCNQ3</i>	Kv7.3	BFNS
<i>KCNA1</i>	Kv1.1	Épilepsie focale et ataxie épisodique
<i>KCNMA1</i>	KCa1.1	GE et dyskinésie paroxystique
Canaux calciques		
<i>CACNA1A</i>	Cav2.1	AE et ataxie épisodique
<i>CACNA1H</i>	Cav3.2	CAE
		GGE
<i>CACNB4</i>	sous-unité β 4	JME
		GGE
Canaux chlores		
<i>CLCN2</i>	CLC-2	GGE
<i>Canaux ioniques dépendants du ligand</i>		
Récepteur nicotinique de l'acétylcholine		
<i>CHRNA2</i>	sous-unité α 2	ADNFLE
<i>CHRNA4</i>	sous-unité α 4	ADNFLE
<i>CHRN2</i>	sous-unité β 2	ADNFLE
Récepteurs GABA _A		
<i>GABRA1</i>	sous-unité α 1	JME
		CAE
		AE, FS, GGE
<i>GABRG2</i>	sous-unité γ 2	GEFS+
		CAE avec FS
<i>GABRB3</i>	sous-unité β 3	CAE avec FS
<i>GABRD</i>	sous-unité δ	GEFS+
<i>D'autres gènes associées</i>		
<i>ATP1A2</i>	ATPase Sodium-potassium	Épilepsie/Migraine familiale hémiplegique
<i>EFHC1</i>	Protéine à motif en main EF	JME
<i>SLC2A1</i>	GLUT1	Épilepsie d'absence précoce
		Épilepsie/Dyskinésie induite par l'exercice

Abbréviations: BFNIS, Épilepsie néonatale familiale bénigne; ADNFLE, Épilepsie autosomique dominante à crises frontales nocturnes; FS, Convulsions fébriles; GGE, Épilepsie génétique généralisée; CAE, Épilepsie-absence de l'enfance; AE, Épilepsie-absence; JME, Épilepsie myoclonique juvénile; GEFS+, épilepsie généralisée avec convulsions fébriles plus (Modifié de Cossette et *al.*, 2012).

Le terme canalopathie est apparu en épilepsie suite à la découverte de mutations dans des gènes codant pour des sous-unités des canaux ioniques membranaires dans plusieurs syndromes épileptiques⁴⁵. Aujourd'hui, plusieurs gènes impliqués dans les syndromes d'ÉGG tels que *SCN1A*, *CHRN2*, *GABRG2*, *KCNQ2*, *HCN1*, *CHRNA4* et *CACNAIH* ont renforcé le concept de canalopathies⁸⁷. Avant la découverte de la majorité de ces gènes, les investigations menées sur des modèles animaux avaient préalablement pointé du doigt ces canaux comme étant des bons candidats impliqués dans l'hypersynchronie des réseaux neuronaux. À la suite de la découverte de mutations dans ces gènes, les études *in vitro* et *in vivo* subséquentes ont appuyé ce concept. Certains gènes tels que *SCN1A*, *KCNQ2* ou encore *GABRG2* sont de réels « success stories » en recherche sur l'épilepsie. Ils ont fait l'objet de nombreuses études en génétique, en fonctionnelles *in vitro* pour finir en fonctionnelles *in vivo*. Ces recherches fructueuses ont confirmé leur association avec l'épilepsie en passant du patient au laboratoire et du laboratoire au patient. (Voir exemple de *GABRG2* abordé plus en détails dans le chapitre 6 et Reid et *al.*, 2013⁸⁸).

Par contre, le concept des canalopathies ne doit pas être perçu comme un dogme unitariste. Bien que nous ayons concentré avec un certain succès nos efforts sur les gènes codants pour les récepteurs neuronaux, il serait simpliste de tenter d'expliquer l'hyperexcitabilité cérébrale en étudiant uniquement ces gènes. Par ailleurs, bien que les gènes « canalopathiques » *GABRA1*, *GABRD*, *CACNB4* et *CASR* soient responsables de l'épilepsie juvénile myoclonique, l'ouverture des champs d'investigation en 2004 a mené à la découverte de 5 mutations dans le gène *EFHC1* chez 6 familles atteintes d'épilepsie juvénile myoclonique (JME)⁸⁹. Cette découverte découle de l'identification du locus 6p12-11 (EJM1) précédemment associé à la maladie⁵¹. Le gène responsable *EFHC1* code pour une protéine nommée myoclonine 1 dont la fonction est encore le sujet de controverses. Certains suggèrent qu'en se

fixant sur des microtubules, *EFHC1* jouerait un rôle régulateur dans la division cellulaire et la migration des neurones corticaux au cours du développement précoce du cerveau^{90,91}. Les microdygénésies observées chez certains patients JME seraient ainsi liées à des troubles subtils du développement intracortical⁹². Les mutations retrouvées chez les patients JME seraient associées à ces altérations subtiles de l'architecture corticale. D'autres supposent cependant que *EFHC1* aurait un effet apoptotique et que son domaine de liaison au calcium interagirait avec les canaux calciques neuronaux, augmentant ainsi l'influx d'ion Ca^{2+} à travers *Cav2.3*⁸⁹. Qui plus est, les mutations perturberaient cette activité pro-apoptotique en altérant l'homéostasie du calcium, nuisant ainsi à l'élimination normale des neurones endommagés⁹³. Suite à la publication de Suzuki et al. en 2004, quatre autres groupes ont reséquéncé ce gène dans leur cohorte d'ÉGG familiale respective⁹⁴⁻⁹⁷. À ce jour, plus de 10 mutations sur *EFHC1* ont été retrouvées chez des patients atteints JME, JAE, ÉGG avec ou sans histoire familiale. Malgré quelques études infructueuses⁹⁸, *EFHC1* est considéré comme un gène de susceptibilité d'importance pour JME. En date d'aujourd'hui, une mutation faux-sense nommée S430Y a été rapportée dans *EFHC2* chez un patient JME⁹⁹. Ce gène, tout comme *EFHC1*, est principalement exprimé dans le système nerveux central et possède des fonctions similaires à son homologue.

1.3 Pathogénèse moléculaire

1.3.1 Structure et fonction du $RGABA_A$

Dans le système nerveux central, le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur qui active principalement deux classes de récepteurs : les récepteurs ionotropiques $GABA_A$ et $GABA_C$ ainsi que les récepteurs métabotropiques $GABA_B$ ^{100,101}. Les récepteurs $GABA_A$ et $GABA_C$ sont des canaux ioniques activés par un ligand. Ils sont perméables au chlore et aux anions bicarbonates. Les récepteurs $GABA_B$ sont couplés aux protéines G et sont localisés aux membranes pré- et post-synaptiques. $GABA_B$ est un récepteur métabotrope qui médie les réponses inhibitrices via la modulation de l'ouverture des canaux K^+ , grâce à des seconds messagers impliquant les protéines G. L'activation du récepteur $GABA_B$ présynaptique

diminue la relâche de neurotransmetteurs en bloquant l'entrée du Ca^{2+} , grâce à l'inhibition des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants¹⁰². Ce dernier peut avoir un effet inhibiteur ou excitateur selon le neurotransmetteur impliqué.

GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le cerveau de mammifère. Il est synthétisé à partir de l'acide glutamique par une enzyme appelée GAD (Glutamate décarboxylase). Ce neurotransmetteur est stocké dans des vésicules de la structure présynaptique. Il est libéré dans la fente synaptique par des mécanismes sous dépendance d'ions Ca^{2+} . Lorsqu'un potentiel d'action (PA) atteint le bouton synaptique, les canaux calciques sont activés, entraînant une variation intracellulaire en ions Ca^{2+} . L'entrée d'ions Ca^{2+} cause la fusion des vésicules du neurotransmetteur avec la membrane présynaptique, entraînant sa libération. La majorité de l'inhibition corticale du GABA est médiée par le récepteur GABA_A , situé dans la membrane post-synaptique du neurone. Dans le cerveau adulte, la concentration intracellulaire de chlore à l'intérieur de la majorité des neurones $[\text{Cl}^-]_i$ est inférieure à celle de l'espace extracellulaire $[\text{Cl}^-]_e$, due à l'activité des cotransporteurs K^+/Cl^- . Par conséquent, lorsque le GABA active les récepteurs GABA_A , leur canal s'ouvre et entraîne un afflux intracellulaire d'ions chlorures Cl^- , résultant en une hyperpolarisation et donc d'une diminution des probabilités d'atteindre le PA. Le type de réponse du RGABA_A est nommé *potentiel postsynaptique inhibiteur* et amènera la cellule à cet état d'hyperpolarisation. Le RGABA_A contient deux sites de liaison au GABA. Le récepteur GABA_A peut être modulé par une multitude d'agents tels que les benzodiazépines, les neurostéroïdes, les barbiturates et les anesthésiques. Ces substances actives se fixent sur des sites allostériques et modulent l'action du GABA en modifiant la fréquence ou la durée d'ouverture du pore central¹⁰³. La population de récepteurs GABA_A localisée principalement à la membrane synaptique (sous-unités α_1 , α_2 , α_3 ou α_5 avec β_x et γ_x) médie l'inhibition phasique du cerveau. Cette ouverture synchrone d'un regroupement de récepteurs ionotropiques post-synaptiques participe à l'activité rythmique du réseau neuronal. Cette activation résulte en une inhibition GABAergique rapide et est sensible à une modulation par des benzodiazépines¹⁰¹. À l'opposé, la population de récepteur GABA_A localisée dans la région extra et périssynaptique (sous-unités α_4 ou α_6 couplés avec les sous-unités β_x et δ) médie plutôt l'inhibition tonique¹⁰¹.

L'inhibition tonique est l'activation des récepteurs GABA_A extrasynaptiques par une petite concentration de GABA ambiant. Cette inhibition fait partie de l'activité paracrine et joue un rôle crucial dans la régulation de l'excitabilité neuronale. Ces récepteurs comprennent majoritairement la sous-unité δ et sont insensibles à la modulation des benzodiazepines¹⁰¹.

1.3.2 Distribution et diversité structurelle du RGABA_A

Le récepteur GABA_A est un hétéropentamère assemblé à partir de 8 classes de sous-unités ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , π , ε , θ and $\rho 1-3$)¹⁰⁴. Les sous-unités se regroupent en pentamère pour former un pore central qui constitue le canal ionique. La stœchiométrie optimale d'un récepteur fonctionnel est un ratio de 2:2:1 pour les sous-unités α , β et γ respectivement (Figure 1.3.2). La variabilité de composition des RGABA_A entraîne une grande hétérogénéité de ces récepteurs à travers les étapes du développement, les régions cérébrales, les types cellulaires et les localisations à la membrane¹⁰⁵. Par exemple, l'incorporation de la sous-unité ρ définit l'insensibilité à la bicuculline du récepteur GABA_C, tandis que le récepteur GABA_A est bloqué par cet antagoniste¹⁰³. Malgré le potentiel pour une grande variabilité de combinaisons, l'assemblage $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ est le plus abondant, il représente approximativement 60% de l'ensemble des récepteurs GABA_A du cerveau¹⁰⁴. Les combinaisons $\alpha 1\beta 2/3\gamma 2$, $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ et $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ sont également fortement présentes et forment la majorité des RGABA_A synaptiques dans le cortex et l'hippocampe¹⁰⁶. Les récepteurs contenant la δ se localisent sur des sites pérисynaptiques et extrasynaptiques¹⁰⁷. L'affinité de liaison du GABA, la conductance, la cinétique du canal ainsi que la réponse aux agents pharmacologiques sont des caractéristiques qui varient selon la composition du récepteur¹⁰⁸. Les drogues anticonvulsantes comme les benzodiazépines et les anxiolytiques interagissent préférentiellement avec les RGABA_A contenant une sous-unité α_x ¹⁰⁹. Les sites de liaisons du benzodiazépine sont localisés à l'interface de α_1 et γ_2 ¹¹⁰. Plusieurs sous-unités tels π , ε , θ and ρ sont d'un niveau d'expression relatif plus faible. Ils sont moins bien caractérisés et certains sont tissus spécifiques. Par exemple, la sous-unité π est détectée seulement dans certains tissus périphériques, de même que les sous-unités $\rho 1-3$ sont principalement exprimées dans la rétine¹¹¹.

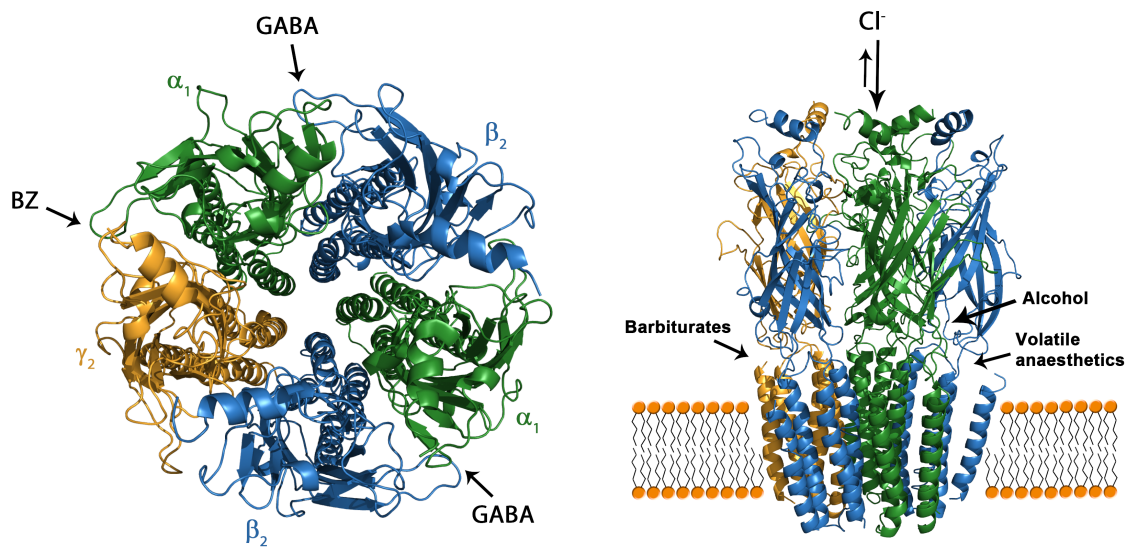


Figure 1.3.2. Modèle du récepteur GABA_A

A. Vue de dessus du modèle structural du récepteur GABA_A qui souligne l'organisation en pentamère des sous-unités ainsi que les sites de liaison pour le neurotransmetteur GABA et le diazepam (DZP). La localisation des sites de liaison au GABA et au DZP se trouve respectivement aux interfaces des sous-unités $\alpha\beta$ et $\alpha\gamma$. **B.** Vue de côté du modèle structural du récepteur GABA_A inséré dans la membrane cellulaire illustrant les sites de liaisons de certaines molécules et le flux d'ions chlore passant à travers le canal (traduit de Cossette et *al.*, 2012).

1.3.3 Évolution génomique des gènes du RGABA_A chez l'homo sapiens

La localisation génomique des récepteurs est maintenant entièrement connue, et 14 des 19 gènes codant pour l'ensemble des sous-unités du récepteur GABA_A sont répartis en cluster à travers le génome. Deux clusters de 4 gènes et deux clusters de 3 gènes ont été identifiés sur les chromosomes 4, 5, 15 et chromosome X du génome humain (Figure 1.3.3)¹¹². Chaque cluster contient des gènes des classes α , β ou γ/ϵ . Il a été proposé que cette organisation résulterait d'une série d'événements duplicatifs de gènes originaires d'un cluster ancestral $\alpha\beta\gamma$ au cours de l'évolution des chordés¹¹³. Les gènes *GABRQ* et *GABRE* codant pour les sous-

unités θ et ε sont considérés respectivement comme « de type β » et « de type γ »¹¹³. Les gènes *GABRD* (δ) et *GABRR3* (ρ_3) sont respectivement localisés sur le chromosome 1 and 3. Le gène *GABRP* est, pour sa part, localisé sur le chromosome 5 mais séparé et en position distale par rapport au cluster des gènes *GABRG2-GABRA1-GABRA6-GABRB2*. Les gènes (*GABRR1-GABRR2*) codant pour les sous-unités ρ_1 et ρ_2 se retrouvent ensemble sur le chromosome 6.

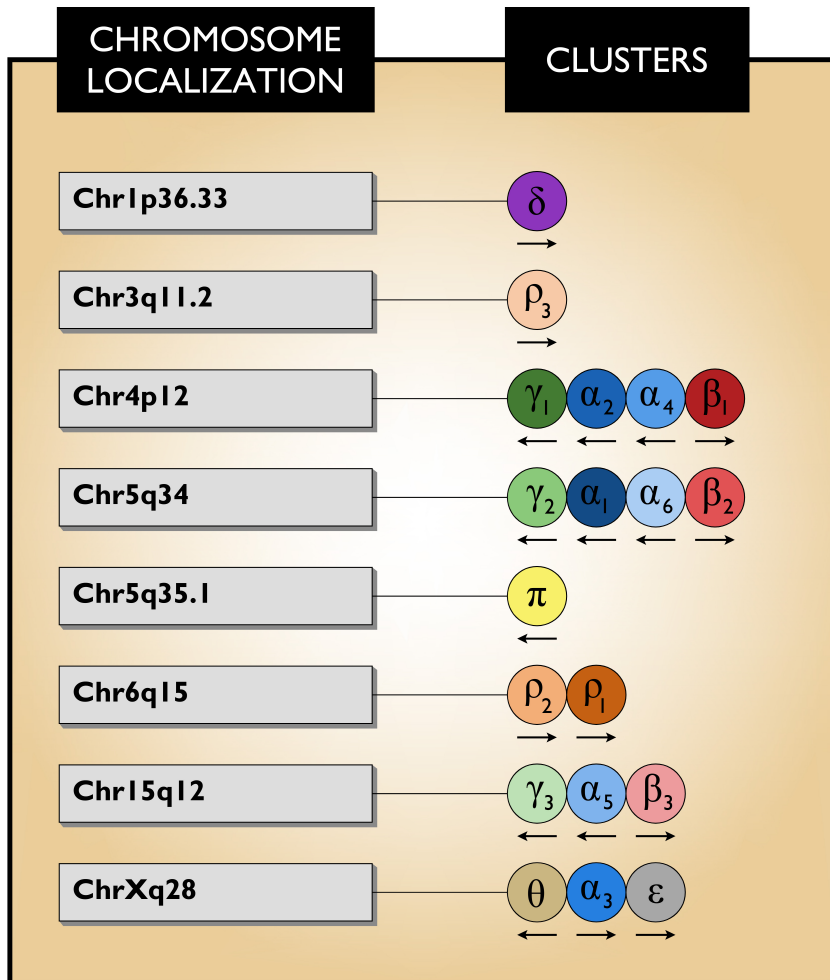


Figure 1.3.3. Clusters et localisation chromosomique des gènes du récepteur GABA_A. Présentation de l'ordre relatif des gènes des sous-unités et de leur orientation transcriptionnelle (indiquée par une flèche) pour chaque cluster. La localisation chromosomique de chaque gène a été obtenue à partir de UCSC Genome Browser (Hg19 Assembly) (traduit de Cossette et *al.*, 2012).

1.3.4 L'implication du RGABA_A dans le développement cérébral

Dans le cerveau adulte, la concentration intracellulaire de chlore dans un neurone $[\text{Cl}^-]_i$ est inférieure à la concentration extracellulaire $[\text{Cl}^-]_e$. De plus, lorsque le GABA active les récepteurs GABA_A , cet hétéropentamer ouvre son pore central, ce qui permet un afflux d'ions chlorure, et ainsi, une hyperpolarisation. Cependant, dans le cerveau immature, l'activation des récepteurs GABA_A par le GABA produit plutôt une dépolarisation qui engendrera une action GABAergique excitatrice. Le gradient d'ion chlore est inversé, la concentration de chlore intracellulaire $[\text{Cl}^-]_i$ est plus élevée dans un neurone en développement ($[\text{Cl}^-]_i > [\text{Cl}^-]_e$)¹¹⁴. Dans ces conditions, l'activation du récepteur GABA_A entraîne un flot d'ions Cl^- hors de la cellule (Figure 1.3.3). Au cours du développement, la transition médiée par le GABA de l'état excitateur vers l'état inhibiteur du neurone est dépendant de l'expression développementale des cotransporteurs cation-chlorures KCC2 et NKCC1^{115,116}. L'expression de KCC2 et NKCC1 suit des gradients opposés. Le patron d'expression de ces cotransporteurs régule la concentration de chlore intracellulaire $[\text{Cl}^-]_i$ au cours du développement. KCC2 expulse le chlore de la cellule alors que NKCC1 pompe le Cl^- dans la cellule. Dans les neurones immatures, NKCC1 est prédominant et importe le chlore alors que celui qui l'exporte ne l'est pas. En conséquence, $[\text{Cl}^-]_i$ est plus élevé chez les neurones immatures et les flux de chlore lors de l'activation des récepteurs GABA seront différents. KCC2 est un déterminant majeur du niveau de la $[\text{Cl}^-]_i$ dans le cerveau adulte. KCC2 est exprimé au cours des premiers jours de vie entraînant un renversement du gradient transmembranaire chlore.

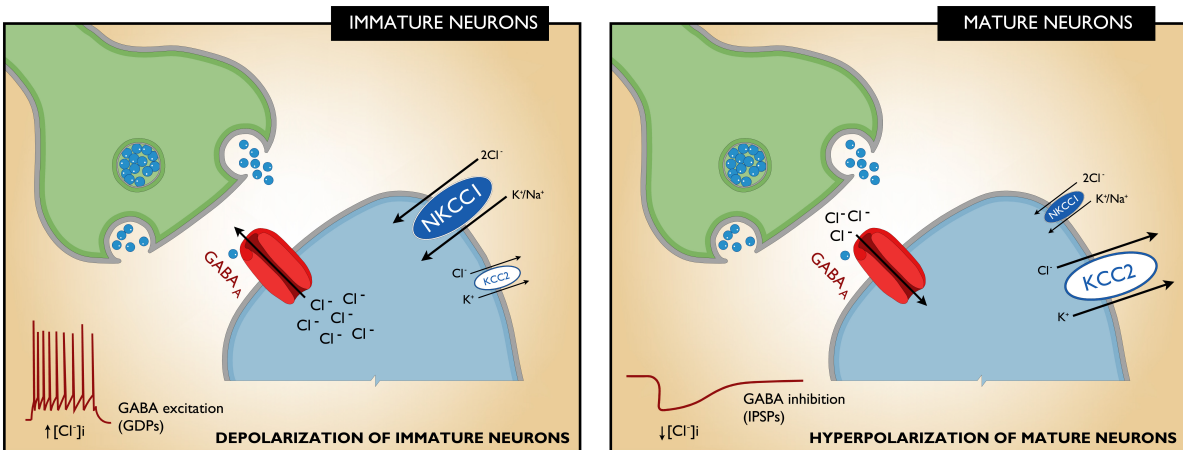


Figure 1.3.4. Homéostasie du chlore intracellulaire $[Cl^-]_i$ au cours du développement

Dans les neurones immatures, l'action excitatrice du récepteur $GABA_A$ est déclenchée par une $[Cl^-]$ intracellulaire élevée. Le passage progressif d'une signalisation GABAergique dépolarisante vers une signalisation hyperpolarisante à travers $RGABA_A$ est généré par une augmentation de l'expression du cotransporteur $KCC2$ et de la diminution de $NKCC1$ (traduit de Cossette et *al.*, 2012).

Il est intéressant de noter que ce revirement développemental dirigé par $KCC2$ est induit par les synapses GABAergiques elles-mêmes¹¹⁷. L'action excitatrice du GABA joue un rôle central dans la génération de l'activité électrique développementale appelée les GDPs (*Giant Depolarizing Potentials*). Les GDPs se présentent sous la forme de bouffées d'activités synchrones¹¹⁸. Ce sont des réponses dépolarisantes spécifiques au tissu immature et ont un rôle fondamental dans le développement du système nerveux, en particulier lors de la croissance et de la migration neuronale, de la formation et de la plasticité synaptique¹¹⁹. À noter que le GABA peut stimuler la migration neuronale, la division cellulaire ainsi que la croissance neuronale à travers d'autres mécanismes¹¹⁴.

1.4 Problématique

Les épilepsies génétiques généralisées (ÉGG) constituent un groupe de syndromes épileptiques hétérogènes qui se manifestent habituellement durant les périodes de l'enfance et de l'adolescence. Des études de liaison génétique et des études de concordance sur des jumeaux ont suggéré que les facteurs génétiques jouaient un rôle important dans l'épilepsie. Comme nous avons pu le constater dans ce présent chapitre, l'hétérogénéité phénotypique de ce groupe est accompagnée d'une base génétique complexe. Au moment où ce projet a été entrepris, plusieurs gènes impliqués dans des formes familiales d'ÉGG avaient été identifiés. La majorité d'entre eux codaient pour des canaux ioniques incluant le récepteur-ligand GABA_A (RGABA_A). Chez l'adulte, ces canaux chloriques sont activés par le GABA et médient la principale réponse inhibitrice du système nerveux central. Paradoxalement, dans le cerveau immature, l'activation de ces mêmes récepteurs GABA_A induit une réponse excitatrice. Plusieurs données récentes suggèrent que cette transmission GABAergique excitatrice aurait un effet trophique sur le cerveau immature et jouerait un rôle important dès les stades précoces du développement du SNC¹²⁰. Précédemment, nous avons démontré que des mutations dans la sous-unité alpha 1 du GABA_AR pouvaient causer l'ÉGG⁴¹. De plus, des mutations dans d'autres sous-unités ont déjà été associées aux ÉGG (*GABRG2*, *GABRD*, *GABRB3*). Néanmoins, les mutations dans ces gènes de prédisposition ne seraient responsables que d'une faible proportion des cas d'ÉGG. L'ensemble de ces données fait donc des 19 gènes codant pour les sous-unités du RGABA_A une cible de choix sur laquelle nous avons concentré nos efforts de recherche. Notre projet s'appuyait ainsi sur quatre hypothèses centrales:

1. Un nombre significatif de patients présentant une épilepsie génétique généralisée est toujours sans diagnostic moléculaire.
2. Des mutations rares prédisposent à l'épilepsie génétique généralisée.
3. Le séquençage direct de gènes candidats est l'approche la plus appropriée pour identifier ces mutations.
4. Ces mutations affectent des gènes impliqués dans des mécanismes moléculaires associés à la pathogénèse de l'épilepsie.

Le but général de ce projet vise à identifier des mutations et à déterminer si elles confèrent une susceptibilité à développer l'ÉGG, forme d'épilepsie où la composante génétique est la plus importante. Cette thèse s'est articulée autour des deux objectifs principaux présentés dans le plan expérimental ci-dessous:

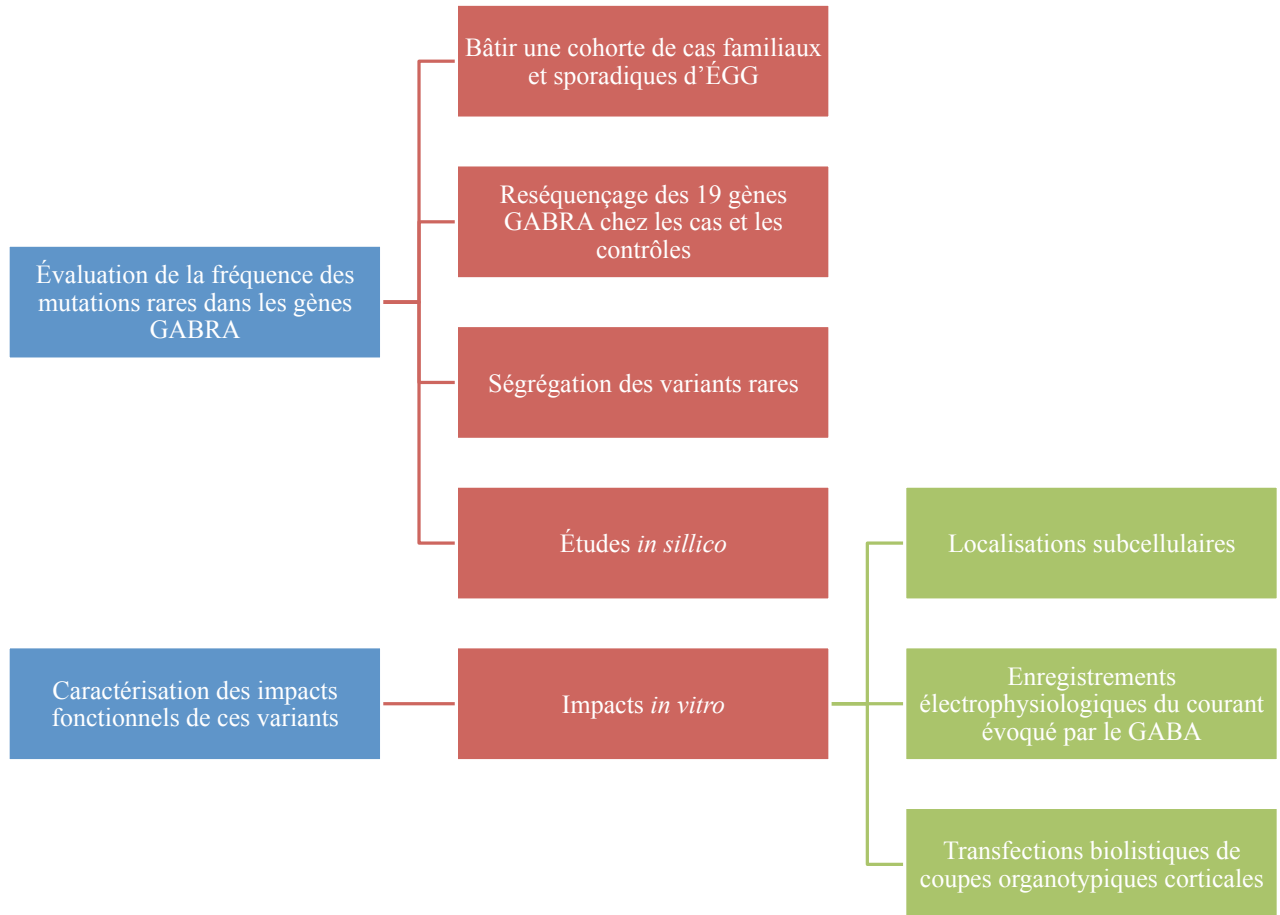


Figure 1.4.1. Plan expérimental

Les chapitres suivants montrent le succès de l'identification de gènes mutés associés à l'ÉGG au moyen de technologies de séquençage et d'études fonctionnelles *in vitro*. En effet, au chapitre 2, nous avons évalué la contribution spécifique du gène *GABRB3* dans une cohorte de cas familiaux canadien-français atteints d'ÉGG. Dans le chapitre 3, nous avons identifié des

mutations des les gènes *GABRA1* et *GABRG2* dans des familles avec épilepsie génétique généralisée et nous avons décrit leurs impacts sur des mécanismes moléculaires et sur des fonctions biologiques du récepteur GABA_A. Au chapitre 4, nous présentons les résultats du criblage des 19 gènes GABRA et de l'analyse de l'ensemble des variants rares retrouvés dans notre cohorte de patients ÉGG. Dans le chapitre 5, nous avons utilisé une approche systématique et décrit les altérations développementales qu'engendre l'expression des récepteurs GABA_A mutants dans un modèle d'expression génique à l'échelle de la cellule unique.

En résumé, nos approches ont notamment permis l'identification de mutations dans les gènes GABRA et l'évaluation de l'impact de ce type de mutations sur des mécanismes pathophysiologiques et moléculaires impliqués dans ce syndrome épileptique.

2. Reséquençage de *GABRB3* chez des familles canadiennes-françaises avec épilepsie génétique généralisée

2.1 Présentation de l'article

L'épilepsie absence de l'enfant (CAE), est caractérisée par des absences au cours desquelles le patient manifeste de brèves pertes de conscience ainsi que des pointes-ondes synchrones généralisées. Ces crises apparaissent entre 2 et 8 ans chez l'enfant. Elles durent de 3 à 10 secondes et peuvent survenir jusqu'à 200 fois par jour. Entre 16 et 45% des patients CAE ont une histoire familiale positive¹²¹. Des variants associés à l'épilepsie absence de l'enfant ont été identifiés dans plusieurs gènes codant pour des canaux ioniques incluant les canaux calcium de type-T^{122,123}, les canaux chlorure¹²⁴ et les récepteurs GABA_A^{39,80,125}.

Cet article a pris forme suite à la publication de trois mutations dans la sous-unité $\beta 3$ du récepteur GABA_A par le groupe de Tanaka et *al.*, 2008 : *GABRB3* (P11S), *GABRB3* (S15F) et *GABRB3* (G32R). Les données obtenues à partir de populations d'Amérique du Sud nous ont incité à vérifier la présence de variants rares dans *GABRB3* chez notre cohorte d'épileptiques d'origine canadienne-française. Pour arriver à bâtir rapidement une cohorte de 183 ÉGG dont 88 CAE, un effort concerté des neurologues de l'hôpital Notre-Dame et de l'hôpital Ste-Justine a dû être déployé. Nous avons également investigué, à l'aide de notre cohorte de CAE, si une portion substantielle d'un syndrome épileptique précis pouvait être génétiquement expliquée par *GABRB3*.

2.1.1 Contribution des auteurs

Planification de l'étude : PLT et CM

Collecte des patients et informations cliniques : CP, MG, LC et PC

Volet génétique (échantillons, séquençage, analyse, statistiques) : PLT et CM

Rédaction du manuscrit : PLT, CM et PC

2.2 Screening of *GABRB3* in French-Canadian Families with Idiopathic Generalized Epilepsy

Pamela Lachance-Touchette^{1*}, Caroline Martin^{1*}, Chantal Poulin¹, Micheline Gravel¹, Lionel Carmant¹, Patrick Cossette¹

Article publié dans Epilepsia, juin 2010, volume 51(9), pages 1894 à 1897
Identifiant PubMed: 20550555

¹Research Center of the CHUM, Hôpital Notre-Dame, Centre d'Excellence en Neuromique de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

*These two authors contributed equally to the research and writing of this article.

2.2.1 Abstract

Mutations in the *GABRB3* have been recently associated with Childhood absence epilepsy (CAE) families from Honduras and Mexico. In this study, we aimed to determine the frequency of mutation in this gene in our cohort of families with CAE and other related idiopathic generalized epilepsy (IGE) syndromes. We screened the open reading frame of *GABRB3* in 183 French Canadian individuals with IGE including 88 with CAE. A total of 9 SNPs have been identified, 5 of which are novel. The previously described P11S missense mutation was found in three affected and one unaffected individuals from a French-Canadian family. However, the P11S variant was also found in one of our 190 control individuals from French-Canadian origin, suggesting that this variant is rather a rare polymorphism in this population. Further screening of other IGE cohorts from various ethnic origins would help confirming the association between this rare functional variant and epilepsy.

2.2.2 Introduction

Childhood absence epilepsy (CAE [ECA MIM 600131, ECA2 MIM 607681, ECA3 MIM 607682, ECA4 MIM 611136]) is a classical IGE syndrome and it accounts for up to 15% of childhood epilepsies. CAE usually begins between 2 and 8 years old and is characterized by frequent absence seizures associated with generalized and symmetrical 3-Hz

spike waves. Based on familial aggregation and twin studies, genetic factors are believed to play an important role in this epileptic syndrome⁵⁸. Over the last decade, several genes underlying monogenic forms of epilepsy have been identified in families with absence seizures. CAE also shows significant clinical and genetic overlaps with other classical idiopathic generalized epilepsy (IGE) syndromes. More specifically, mutations in various subunits of the GABA_A receptor have been found in families with generalized epilepsy with febrile seizure plus (GEFS+)^{40,126}, autosomal dominant juvenile myoclonic epilepsy⁴¹ and childhood absences epilepsy with or without febrile seizures^{39,125,127}. Tanaka et al.¹²⁸ recently reported three mutations in *GABRB3* gene, encoding for the β3 subunit of the GABA_A receptor, in families with CAE. In this study, we sought to determine the frequency of mutation in this latter gene in our cohort of families with CAE and other related IGE syndromes.

2.2.3 Materials and Methods

We screened the complete open reading frame of *GABRB3* in 183 French Canadian individuals with IGE, including 88 with CAE. The methods used for the clinical characterization of this cohort has been described previously¹²⁹. We amplified by polymerase chain reaction (AppliedBiosystems9700) all the coding regions of this gene. We designed all primers at least 50 bp from the exon–intron boundaries to examine the entire exonic sequences of the gene and splice sites. PCR primer pairs were designed using software *Exon primer* from the UCSC Genome Browser base by using NM_021912 and NM_000814 sequences. Primer sequences and PCR conditions are available upon request. The amplicons were analyzed on ABI3730 automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) by using Mutation Surveyor software version 3.0. All mutations and variants were confirmed by resequencing. All the novel SNPs and known mutations were tested in a control population of 190 individuals. These control individuals underwent a systematic questionnaire in order to exclude symptoms compatible with seizures as well as any familial history of epilepsy. The main aim of this study is to assess whether mutation or rare variant in *GABRB3* are associated with epilepsy in our cohort. We did not wish to perform a systematic association study. However, since we generated many novel genetic variants in *GABRB3* gene, we compared the

relative frequencies of these genotypes between affected individuals and controls, although the relatively low sample size limits the power of these analyses. The difference in the frequency of genotypes between cases and controls were assessed by using Chi-square test for SNP 1 and SNP 6. The association between these genotypes and epilepsy were estimated by a logistic regression analysis (Odd ratios; 95% CI). The low frequency of minor allele for the other new variants made the statistical analysis non applicable.

2.2.4 Results

We found a c.G31A nucleotide change located in exon 1a and predicting for a P11S variation, in a proband with CAE (IV-01) (Figure 1.2.3). This individual had typical absence seizures starting at the age of 6, and her electroencephalogram (EEG) shows generalized spike and waves discharges (GSW) enhanced by hyperventilation. The *GABRB3*_{P11S} variant was found in two additional affected individuals from the same family. Individual IV-02 exhibits abnormal EEG showing posterior GSW discharges. However, this latter individual remains so far without clinical seizures at the age of 14. Another mutation carrier (III-01) has had a total of three unprovoked seizures at the age of 40 years old, for which no etiology could be identified. In particular, EEG and brain scan were normal. Interestingly, individual II-03 also had late onset (40 yo) generalized tonic clonic seizures. Unfortunately, he died prematurely from pulmonary embolism and neither additional clinical information nor DNA was available for analysis. Finally, the *GABRB3*_{P11S} variant was also found in an asymptomatic individual (II-02). EEG recording was not obtained in this latter individual. In contrast to the Mexican population¹²⁸, the *GABRB3*_{P11S} variant was present in one of the 378 control chromosomes from our population. There is thus no significant difference in the frequency of the P11S variant between the epileptic cohort and the control group ($\chi^2= 0$; $p=0,982$; OR=1,033). We have also identified a total of 8 other SNPs, 5 of which are novel (1 intronic, 4 silents). The phenotypes associated with these novel SNPs are: CAE (n=1) for SNP3, IGE-NOS (n=2) and CAE (n=1) for SNP5, IGE-NOS (n=11) and CAE (n=7) for SNP6, IGE-NOS (n=1) for SNP7 and CAE (n=1) for SNP8 (Table 1). One of these novel SNPs was found in the intron 1a close to the exon 1a and does not affect the predicted consensus splice site. Its presence in the control population was not assessed. We sought for the presence of the four novel silent variations in 190 control individuals from the French-Canadian population. The p.T201T,

p.F314F and p.G335G were all detected in a single affected individual but not in the control group. In turn, the p.S261S was found in both the affected and control groups. Unexpectedly, the frequency of this variant was significantly higher in the control group ($\chi^2= 33.9$; $p=0.001$; OR=0.201) (Table 1). SNPs that were already listed in the NCBI database were not tested in the control population.

2.2.5 Discussion

Recently, Tanaka et al.¹²⁸ showed that mutations in *GABRB3* are associated with a loss of function, including for the *GABRB3*_{P11S} variation found in two Mexican families, one of which with four CAE individuals. In this study, we report the same P11S variation in *GABRB3* in four individuals from a French-Canadian family. In contrast to the Mexican families, in the FC family described here, only one *GABRB3*_{P11S} mutation carrier is affected with CAE, whereas the other affected carrier exhibit non-specific and late-onset generalized epilepsy. Among the two asymptomatic carriers, one shows GSW discharges. Although we cannot exclude that GSW may have been present during childhood of the three additional carriers, this observation suggests that the *GABRB3*_{P11S} mutation may be associated with different epilepsy phenotypes together with low penetrance of the epileptic trait. Such a reduced penetrance of mutations associated with familial epilepsy has been reported previously^{39,62}. Also, even for CAE phenotype, the prevalence of the *GABRB3* mutations is lower in our population (1 mutation in 88 CAE) compared to the population of Central America (4 mutations in 48 CAE). However, whereas Tanaka et al. did not find the *GABRB3*_{P11S} variation in their controls, we detected it in one control individual from the French-Canadian population. Overall, our study nonetheless suggests that the P11S mutation in *GABRB3* is associated with CAE and related phenotypes.

The search for common genetic variants predisposing to epilepsy allowed the identification of polymorphisms that may have a small effect on the phenotype, although a small fraction of these studies have been so far replicated. In turn, the search for rare genetic variants having a more dramatic contribution to the epilepsy phenotype such as in monogenic epilepsies was found to be much more successful^{39-41,62,128}. We propose that the rare P11S variant found in *GABRB3* may fall between these two extremes. Our observation is consistent with the fact that

rare missense variants (less than 1% of the population), are associated with mildly deleterious effect^{58,130}. Such rare functional genetic variations may thus be one of the genetic bases for complex diseases including epilepsy.

In conclusion, we have found that *GABRB3*_{P11S} is a rare missense variation segregating with CAE, asymptomatic GSW discharges and late onset generalized seizures in a small French-Canadian family. Screening *GABRB3* gene in additional IGE cohorts is warranted in order to assess the relative contribution of these genetic variants and mutations to the various IGE phenotypes.

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors want to thank the families for their participation to this study. PLT and CM are supported by the Savoy Foundation. PC is a clinical-scientist from the CIHR. This study has been funded by the FRSQ and the CIHR. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines. Disclosure: None of the authors has any conflict of interest to disclose.

2.2.6 Tableaux et figures

Tableau 2.2.6.1. Table 1. Inventory of the *GABRB3* variants found in our IGE cohort

SNPs	Nucleotide	Allele	AA	Rs	Maf		χ^2	P-value	Odds Ratio (95% CI)
	genomic	major/minor			IGE/CAE	Controls			
SNP1	g.chr15:24569934	G/A	p.P11S	rs25409	0,003	0,003	0,001	0,982	1,033 (0,107-9,929)
SNP2	g.chr15:24569890	C/T	p.P25P	rs20318	0,147				
SNP3	g.chr15:24569069	C/T	---	---	0,003				
SNP4	g.chr15:24568629	C/T	---	rs8179186	0,063				
SNP5	g.chr15:24376638	C/T	p.T201T	---	0,008	NA	NA	NA	NA
SNP6	g.chr15:24363873	G/A	p.S261S	---	0,049	0,176	33,855	0	0,201 (0,114-0,355)
SNP7	g.chr15:24357310	C/T	p.F314F	---	0,003	NA	NA	NA	NA
SNP8	g.chr15:24357247	C/T	p.G335G	---	0,003	NA	NA	NA	NA
SNP9	g.chr15:24357157	T/C	---	rs3751582	0,243				

Relative frequencies of the *GABRB3* variants in IGE versus control individuals.

Maf=Frequency of the minor allele.

Figure 2.2.6.2. Figure 1. A French-Canadian family with childhood absence epilepsy and related phenotypes

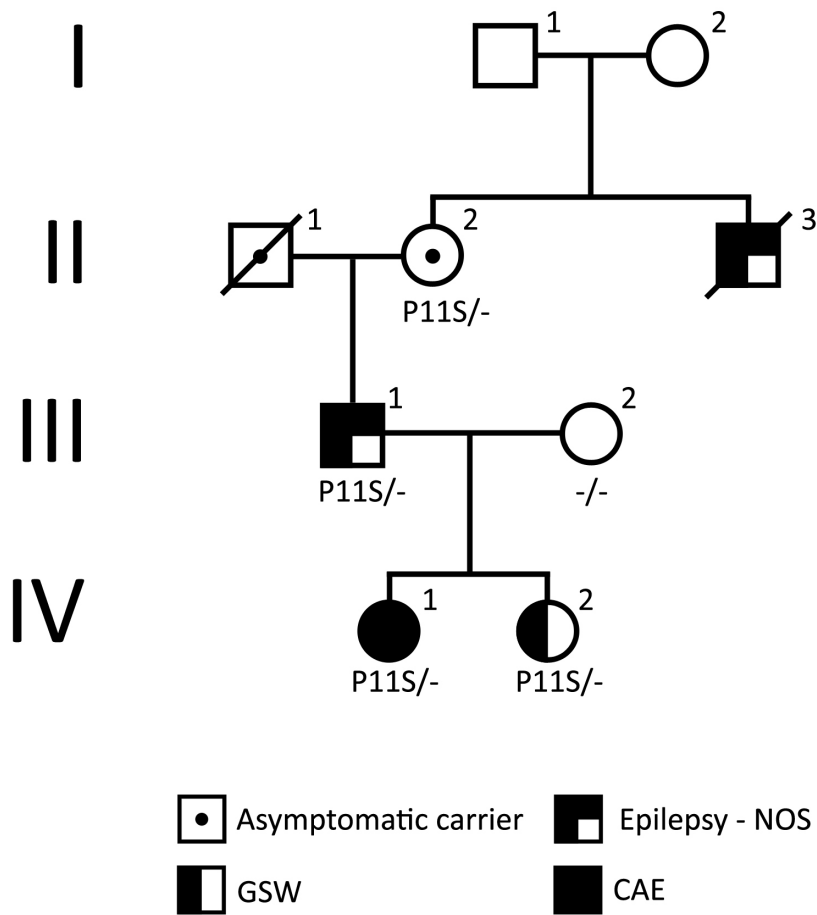


Figure 1. A French-Canadian family with childhood absence epilepsy and related phenotypes. The clinical features of the epileptic syndrome are heterogeneous in affected members of the family over three generations. GSW: Generalized spike and waves discharges, CAE: Childhood Absence Epilepsy, IGE: Idiopathic Generalized Epilepsy; NOS: not otherwise specified.

3. Nouvelles mutations découvertes dans les sous-unités $\alpha 1$ et $\gamma 2$ du récepteur $GABA_A$ dans des familles associées à l'épilepsie génétique généralisée

3.1 Présentation de l'article

Initialement, les probands de ces familles faisaient partie des 95 premiers patients séquencés pour l'ensemble des gènes $GABRA$. La découverte de ces trois familles monogéniques autosomiques dominantes nous a poussé à vouloir comprendre davantage l'implication d'une sous-unité mutante du $RGABA_A$ dans le développement de cette pathologie. Déterminer les mécanismes à l'origine de l'épileptogenèse est d'une importance clinique majeure. Cet article a voulu répondre à cette question en combinant des études de localisation subcellulaire (microscopie confocale) et d'électrophysiologie. La collaboration avec le laboratoire de Dr Bowie a été essentielle au succès de cet article puisqu'elle nous a permis d'étudier en profondeur les conséquences de ces mutations sur le comportement physiologique du récepteur. Grâce à un travail assidu, nous avons élaboré un plan expérimental complet et novateur. Ainsi nous avons été le premier groupe à réussir à amplifier le cDNA du gène *GABRA1* à partir de cellules lymphoblastiques. De plus, nous avons été les premiers à regrouper en un seul article autant d'analyses fonctionnelles sur des récepteurs recombinants dans des cellules hétérologues pour ces gènes. Certaines images ont été sélectionnées pour faire la page couverture du *European Journal of Neuroscience*. De plus, notre article a suscité un intérêt dans la communauté scientifique et les auteurs Christopher A. Reid et Dimitri M. Kullmann ont commenté nos recherches dans la même revue¹³¹.

3.1.1 Contribution des auteurs

Planification de l'étude : PLT et PC

Collecte des patients et informations cliniques : PK, HL, AL, LC et PC

Volet génétique (échantillons, séquençage, analyse) : PLT et CM

Volet moléculaire (RT-PCR, clonage, western blot, immunohistochimie, imagerie) :
PLT, CM et LL

Volet Électrophysiologie (transfection, enregistrement, analyses, statistique): PLT, PB
et DB

Rédaction du manuscrit : PLT, PB, FB, DB et PC

3.2 Novel $\alpha 1$ and $\gamma 2$ GABA_A receptor subunit mutations in families with idiopathic generalized epilepsy

Pamela Lachance-Touchette^{1*}, Patricia Brown^{2,3*}, Caroline Meloche¹, Peter Kinirons¹, Line Lapointe¹, Hélène Lacasse¹, Anne Lortie⁴, Lionel Carmant⁴, Fiona Bedford⁵, Derek Bowie² & Patrick Cossette¹

Article publi e dans European Journal of Neuroscience, mai 2011, volume 34(2), pages 237   249

Identifiant PubMed: 21714819

¹Centre for Excellence in Neuromics of University of Montreal (CENUM), CHUM Research Center, Montreal, Canada² Department of Pharmacology & Therapeutics, McGill University, Montreal, Canada

³Integrated Program in Neuroscience, McGill University, Montreal, Canada

⁴Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Université de Montréal, Quebec, Canada

⁵Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, Canada.

*Both authors contributed equally to this study

3.2.1 Abstract

Epilepsy is a heterogeneous neurological disease affecting around 50 millions people worldwide. Genetic factors play an important role in both the onset and severity of the condition with mutations in several ion-channel genes being implicated, including those encoding the GABA_A receptor. Here, we evaluated the frequency of additional mutations in the GABA_A receptor by direct sequencing of the complete open reading frame of the *GABRA1* and *GABRG2* genes from a cohort of French Canadian families with idiopathic generalized epilepsy (IGE). Using this approach, we have identified 3 novel mutations that were absent in over 400 control chromosomes. In *GABRA1*, two mutations were found, with the first being a 25 base pair insertion that was associated with intron retention (i.e. K353delins18X) and the second corresponding to a single point mutation that replaced the aspartate 219 residue with an asparagine (i.e. D219N). Electrophysiological analysis revealed that K353delins18X and D219N altered GABA_A receptor function by reducing the total surface expression of mature

protein and/or by curtailing neurotransmitter effectiveness. Both defects would be expected to have a detrimental effect on inhibitory control of neuronal circuits. In contrast, the single point mutation identified in the *GABRG2* gene, namely Pro83Ser, was indistinguishable from the wild-type subunit in terms of surface expression and functionality. This finding was all the more intriguing as the mutation exhibited a high degree of penetrance in 3 generations of one French Canadian family. Further experimentation will be required to understand how this mutation contributes to the occurrence of IGE in these individuals.

3.2.2 Introduction

Epilepsy is one of the most common neurological conditions, with a prevalence of approximately 5 – 10/1000 in North America¹⁹. For most patients (about 65 %) with either generalized or partial epilepsies, the underlying cause is unknown and the condition is referred to as being ‘idiopathic’. Overall, 30% of all individuals with epilepsy have idiopathic generalized epilepsy (IGE)¹³²; a condition marked by generalized seizures and specific electroencephalographic abnormalities with no discernible defects in brain structure. In the past two decades, an increasing number of mutations in genes predisposing for various forms of IGE have been identified⁵⁷. Most of the mutations are found in genes encoding for voltage- or ligand-gated ion-channels; they account for most familial forms of the disease¹³³⁻¹³⁷. This finding has led to the conclusion that IGE is primarily a “channelopathy”¹³⁸; although not all mutations encode for ion-channels (e.g. Pal et al., 2003¹³⁹).

GABA_A receptors feature among several of the candidate ion-channels thought to be involved in IGE^{135,138,140}. In keeping with this, signaling through GABA_A receptors provides almost all inhibitory tone to the adult brain, balancing the tendency of excitatory neuronal circuits to induce convulsions¹⁴¹. To achieve this, GABA_A receptors hyperpolarize neurons by fluxing chloride ions through a central anion-selective pore that is a pentamer assembled from 19 possible subunits, namely $\alpha 1 - \alpha 6$, $\beta 1 - \beta 3$, $\gamma 1 - \gamma 3$, δ , ϵ , π , θ and $\rho 1 - \rho 3$ ¹⁴². Subunit number and organization around this central pore is ordered¹⁴³ with the most commonly expressed GABA_A receptor thought to consist of two α 's, two β 's and a γ_2 ¹⁴⁴. To date, most GABA_A

receptor mutations associated with IGE have been found in the γ_2 (*GABRG2*) subunit^{39,40,145-149} though mutations in the α_1 (*GABRA1*)^{41,125}, δ (*GABRD*)¹²⁶ and β_3 (*GABRB3*)^{38,128} subunits have also been described.

Here, we identify three novel mutations from a population of French Canadians with IGE. Two mutations found in the *GABRA1* gene were associated with disrupted plasma membrane delivery of the fully assembled GABA_A receptor as well as deficits in its signaling properties. In contrast, a single point mutation found in the *GABRG2* gene had little effect on surface membrane expression or the functional properties of the mature receptor, a property not yet described for any other IGE-related GABA_A receptor mutants. Future experiments will be needed to ascertain whether this mutation disrupts a more nuanced aspect of GABA_A receptor biology.

3.2.3 Materials and Methods

3.2.3.1 Subjects and Healthy-control Samples

95 individuals with IGE were selected from the Quebec population of Canada. The methods used for the clinical characterization of this cohort have been described previously¹²⁹. The phenotypes in these probands include 21 cases with juvenile myoclonic epilepsy (JME), 12 with childhood absence epilepsy (CAE), 8 with generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) and 54 with IGE not otherwise specified. This cohort includes 46 familial cases (17 families with two affected individuals, 9 with three affected individuals, and 20 with four or more affected individuals) and 49 singletons. A summary of clinical manifestations of affected individuals with mutations in *GABRA1* or *GABRG2* are provided in Supplementary Table 1. All the individuals, including 190 healthy ethnically-matched controls, gave informed consent, after which patient information and blood samples were collected. DNA was extracted from peripheral blood through the use of standard protocols.

3.2.3.2 Screening for Mutations and Variation Analysis

We detected a total of three novel variants in *GABRA1* and *GABRG2* genes by re-sequencing them in a cohort of 95 subjects (53 females and 42 males) with epilepsy (Table 1). The open reading frame of each gene codes for the $\alpha 1$ and $\gamma 2$ subunits of the GABA_A receptor. The genomic organization of each gene was obtained from the UCSC Genome Browser (Hg18 build; <http://genome.ucsc.edu/>). All the coding regions of the genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR, AppliedBiosystems9700). We designed primers from at least 50 bp of the exon–intron boundaries to examine the entire exonic sequences of the gene and splice sites. PCR primer pairs were designed using the software *Exon primer* from the UCSC Genome Browser. We used the sequence of reference NM_000806 and NM_000816 for the *GABRA1* and *GABRG2* genes respectively. The amplicons were analyzed on an ABI3730 automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) by using *Mutation Surveyor* software version 3.0 (SoftGenetics, State College, Pennsylvania). All mutations and variants were confirmed by resequencing. For the analyses of detected SNPs in our cohort, we used the dbSNP Build 133 based on NCBI Human Genome (version 5.2) and The Human Gene Mutation Database (HGMD) at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. The novel single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and known mutations were tested by sequencing the corresponding fragment in a control population of 190 individuals. These French Canadian controls underwent a systematic questionnaire in order to exclude symptoms compatible with seizures as well as any familial history of epilepsy. Transmission of any variant or mutation was tested in parents and relatives of the probands when available.

3.2.3.3 In Silico Predictions

The combination of four programs (*PolyPhen*, *SIFT*, *SNAP* and *PANTHER*) was used to predict the potential disruptiveness of an amino acid substitution on the structure and function of a human protein (Table 1). The genome information and homology searches were based on the UCSC Genome Browser database (NCBI36/hg18 assembly). Sequence cluster alignments were performed by using the Clustal W algorithm. All novel SNPs identified were

also tested for their potential effects on splicing enhancer/inhibitor elements by using *ESEfinder*¹⁵⁰ and *RESCUE-ESE* programs (data not shown)¹⁵¹.

3.2.3.4 Cloning and Mutagenesis

For biochemical and functional analysis of each mutation, we cloned human $\alpha 1$, $\beta 2$ and $\gamma 2$ subunits of the GABA_A receptor into the pcDNA3.1(-) vector (Invitrogen). As a positive control, we also cloned the A322D mutant of *GABRA1* gene which has been described previously^{41,152}. The QuickChange site directed mutagenesis kit (Stratagene) was used to introduce D219N and P83S mutations in the *GABRA1* and *GABRG2* clones respectively, as described previously^{41,152}. The sequence of the mutant *GABRA1* (K353delins18X) subunit was obtained by PCR from the cDNA of the patient A-III-I and subcloned into the vector containing the wild-type *GABRA1* to replace the 3' part of the gene as described below. For the immunofluorescence experiments, a myc tag was inserted by PCR at the N-terminus between the amino acids four and five of both the $\alpha 1$ and the $\gamma 2$ subunits. All constructs were sequenced to confirm the presence of the mutations and to exclude any other variants that may have been introduced during PCR amplification.

3.2.3.5 Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

To obtain the K353delins18X mutant, total cellular RNA from patient A-III-I was obtained from lymphoblastoid cell lines. RNA of the sample was reverse-transcribed to complementary DNA (cDNA) using the ThermoScript RT-PCR System Kit (Invitrogen). PCR-amplification was performed on the cDNA using the Advantage kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The cDNA was amplified with *GABRA1*-specific primers flanking intron 11: *GABRA1*-5' (exon 10): GAGCATCAGTGCCAGAACTCCCTCCC, *GABRA1*-3' (exon11): CGGGCTTGACCTCTTTAGGTTCTATGG and *GABRA1*-3'-UTR: CCCCTCTTTTCTCTCTCATTCTGTCTCC. All primers were designed using NM_000806 as the reference sequence. PCR conditions were: 95°C for 1 min, 40 cycles of 20 sec at 95°C, 30 sec at 65°C, 45 sec at 98°C, followed by 68°C for 7 min. Reactions were cycled on an AppliedBiosystems9700 PCR instrument. The amplicons were analyzed on an ABI3730 automatic sequencer by using *Mutation Surveyor* software version 3.0.

3.2.3.6 Immunofluorescence

To assess the surface cellular distribution of wildtype and mutant receptor subunits, myc-tagged wildtype and mutant $\alpha 1$ subunits were co-transfected with wildtype $\beta 2$ and $\gamma 2$. Myc-tagged wildtype and mutant $\gamma 2$ subunits were co-transfected with wildtype $\alpha 1$ and $\beta 2$ in HEK 293 cells that had been plated on 22-mm glass coverslips coated with poly-L-lysine in DMEM containing 10% fetal bovine serum and incubated for 18 h. All transient transfections were performed at a ratio of 1:1:2 for $\alpha 1$: $\beta 2$: $\gamma 2$ (2 μg : 2 μg : 4 μg per dish) using Lipofectamine 2000. For the endoplasmic reticulum (ER) colocalization experiments, a plasmid for the expression of the dsRed2-ER marker (Clontech) was co-transfected in a ratio of 1:1:2:1 for $\alpha 1$: $\beta 2$: $\gamma 2$:dsRed2-ER respectively. After 24 h, cells were washed and fixed in 4% formaldehyde in PBS. Cells were washed and blocked once with PBS-glycine 20 mM and once with PBS containing 10% goat serum, 0.5% BSA and 0.1% Triton X100 (10 minutes). Cells were then incubated with myc-tag rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling, #2278, 1:200 dilution in blocker) alone or with pan-Cadherin mouse monoclonal antibody for membrane co-localization (Abcam ab6528, 1:250 dilution, 1 h at room temperature). This step was followed by three washes with blocking solution. Cells were then incubated for 1 h at room temperature with Alexa Fluor 488 rabbit IgG antibody (Molecular Probes, Invitrogen) and/or Alexa Fluor 568 mouse IgG antibody (Molecular Probes, Invitrogen) at a 1:400 dilution in blocking solution. Cells were washed three times with blocking solution and mounted onto glass slides. Fluorescently labelled cells were imaged using a confocal microscope (Leica TCS SP5).

3.2.3.7 Affinity Purification of Surface Receptors

HEK 293 cells were plated in 10-cm dishes coated with poly-L-lysine in DMEM containing 10% fetal bovine serum and incubated for 18 h. Cells were transiently transfected with the cDNA encoding for WT or mutant $\alpha 1$ and $\beta 2$, together with the $\gamma 2$ subunit using a ratio of 1:1:2 for $\alpha 1$: $\beta 2$: $\gamma 2$ (12 μg : 12 μg : 24 μg). Twenty-four hours post-transfection, intact cells were washed twice with ice-cold PBS and incubated with the non-membrane permeable biotinylation reagent Sulfo-NHS SS-Biotin (0.5 mg/ml in PBS, Pierce) for 30 minutes at 4°C

to label surface membrane proteins. To quench the reaction, cells were incubated with 10 mM glycine in ice-cold PBS twice for 5 minutes at 4°C. Sulfhydryl groups were blocked by incubating the cells with 5 mM NEM in PBS for 15 minutes at room temperature. Cells were solubilized overnight at 4°C in lysis buffer (1% Triton X100, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA; pH 7.5) supplemented with protease inhibitors (Complete Mini, Roche) and 5 mM NEM. Lysates were cleared by centrifugation (16 000 x g, 10 min at 4°C). An aliquot of each lysate was saved. Biotinylated surface proteins were affinity purified from the remaining cell lysates by incubating for 1 h at 4°C with 100 µl of Immobilized Neutravidin-conjugated agarose bead slurry (Pierce). The samples were then subjected to centrifugation (16 000 x g, 10 min, at 4°C), an aliquot of the supernatant was kept and the beads were washed six times with buffer (0.5% Triton X100, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 5 mM EDTA; pH 7.5). Surface proteins were eluted from beads by incubating for 30 minutes at room temperature with 200 µl of LSB/Urea buffer (2X Laemmli Sample Buffer, 100 mM DTT and 6 M Urea; pH 6.8). Protein concentration of the lysates and the supernatants was determined using the Bradford method. Equal amounts of proteins were prepared by adding 2X LSB/Urea buffer and loaded into an SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) as well as 30 µl of affinity purified proteins.

3.2.3.7 Western Blotting

Protein samples were run on 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Blots were incubated for 1 h at room temperature in blocking buffer containing 5% non-fat milk in TTBS (500 nM NaCl, 20 mM Tris base, 0.1% Tween-20) followed by a 2h incubation at room temperature with anti- α 1 (1:2000; Chemicon MAB339) antibodies in blocking buffer. The blots were then washed (3 x 20 min) with TTBS and incubated for 1 h at room temperature in horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-mouse IgG or horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research) at a 1:5000 dilution in blocking buffer. The blots were then washed (3 x 20 min in TTBS) and revealed by chemiluminescence with Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer). GAPDH was used as a control to demonstrate that equal amounts of protein were loaded (mouse monoclonal anti-

GAPDH, Chemicon MAB374, 1:2000 dilution). Similarly, pan-Cadherin protein expression was used to normalize the loading of membrane proteins (mouse monoclonal pan-Cadherin, Abcam ab6528, 1:5000 dilution).

3.2.3.9 Cell Culture & Transfection

Techniques used to culture and transfect mammalian cells have been described in detail elsewhere¹⁵³. Briefly, tsA201 cells (provided by R. Horn, Jefferson Medical College, PA, USA) were maintained at a 70-80% confluency in minimal essential medium with Earle's salts, 2 mM glutamine and 10% fetal bovine serum supplemented with penicillin (100 units per ml) and streptomycin (100 µg per ml). After plating at low density (2×10^4 cells per ml) on 35 mm plastic dishes coated with poly-D-lysine, cells were transfected with the cDNAs encoding the human GABA_A receptor subunits in a 1:1:2 ratio ($\alpha 1$: $\beta 2$: $\gamma 2$), using the calcium phosphate technique as previously described¹⁵³. For analysis of the mutant subunits, the cDNAs encoding for the $\alpha 1$ (A322D), $\alpha 1$ (K353delins18X), $\alpha 1$ (D219N) and $\gamma 2$ (P83S) replaced the corresponding wildtype subunits. The cDNA for enhanced green fluorescent protein (EGFP S65T mutant) was routinely co-transfected (0.1 µg per dish) to identify transfected cells.

3.2.3.10 Electrophysiological Solutions and Techniques

Experiments were performed 24 – 48 hours after transfection. γ -amino-butyric acid (GABA, Sigma) was dissolved in external solution containing (in mM): 150 NaCl, 5 HEPES, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂ and 2% phenol red. Internal pipette solution contained (in mM): 150 KCl, 5 EGTA, 1 MgCl₂ and 2 MgATP. The pH and osmotic pressure of internal and external solutions were adjusted to 7.3 – 7.4 and 310 mOsm respectively. For Zn²⁺-block experiments, ZnCl₂ (Sigma) was diluted to a 10 µM final concentration in control and agonist external recording solutions from 10 mM frozen stocks. Diazepam was diluted to a 1 µM final concentration in control and agonist external recording solutions from 1 mM frozen stocks. All recordings were performed with an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Inc., CA) using thin-walled borosilicate glass pipettes (2-5 M Ω) coated with dental wax to reduce

electrical noise. Control and agonist solutions were rapidly applied to outside-out patches excised from transfected tsA201 cells using a piezoelectric stack (Physik Instrumente). Solution exchange (10-90 % rise-time = 150-250 μ s) was routinely determined at the end of each experiment by measuring the liquid junction current (or exchange current) between the control and external solution containing an additional 10 mM NaCl. Current records were filtered at 5 kHz, digitized at 25 kHz and series resistances (3-10 M Ω) compensated by 95 %. All recordings were performed at a holding potential of -60 mV. Data acquisition was performed using pClamp9 software (Molecular Devices, Inc., CA) and analysis and statistics were performed using Microsoft Excel. All dataset reported in this study exhibited a normal distribution as determined by the Shapiro-Wilk normality test which p-values greater than 0.05. Figure illustrations were made using Origin 7.0. All experiments were carried out at room temperature (22 – 23 $^{\circ}$ C). For whole-cell recordings, control and agonist solutions were locally applied to the recorded cell.

3.2.4 Results

3.2.4.1 Identification of mutations in the *GABRA1* and *GABRG2* genes

We have identified three novel genetic mutations in the alpha1 (α 1) and gamma2 (γ 2) subunits of the GABA_A receptor (Fig. 1). The amino acid numbering for these mutations refers to the immature protein including the signal peptide. Screening the *GABRA1* gene identified two variants, the first of which was an insertion of 25 nucleotides in the intron close to the splice acceptor site of exon 11 (Fig. 2A). The exact sequence of the insertion has been obtained by subcloning the PCR fragment of the mutated allele in a TOPO-cloning vector (Invitrogen). This 25 bp insertion in the genomic sequence of *GABRA1* (g.chr5:161256674_161256675ins25) changes the position of the putative branch site to a distance of 63 bp of exon 11. The maximal distance between the splice acceptor and the branch sites is usually between 20 and 50 bp¹⁵⁴. We therefore hypothesized that this mutation prevents cleavage at the 3' end of intron 10 (Fig. 2A). Consistent with this hypothesis, RT-PCR of the A-III-01 individual has shown a 1242 bp insertion which correspond to the

retention of intron 10 (r.1059_1060ins1242). This splice mutation, which results in a complex rearrangement of the *GABRA1* transcript, predicts a deletion of the fourth transmembrane domain in the mature α_1 protein, as well as the insertion of 18 amino acids and a premature stop codon (p.K353delins18X) (Fig. 2B). A total of three affected members from this family carry this K353delins18X mutation in *GABRA1*, as well as an obligated carrier (Fig. 1A). The second α_1 variation was due to a missense mutation in the aspartic acid 219 residue to an asparagine (i.e. D219N) which was detected in 4 out of 5 affected individuals with either IGE or febrile seizures in pedigree B (Fig. 1B). Sequence analysis indicated that carriers are heterozygous with respect to a G>A substitution, which is predicted to change an aspartic acid to an asparagine at position 219 of the α_1 GABA_A receptor subunit. The K353delins18X and D219N mutations were not detected in 190 healthy controls (102 females and 88 males) nor were additional variations in *GABRA1* detected.

We also detected a missense mutation in the γ_2 GABA_A receptor subunit which changed the proline 83 residue of the immature protein to a serine (i.e. P83S, Fig. 1C), in a large family exhibiting febrile seizures and IGE over 3 generations. This Pro83Ser mutation was found in all affected individuals (n=9) of this multiplex family (Fig. 1C). The heterozygous mutation Pro83Ser is found near a region which affects benzodiazepine binding on the extracellular ligand-binding domain (Goldschen-Ohm et al, 2010). Importantly, this mutation was not identified in the 190 French Canadian control subjects. In addition, no other additional mutations in *GABRG2* gene were detected in this cohort of IGE patients.

In silico analysis, using a combination of four different programs (*PolyPhen*, *SIFT*, *SNAP*, *PANTHER*), predicts that the P83S mutation should have a damaging effect on protein structure or function whereas the D219N in α_1 is predicted to have a benign outcome (Table 1).

3.2.4.2 Subcellular distribution of mutant and wildtype GABA_A receptors

Prior work has shown that other GABA_A receptor mutations associated with IGE can affect the cellular distribution of the mature protein¹³⁵. In many cases, the mutant receptor is

held up in the endoplasmic reticulum (ER) and/or exhibits reduced surface expression (Macdonald et al, 2010). To explore both of these issues, we examined the subcellular distribution of mutant $\alpha 1$ subunits that had been co-expressed with wildtype $\beta 2$ and $\gamma 2$ subunits (Figs. 3 and 4). As controls, we compared the staining pattern of the wildtype $\alpha 1$ subunit which traffics normally and the $\alpha 1$ A322D mutant which accumulates in the ER and exhibits reduced plasma-membrane surface expression^{41,125,152}. Since antibody recognition for the Myc-tagged $\gamma 2$ GABA_A receptor subunit was variable, we focused only on examining its functional properties using electrophysiology (see below). Myc-tagged constructs of wildtype and mutant $\alpha 1$ subunits were expressed in HEK293 cells and visualized with a fluorescent tagged Myc antibody (Figs. 3 and 4). ER localization was then estimated by overlaying the $\alpha 1$ subunit staining pattern with that of dsRed2-ER as a selective marker of this organelle (Fig. 3). Surface expression levels were determined in a similar manner using red-fluorescent pan-cadherin as a marker of the plasma membrane (Fig. 4).

As expected, there was little overlap in the staining pattern for the wildtype $\alpha 1$ subunit and that of the ER (Fig. 3, left column) whereas the distribution of the $\alpha 1$ A322D mutant co-localized almost exclusively with dsRed2-ER (Fig. 3, middle column) in agreement with prior work showing that this subunit is retained within the cell during protein synthesis and assembly. The staining pattern for the $\alpha 1$ K353delins18X also closely matched that of dsRed2-ER (Fig. 3, middle) whereas there was only partial but substantial overlap in the distribution of the $\alpha 1$ D219N mutant (Fig. 3, right column) indicating that some of this latter mutant protein may be trafficked to the surface of the plasma membrane. In support of this, the pattern of expression of both pan-cadherin and $\alpha 1$ D219N mutant were similar and comparable to the wildtype $\alpha 1$ subunit (Fig 4A, left and right columns). In contrast, the staining pattern of pan-cadherin did not match that of $\alpha 1$ K353delins18X or $\alpha 1$ A322D subunits (Fig. 3, middle columns) further confirming that these mutations disrupt plasma membrane surface expression.

To examine more subtle defects in the targeting of the mutant subunits to the plasma membrane, we used cell surface biotinylation and Western blotting to quantify and compare surface

expression of the mutants to wildtype subunits. To do this, HEK293 cells transfected with wildtype and mutant GABA_A receptors were surface biotinylated with the non-membrane permeable reagent Sulfo-NHS-SS-Biotin and biotinylated surface expressed proteins recovered from the soluble lysate fraction (i.e L) by affinity purification (i.e. M) (Fig. 4B). The un-bound or non-biotinylated fraction present in the supernatant (i.e. S) was also analysed as it represents the proportion of receptor subunits that are retained intracellularly. As expected of controls, the wildtype α 1 subunit was found in both the membrane (M) and supernatant (S) fractions whereas the α 1 A322D mutant was largely restricted to the supernatant (Fig.4B, left and middle columns). Likewise, the K353delins18X mutant was also absent from the membrane fraction and although it was detected in the supernatant, the band migrated at a lower molecular weight (Fig.4B, middle column). This finding is consistent with the prediction that this mutation introduces a premature stop codon which truncates the fourth transmembrane domain of the mature α ₁ protein. Although we were not able to detect the α 1 A322D mutant and K353delins18X in the membrane fraction, it does not exclude the possibility that a small number of receptors were expressed at the plasma membrane. In contrast, the α 1 D219N mutant was detected in both the membrane and supernatant fractions (Fig.4B, right column) in agreement with the staining studies. Compared to the wildtype α 1 subunit, there was a 50% decrease in the ratio of surface to total expression of the α 1 D219N mutant ($P = 0.0013$, Student's *t*-test).

3.2.4.3 Functional analysis of mutant α 1 and γ 2 GABA_A receptor subunits

To measure the functionality of surface receptors, we performed electrophysiological recordings on outside-out patches excised from tsA201 cells transiently transfected with wildtype and mutant GABA_A receptor subunits (Fig. 5). Following activation, GABA_A receptors exhibit rapid desensitization kinetics with a time course of tens of milliseconds¹⁵⁵. Consequently, the advantage of performing experiments on excised membrane patches is that it permits rapid exchange of agonist solution (within 400-500 μ s) prior to the onset of desensitization and therefore peak response amplitude and decay kinetics are determined with accuracy.

Typical membrane currents elicited by 10 mM GABA on wildtype or mutant GABA_A receptors are shown in figure 5A. Note that peak responses of wildtype $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ receptors were considerably larger than $\alpha_1\beta_2$ assemblies (Fig. 5A, upper row); an observation expected from earlier work highlighting the importance of subunit composition to agonist responsiveness (e.g. Boileau et al., 2003; Verdoorn et al., 1990^{156,157}). Likewise, patches containing $\alpha_1(A322D)\beta_2\gamma_2$ receptors elicited much weaker responses to GABA (Fig. 5A, middle row) which is consistent with their reduced surface expression (Fig. 4) and lower agonist sensitivity (Krampfl et al, 2005). We failed to detect responses in any excised patches from cells transfected with the α_1 K353delins18X subunit (Fig. 5A, middle row). The lack of responsiveness in excised patches is not due to detection failure since cells did not respond to GABA even in recordings performed in the whole-cell configuration (Fig. 6). Taken together with our staining and biochemical experiments, we conclude that the K353delins18X mutation completely eliminates surface expression of mature GABA_A receptors, an observation supported by the fact that the α -subunit is required for the formation of functional receptors¹⁵⁸.

In contrast, we routinely recorded GABA-mediated responses from the cells expressing the α_1 D219N and the γ_2 P83S subunit mutations (Fig. 5A, lower row). The level of surface expression of α_1 D219N containing receptors, as estimated by peak response amplitude, was modest compared to wildtype $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ receptors (Fig. 5B). Although reduced functionality may reflect changes in unitary conductance or agonist affinity/efficacy, much of it most likely reflects a genuine deficit in the delivery of mature GABA_A receptors to the cell's surface in agreement with immunohistochemical staining and Western blot analysis (Fig. 4A and B). Interestingly, peak membrane currents elicited by GABA at receptors containing the γ_2 P83S subunit were indistinguishable from wildtype $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ receptors (Fig. 5A and B). Since peak responses of γ_2 P83S containing receptors were substantially larger than wildtype $\alpha_1\beta_2$ receptors (Fig. 5B), we tentatively concluded that this mutation does not affect the incorporation of γ_2 subunits into mature GABA_A receptors (see below). Finally, although the degree of equilibrium desensitization was similar for wildtype $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ receptors compared to those containing the α_1 D219N or γ_2 P83S subunits (Fig. 5B, Table 2), we did observe a statistically significant difference between wildtype $\alpha_1\beta_2$ receptors (n = 22 and 4 patches for

wildtype and $\alpha_1\beta_2$ respectively, $P = 0.0013$, Student's t -test, Fig. 5B) which has been reported by others¹⁵⁶.

3.2.4.4 α_1 D219N mutation alters GABA_A receptor gating kinetics

Structural modeling of the pentameric GABA_A receptor¹¹⁰ places Asp219 at the interface of the α_1 and β_2 subunits (Fig. 7A) based on homology with the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor¹⁵⁹ (Fig. 7B). Given that this interface is important for agonist binding and gating¹⁶⁰, we examined whether replacement of the positively-charged Asp residue with a neutral Asn affects re-equilibration rates following agonist application (i.e. macroscopic desensitization) or removal (i.e. off-kinetics) (Fig. 7C and D). To do this, each experimental trace was fit with two to three exponential components to estimate desensitization and off-kinetics (Fig. 7 and Table 2). For comparison, we also fit agonist responses mediated by wildtype $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ receptors and receptors containing the γ_2 P83S subunit.

Typical responses to GABA (1 – 10 mM) in patches containing wildtype or mutant receptors are shown as overlays in figure 7C and D. In all cases, rates into desensitization were fit with either 2 or 3 time constants whereas most off-kinetic relaxations were well described by bi-exponential functions (Table 2). Since fit values of the fastest ($\tau \sim 1.3 - 2.8$ ms) and slowest ($\tau \sim 93 - 287$ ms) desensitization time constants were almost identical in all recordings, the occurrence of an intermediate time constant ($\tau \sim 14 - 21$ ms) determined whether a third exponential component was included in the fit (Table 2). The biological basis of this intermediate component is not clear, however, prior work on native and recombinant GABA_A receptors has noted variability in desensitization kinetics (e.g. Celentano and Wong, 1994¹⁶¹). Since we were able to exclude the possibility of variable proportions of $\alpha_1\beta_2$ and $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ receptors in excised patches (see below), the distinct kinetic components of desensitization presumably correspond to an intrinsic property of the channel, perhaps modal gating¹⁶².

Desensitization rates and off-kinetics of GABA_A receptors containing the α_1 (D219N) subunit were appreciably faster than wildtype receptors and those containing the γ_2 P83S subunit (Fig.

7C and D and Table 2). In contrast with the off-kinetics in wild-type patches, most of the off-kinetics for the $\alpha 1$ D219N-containing patches (7/9 patches) were fit with 3 exponentials. Interestingly, the slowest component of desensitization has a larger contribution than in wild-type receptors (Table 2).

3.2.4.5 $\gamma 2$ P83S mutation does not alter Zn^{2+} or benzodiazepine sensitivity

The expression levels (Fig. 5) and kinetic properties (Fig. 7) of GABA_A receptors containing the $\gamma 2$ P83S subunit were indistinguishable from wildtype $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ receptors. To examine whether replacement of Pro83 with Ser affects the allosteric regulation of GABA_A receptors, we examined their responsiveness to two known modulators, Zn^{2+} and the benzodiazepine, diazepam, both of which are known to be dependent on the $\gamma 2$ subunit. For example, co-assembly with the $\gamma 2$ subunit greatly diminishes sensitivity to Zn^{2+} block¹⁶³ by disrupting some of its binding sites¹⁶⁴. Likewise, benzodiazepine potentiation of GABA-mediated responses is also $\gamma 2$ subunit-dependent as it establishes a binding site at the interface with the α -subunit¹¹⁰.

To examine Zn^{2+} sensitivity, block of 1 mM GABA-evoked responses by 10 μ M $ZnCl_2$ was monitored in patches containing wildtype $\alpha 1\beta 2$ or $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ receptors which were compared with responses elicited by $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (P83S) receptors (Fig. 8A). On average, Zn^{2+} reversibly antagonized $\alpha 1\beta 2$ receptors by 86 ± 1 % (n = 4 patches) whereas block of responses mediated by $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (P83S) receptors was much smaller (wildtype, 13 ± 4 % (n = 6 patches) and P83S mutant, 13 ± 2 % (n = 10 patches)) ($P < 0.0001$, one-tailed Student's *t*-test, Fig. 8B). Likewise, diazepam sensitivity was similar between $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (P83S) receptors (Fig. 9B and C). For example, although responses mediated by $\alpha 1\beta 2$ receptors in 1 μ M diazepam were unchanged (n = 3 patches), responses mediated by $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (P83S) receptors were potentiated by 20 ± 2 % and 22 ± 2 % respectively (n = 5 patches each, $P < 0.0001$, Student's paired *t*-test, Fig. 9B and C). The decrease in $\alpha 1\beta 2$ receptors responses is most likely a consequence of time-dependent response rundown which probably leads to an underestimation of the potentiation of $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (P83S) receptors by diazepam. The summary plot in figure 9D reveals that there is a relationship between Zn^{2+} and diazepam

sensitivity for the different GABA_A receptors we have tested. $\alpha 1\beta 2$ receptors were sensitive to Zn²⁺ block but insensitive to diazepam potentiation (blue squares). In contrast, wildtype $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ receptors and those containing the mutant $\gamma 2$ subunit (black circles and red triangles respectively) were resistant to block by Zn²⁺ but potentiated by diazepam. Taken together, these findings demonstrate that $\gamma 2$ P83S mutation does not affect GABA_A receptor sensitivity to Zn²⁺ or diazepam.

3.2.5 Discussion

Here we report the identification of 3 novel mutations in two GABA_A receptor subunits found in patients with IGE and febrile seizures. The clinical manifestations observed in family C with the P83S mutation in *GABRG2* consist in a combination of febrile and absence seizures. This observation is consistent with the phenotype reported in other families with *GABRG2* mutations⁵⁸. So far, reports on mutation in *GABRA1* are limited to one family with juvenile myoclonic epilepsy⁴¹ and a single individual with childhood absence epilepsy¹²⁵. In contrast, family B with the D219N mutation in *GABRA1* exhibit mainly febrile seizures, with or without generalized tonic-clonic and absence seizures. Family A with the K353delins18X rather exhibits late onset, afebrile, generalized tonic-clonic seizures as well as photosensitivity. Compared to *GABRG2*, febrile seizures thus seem to be less consistently associated with *GABRA1* mutations.

Mutations in the *GABRA1* gene, K353delins18X and D219N, segregate into two unrelated French Canadian families and were associated with disrupted plasma membrane delivery of mature protein as well as signaling deficits in the GABA_A receptor. These mutations would be expected to reduce the strength of inhibitory transmission in neuronal circuits and, as a result, predispose the carrier to seizures; a line of reasoning consistent with other studies purporting a prominent role of mutant GABA_A receptors in IGE^{135,140}. In contrast, we failed to identify any noticeable functional defect in the non-synonymous mutation P83S of the *GABRG2* gene. This observation is surprising as all other IGE-associated GABA_A receptor mutants described to date exhibit defective behavior^{135,140}. Considering its high degree of penetrance in three

generations of a large extended French Canadian family, significant conservation across species (suppl. Fig.1), as well as its absence in control chromosomes all suggest that P83S is a real mutation and not a misclassified single nucleotide polymorphism. Whether this mutation disrupts a more nuanced aspect of GABA_A receptor signalling, such as may occur at the axon initial segment¹⁶⁵ or exhibits temperature sensitivity¹⁶⁶ will require further experimentation.

3.2.5.1 Comparison with previous studies

Prior work has catalogued a total of 16 IGE-related variants in both translated and untranslated regions of GABA_A receptor genes¹³⁵. Although the specific molecular effects associated with each mutation can vary significantly from affecting mRNA transcript stability to disruption of channel gating¹³⁵, their overall predicted effect at the level of the neuronal circuit is to undermine inhibition imposed by GABA_A receptors. Consistent with this, electrophysiological experiments revealed that the kinetic properties of receptors assembled with the $\alpha 1$ D219N subunit are faster. Interestingly, the equivalent residue in the Torpedo nAChR is also negatively-charged, but in this case a Glu which is thought to form an electrostatic interactions with the adjacent Arg¹⁵⁹. If the $\alpha 1$ GABA receptor subunit adopts a similar structural arrangement, we would predict that this electrostatic interaction is established between Asp219 and Lys247 (Fig. 7B). Replacement of Asp219 with an Asn would reduce the strength of this interaction and therefore may account for the accelerated GABA_A receptor kinetics observed in our experiments.

The K353delins18X frameshift mutation alters the downstream amino acid sequence and results in the introduction of a premature translation-termination codon. This results in a truncation of the fourth transmembrane domain of the subunit and its retention in the ER (Figs. 3 and 4). Other frameshift mutations in the coding sequence of *GABRA1* have been reported (975delC and S326fs328X)¹⁶⁷. Kang and colleagues suggest that premature translation can produce mRNA degradation through the activation of molecular pathways such as nonsense-mediated decay and reduced mutant $\alpha 1$ subunit mRNA. Because the $\alpha 1$ subunit is essential for the formation of functional GABA_A receptors, a decrease in this subunit will also result in a decrease in surface GABA_A receptors¹⁵⁸. In an intact neuronal system, the two novel *GABRA1*

mutants, D219N and K353delins18X, could prove to be deleterious by causing an imbalance between excitation and inhibition. A decrease in function or expression could also lead to haploinsufficiency if the intact allele is not sufficient to produce the wildtype phenotype.

3.2.5.2 The paradox of the γ 2 P83S subunit mutant

The GABA_A receptor γ 2 subunit fulfills a number of roles including the clustering of receptors and postsynaptic recruitment of the scaffolding protein, gephyrin¹⁶⁸ as well as determining sensitivity to allosteric modulators, such as Zn²⁺ and benzodiazepines¹⁶⁰. The binding site for benzodiazepines occurs at the interface between α ₁ and γ ₂^{169,170} whereas the γ ₂/ β ₂ subunit interface is the location of the γ ₂ R82Q mutation that is implicated in childhood absence epilepsy and febrile seizures³⁹. Since GABA_A receptors containing the R82Q mutation exhibit altered kinetics and reduced benzodiazepine sensitivity (via a long-distance effect) as well as defective trafficking^{166,171,172}, we anticipated a marked phenotype for the adjacent P83S mutant. Instead, we failed to observe any defective behaviour in terms of functional expression levels or sensitivity to benzodiazepines or Zn²⁺. Given this, we conclude that Pro83 does not participate in the stability of the salt-bridge proposed to be a critical determinant of benzodiazepine efficacy¹⁷². It would be interesting in future experiments to determine whether an appreciable phenotype can be assigned to the P83S mutant when GABA_A receptors are assembled from β ₁ or β ₃ subunits rather than the β ₂ subunit used in the present study.

3.2.5.3 Working towards the molecular basis of idiopathic generalized epilepsy

Although the cause of the common idiopathic generalized epilepsy syndromes is unknown, there are increasing examples of familial cases that are genetic in origin¹³⁶, most likely involving several interacting factors. It has also been proposed to represent a “channelopathy” given the preponderance of genetic defects found in ion-channels expressed by individuals with familial IGE¹³³⁻¹³⁷. Understanding the molecular basis of IGE, as it relates to the GABA_A receptor, also needs to take into account the effect of genetics on the susceptibility of individual neuronal cell types and their neuronal circuits as has emerged from

studying Nav1.1 channels in epilepsy¹³³. By comparing the phenotypic properties of homozygous null or heterozygous Nav1.1 mice, several groups have noticed that lesions in the hippocampal circuit primarily affect the excitability of GABAergic interneurons, which control circuit inhibition, whilst having little or no effect on the firing properties of the excitatory pyramidal cells^{173,174}. In other words, although all neuronal cell types either lack or have reduced Nav1.1 signaling in either null or heterozygous mice respectively, the defect almost exclusively affects GABAergic interneurons; an observation that could not have been appreciated from genetic studies alone.

A similar strategy to examine the GABA_A receptor γ 2 subunit mutant, R82Q, which is associated with familial childhood absence epilepsy, has also led to unexpected insights. Here, the onset of seizures in heterozygous mice occurs abruptly during development (around postnatal day 20) as occurs in the human condition¹⁷⁵. In support of this, seizure susceptibility was significantly reduced when expression of the γ 2 (R82Q) subunit was delayed until after development¹⁷⁶ confirming that the onset of symptoms is dependent on a critical period. Interestingly, more recent work shows that unlike its wildtype counterpart, the γ 2 (R82Q) subunit is excluded from the axon initial segment¹⁶⁵; the site of action potential initiation in neurons¹⁷⁷. Clearly, further insight into the three novel GABA_A receptor mutants described in this study will require careful consideration of how they disrupt neuronal circuit behavior, from an appreciation of their developmental expression pattern to their distribution within distinct populations of neurons.

ACKNOWLEDGEMENTS: This work was supported by operating grants to Drs. Bowie and Cossette from the Canadian Institutes for Health Research as well as the Savoy Foundation. P. Brown is supported by a Masters fellowship from the FRSQ and P. Lachance-Touchette is supported by a doctoral fellowship from the Savoy Foundation. D. Bowie is the recipient of the Canada Research Chair award in Receptor Pharmacology. We would like to thank all the families and patients who participated in this study. We are grateful to Josée Poirier for performing DNA extraction and participating in the sequence and data analysis and Micheline Gravel for assisting in the collection of blood samples. We are grateful to members of the Bowie lab for providing a thoughtful critique of the manuscript and special thanks to Mark Arousseau for discussions on the use of the homology models.

3.2.6 Tableaux et figures

Tableau 3.2.6.1. Table 1. Mutations identified in GABA_A receptor genes

Gene	Nucleotide (genomic)	Nucleotide (mRNA)	Amino Acid (protein)	Maif	PSIC score	Polyphen Prediction	score Prediction	SIPT Prediction	score Prediction	SNAP Prediction	ambPSIC	Panther Predictions	Conservation (amino acid)
GABRA1	g.chr5:161242237G>A	r.653G>A	p.D219N	0.01	0.787	Benign	0.33	Tolerated	89%	Neutral	-4.8313	0.86192	Highly conserved
GABRA1	g.chr5:161256674_161256675ins25	r.1059_1060ins1242	p.K353delins18X	0.01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
GABRG2	g.chr5:16145351C>T	r.247C>T	p.P83S	0.01	1.982	Possibly damaging	0.00	Affect protein function	70%	Non-neutral	-5.58712	0.93003	Highly conserved

Tableau 3.2.6.2. Table 2. Desensitization and off-kinetics of WT and mutant GABA_A receptors

Components	Receptor	Desensitization (ms)				Off-Kinetics (ms)			
		t fast ± s.e.m. (%)	t intermediate ± s.e.m. (%)	t slow ± s.e.m. (%)	n	t fast ± s.e.m. (%)	t intermediate ± s.e.m. (%)	t slow ± s.e.m. (%)	n
2	α1β2γ2	2.8 ± 0.4 (49)	n/a ± n/a	163 ± 39 (51)	13	27 ± 0 (40)	n/a ± n/a	206 ± 26 (60)	21
	α1(D219N)β2γ2	2.2 ± 0.2 (43)	n/a ± n/a	143 ± 52 (57)	4	6 ± 4 (34)	n/a ± n/a	58 ± 6 (66)	2
	α1β2γ2(P83S)	2.3 ± 0.8 (43)	n/a ± n/a	93 ± 36 (57)	5	34 ± 8 (32)	n/a ± n/a	212 ± 38 (69)	7
3	α1β2γ2	2.4 ± 0.2 (41)	14 ± 2 (22)	279 ± 82 (37)	9	27 ± 0 (17)	70 ± 0 (73)	285 ± 0 (10)	1
	α1(D219N)β2γ2	1.3 ± 0.4 (19)	9 ± 4 (35)	121 ± 22 (46)	5	2.3 ± 0.4 (21)	26 ± 4 (42)	146 ± 18 (37)	7
	α1β2γ2(P83S)	2.4 ± 0.4 (36)	21 ± 5 (31)	287 ± 92 (33)	5	8 ± 2 (4)	66 ± 5 (41)	380 ± 102 (55)	3

Figure 3.2.6.3. Figure 1. Segregation profiles of the novel GABA_A receptor mutants in French Canadian families affected with IGE and related phenotypes

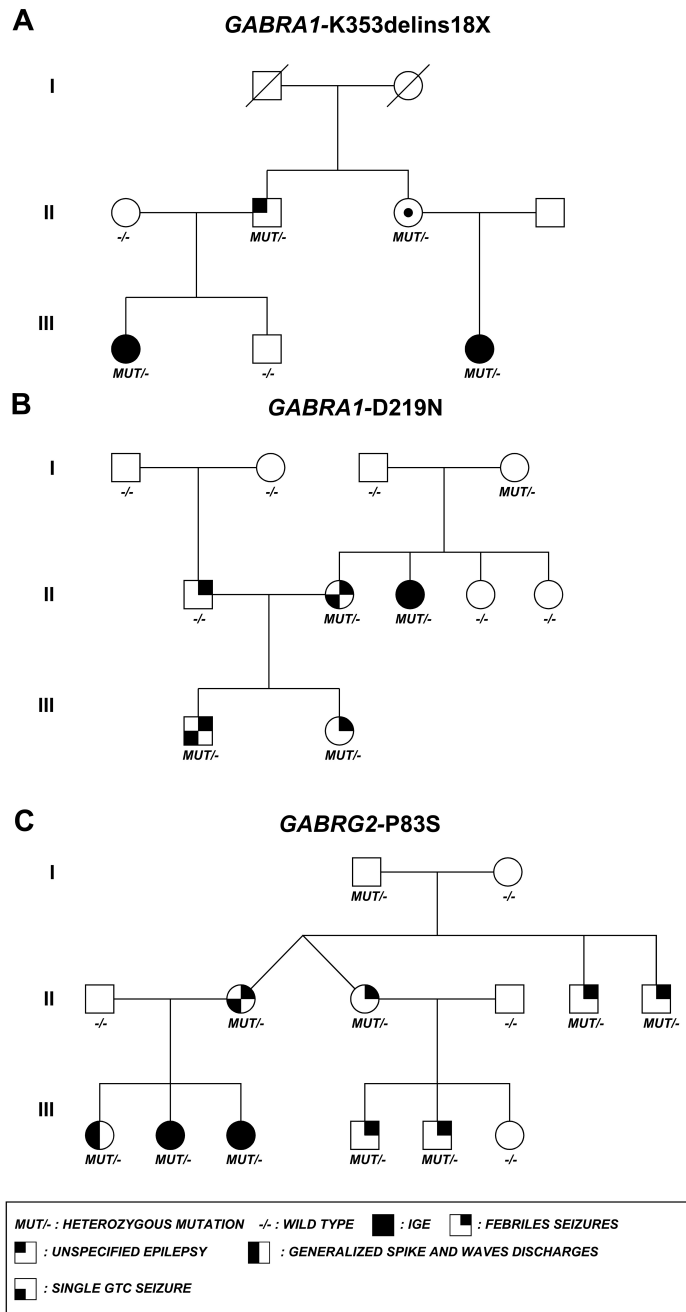


FIG. 1. Segregation profiles of the novel GABA_A receptor mutants in French Canadian families affected with IGE and related phenotypes. A and B. The K353delins18X (A) and

D219N (B) mutations in *GABRA1* were found in four individuals of the same family over 2 generations. C. The P83S mutation in *GABRG2* was found in 9 individuals of the same family over 2 generations. Blackened symbols indicate affected individuals.

Figure 3.2.6.4. Figure 2. Sequencing of the K353delins18X mutation in *GABRA1*



Fig. 2. Sequencing of the K353delins18X mutation in *GABRA1*. A. The normal and mutant alleles were amplified by PCR, sub-cloned in a TOPO-cloning vector (Invitrogen) and sequenced separately. The mutation consists of a 25bp insertion located between the splice

acceptor and branching sites of exon 11 of the *GABRA1* gene. RT-PCR shows an abnormal upper band; sequencing of this band confirmed the retention of the intron leading to a premature stop codon. **B.** The amino acid sequence of the wildtype (top) and mutant (bottom) GABA_A receptor. The mutation results in the translation of 18 intronic amino acids and a premature stop codon (red) and the deletion of 103 amino acids.

Figure 3.2.6.5. Figure 3. Mutant $\alpha 1$ subunits co-localize with the endoplasmic reticulum (ER)

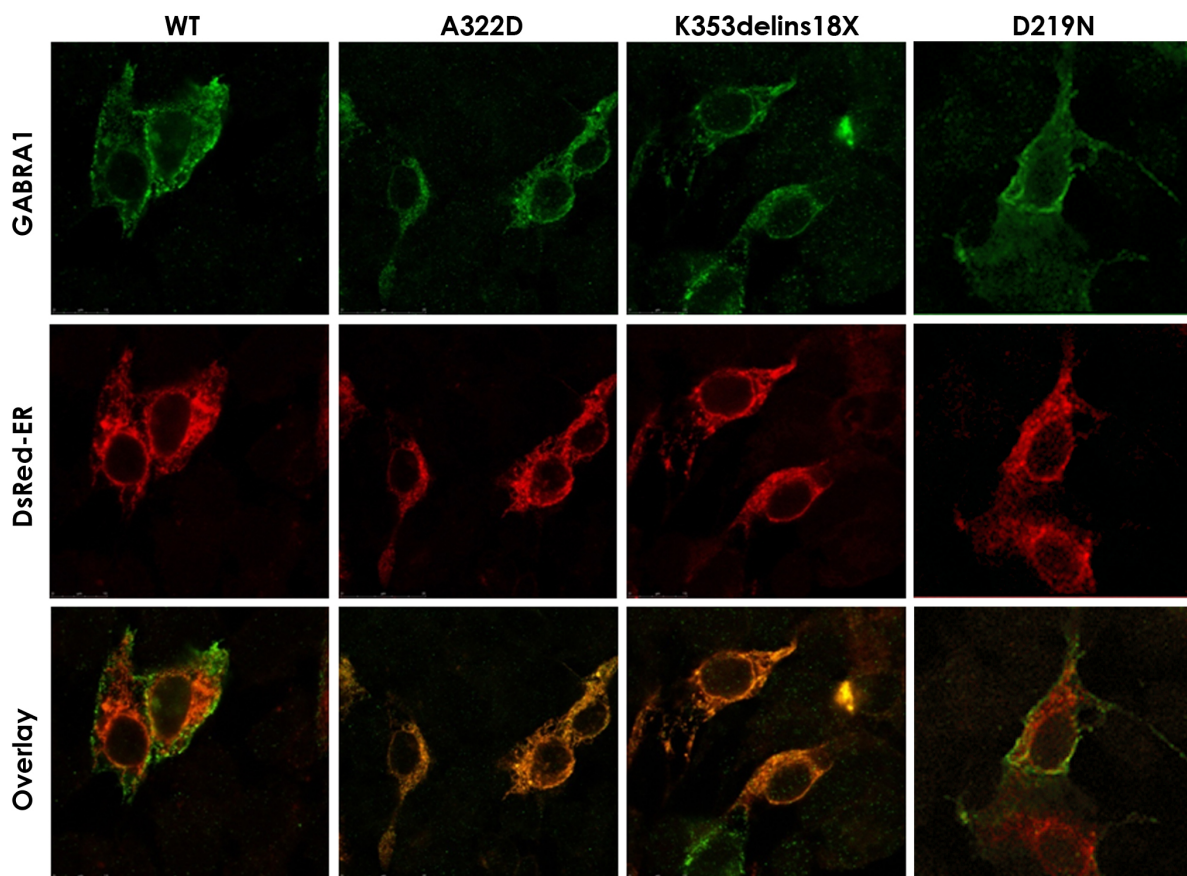


FIG. 3. Mutant $\alpha 1$ subunits co-localize with the endoplasmic reticulum (ER). Immunostaining of the wildtype *GABRA1* subunit does not co-localize with the ER-marker, DsRed-ER (left column). In contrast, the A322D and K353delins18X *GABRA1* mutants co-localize with the ER (middle columns), suggesting that the mutant subunits are retained in the ER and therefore do not reach the cell membrane. Staining for the D219N *GABRA1* mutant was partially co-localized with the ER.

Figure 3.2.6.6. Figure 4. Surface expression of the mutant $\alpha 1$ subunits

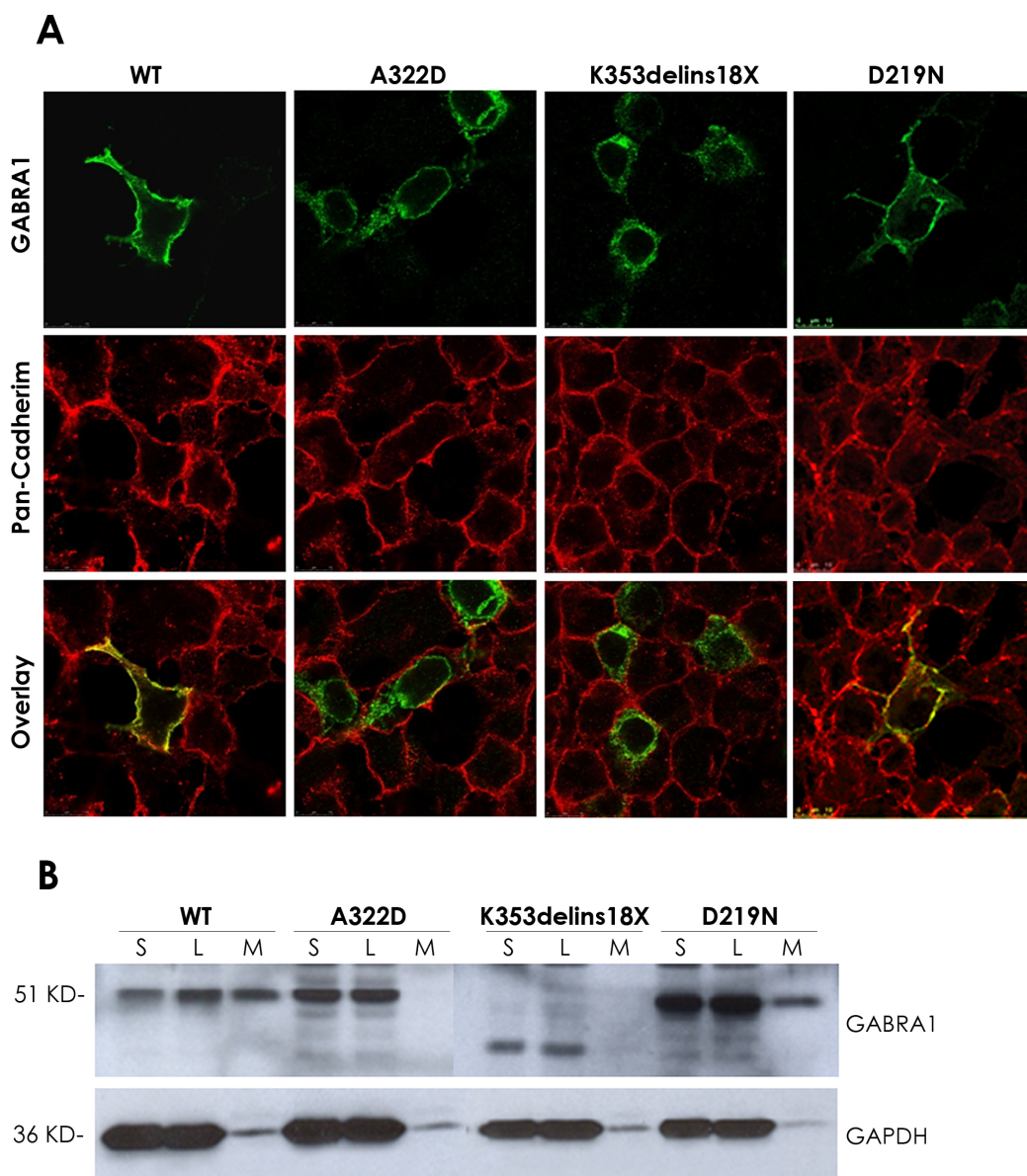


FIG. 4. Surface expression of the mutant $\alpha 1$ subunits. **A.** In contrast to the wildtype $\alpha 1$ subunit (left column), immunostaining of A322D and K353delins18X *GABRA1* mutants did not co-localize with the marker for the cell membrane (pan-cadherin, red) when co-expressed with wildtype $\beta 2$ and $\gamma 2$ subunits. Staining for the D219N *GABRA1* mutant was also partially co-localized with pan-cadherin, suggesting that there is a reduction in surface expression of this subunit. **B.** Western blot of total (L: lysate), biotinylated (M: membrane fraction) and non-

biotinylated (S: supernatant) $\alpha 1$ proteins shows a reduction of approximately 50% in the cell surface expression of the $\alpha 1$ D219N subunit. The absence of expression of the A322D and K353delins18X mutations at the cell surface is also shown. Consistent with the introduction of a premature stop codon, the K353delins18X subunit is detected at a lower molecular weight. GAPDH was used to normalize the supernatant and lysate proteins.

Figure 3.2.6.7. Figure 5. Functional profile of wild-type and mutant GABA_A receptors

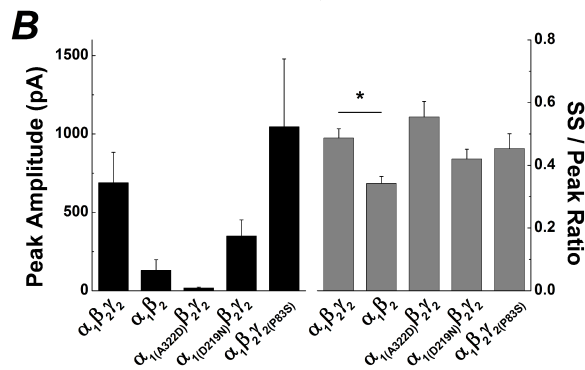
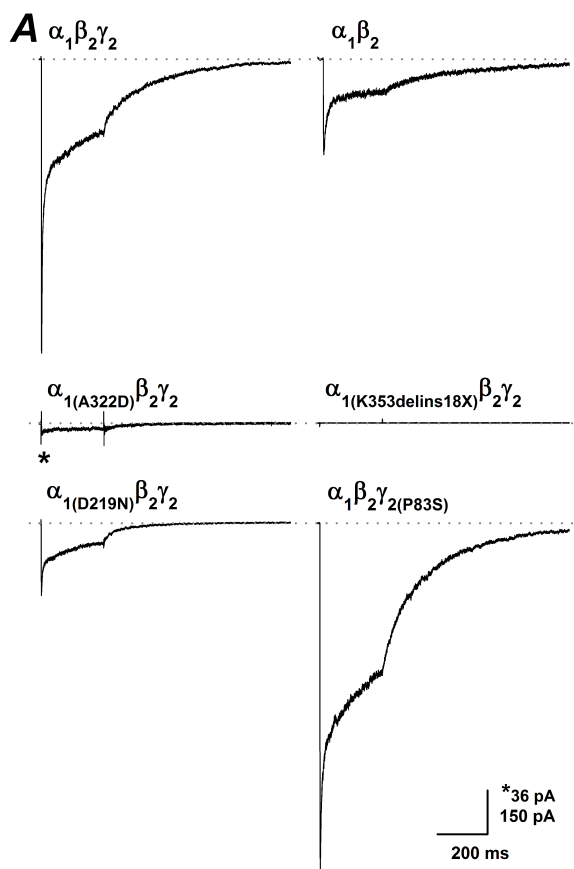


FIG. 5. Functional profile of wild-type and mutant GABA_A receptors. A. Typical electrophysiological responses elicited by 1 – 10 mM GABA in the wildtype $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (patch # 081030p1) and $\alpha_1\beta_2$ (patch # 090915p2), the α_1 A322D (patch # 081106p2), K353delins18X (patch # 081219p3) and D219N (patch # 090312p4) mutants, and in the γ_2 P83S (patch # 081219p1) mutant. **B.** The left panel illustrates the mean peak current amplitudes obtained in patches containing each of the subunit combinations. Bars indicate means; error bars indicate standard error of the mean.

Figure 3.2.6.8. Figure 6. α_1 K353delins18X –containing GABA_A receptors fail to express at the cell's surface

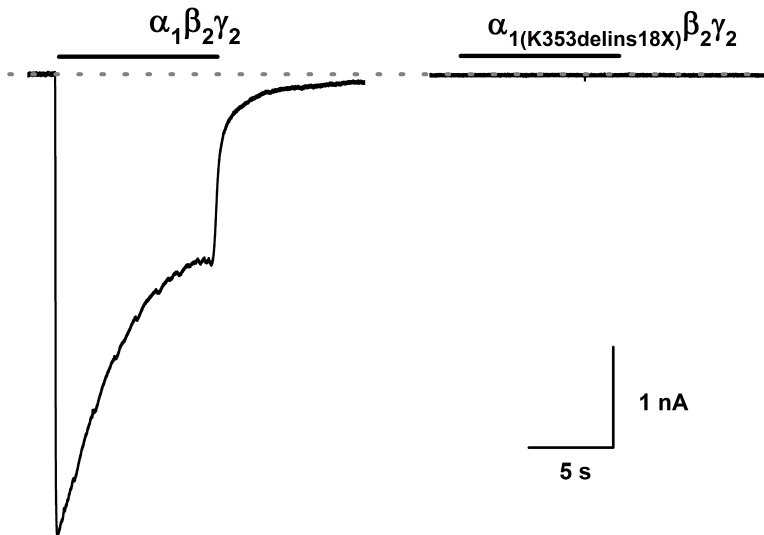


FIG. 6. α_1 K353delins18X –containing GABA_A receptors fail to express at the cell's surface. Typical whole-cell electrophysiological recordings of GABA_A receptor responses elicited by 10 second GABA applications (100 μ M) in tsA201 cells transfected with wildtype (patch # 091001c5) or α_1 K353delins18X-containing (patch # 091001c9) receptors. All recordings in wildtype and mutant receptors were performed on the same day to control for transfection efficiency. Cells were voltage-clamped at -60 mV. Black bars indicate the duration of GABA application.

Figure 3.2.6.9. Figure 7. The α_1 D219N subunit disrupts receptor re-equilibration kinetics

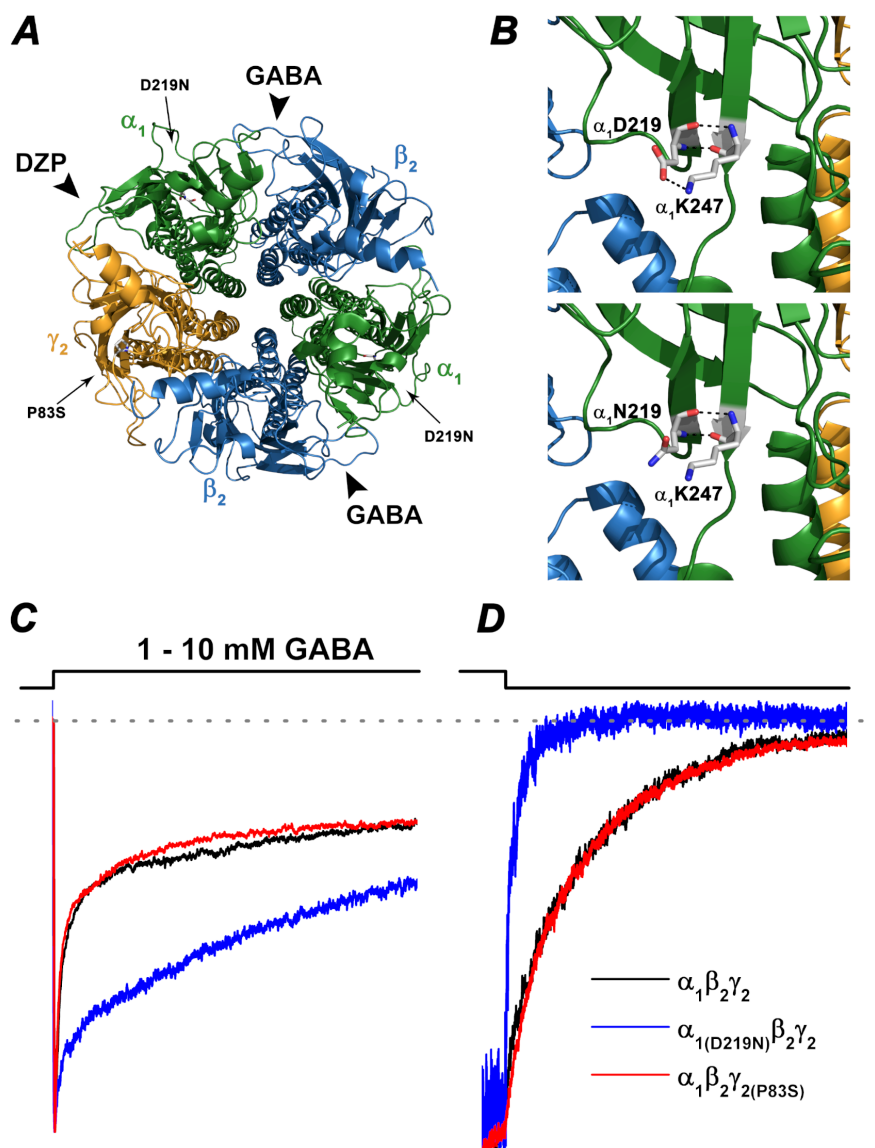


FIG. 7. The α_1 D219N subunit disrupts receptor re-equilibration kinetics. **A.** Structural model of the GABA_A receptor (Ernst et al, 2005) highlights the organization of the subunits within a pentameric complex as well as the proposed GABA and diazepam (DZP) binding sites. **B.** Panels illustrate the possible location of the D219 and N219 residues at the interface between the putative transmembrane and extracellular domains using the *Torpedo marmorata* nAChR X-ray crystal structure (Protein Data Bank (PDB) accession number 2BG9). **C.** Typical electrophysiological responses elicited by 1 – 10 mM GABA in the wildtype $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (black, patch # 081030p1), α_1 D219N (blue, patch # 081212p2) and γ_2 P83S (red, patch #

090914p2) mutants. The rates into desensitization for $\alpha 1$ D219N responses appear slower because of the increased contribution of the slow exponential component for this receptor. **D.** Typical electrophysiological recordings showing the off-kinetics in the wildtype (patch # 081030p1) and mutant ($\alpha 1$ D219N, patch # 090312p2; $\gamma 1$ P83S, patch # 090803p1) receptors.

Figure 3.2.6.10. Figure 8. The $\gamma 2$ P83S subunit assembles with wildtype $\alpha 1$ and $\beta 2$ GABA_A receptor subunits

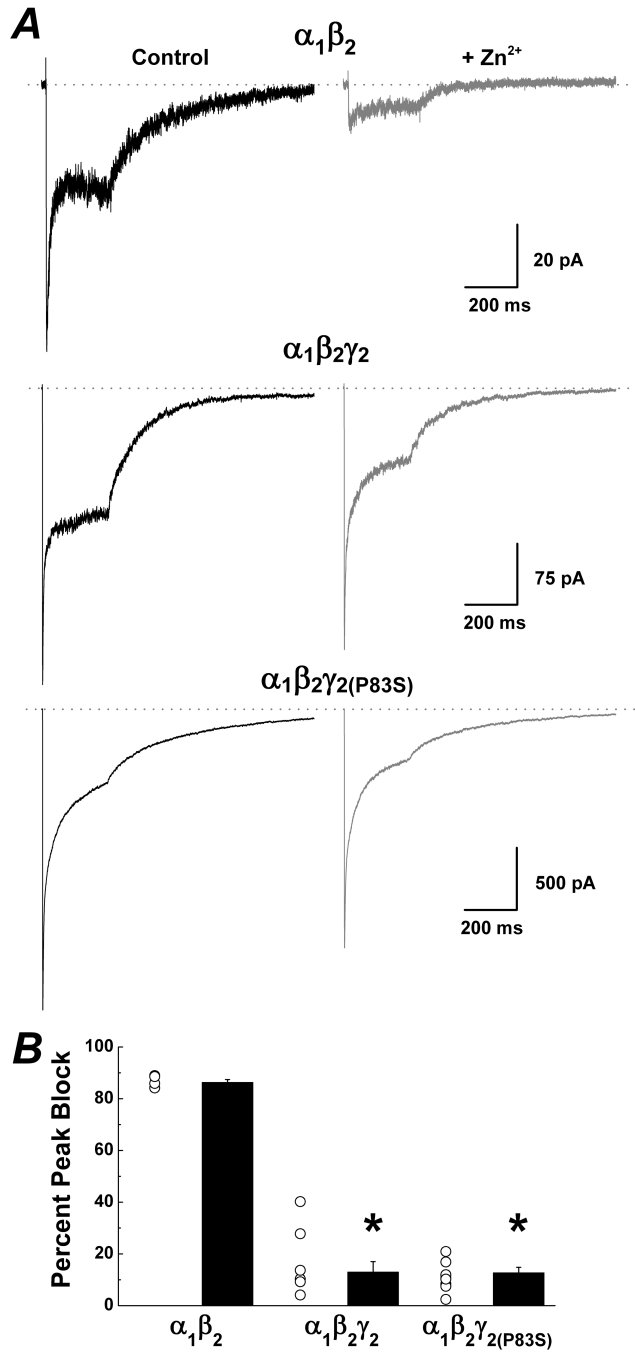


FIG. 8. The $\gamma 2$ P83S subunit assembles with wildtype $\alpha 1$ and $\beta 2$ GABA_A receptor subunits. **A.** Typical electrophysiological responses elicited by 1 mM GABA in the absence (black) or presence (grey) of 10 μM Zn²⁺ for the wildtype $\alpha 1\beta 2$ (top row, patch # 090914p1)

and $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (middle row, patch # 090721p1) receptors, as well as the γ_2 P83S containing receptors (lower row, patch # 090924p2). **B.** This panel shows the mean percentage of peak current that is blocked by $10\ \mu\text{M}\ \text{Zn}^{2+}$. Bars indicate means; error bars indicate standard error of the mean. Circles are individual data.

Figure 3.2.6.11. Figure 9. The γ_2 P83S subunit does not abolish diazepam sensitivity

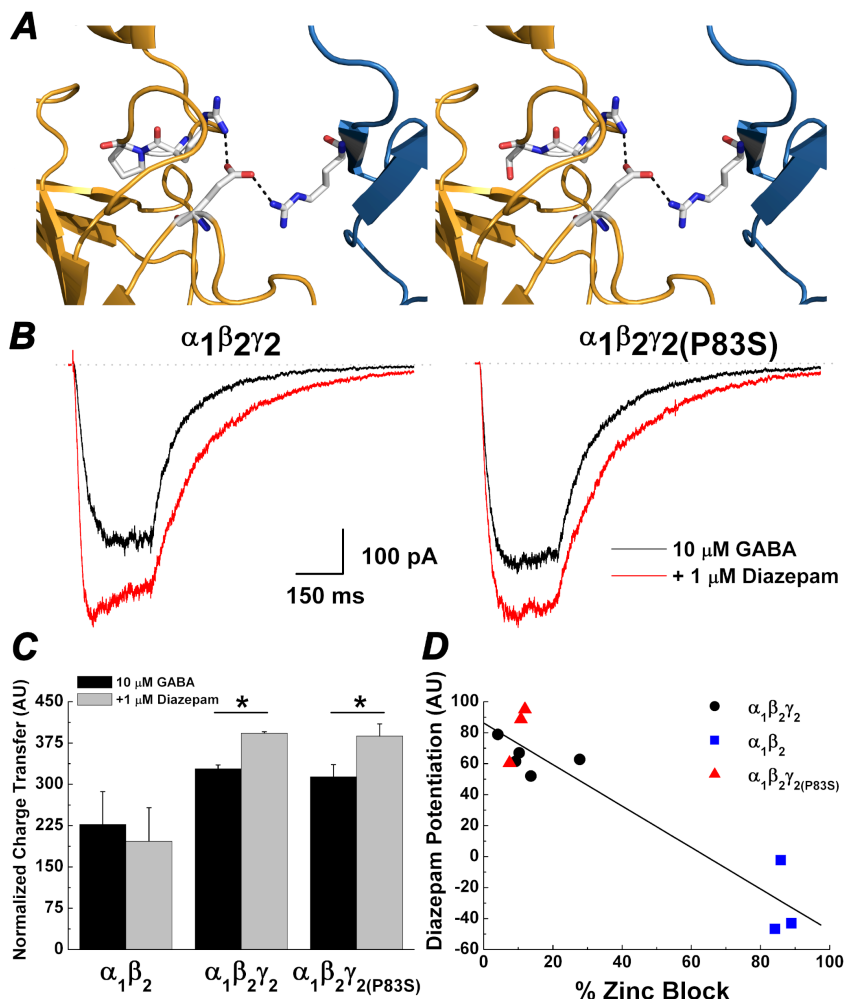


FIG. 9. The γ_2 P83S subunit does not abolish diazepam sensitivity. **A.** Homology model showing the possible conformation of the P83 and S83 residues at the interface between the γ_2 and β_2 subunits (PDB 2BG9). The three residues thought to allosterically modulate the benzodiazepine-binding site ($\gamma_2\text{R82}$, $\gamma_2\text{E178}$ and $\beta_2\text{R117}$) are also shown, and do not appear to be disrupted by the P83S mutation. **B.** Example electrophysiological traces in wildtype (patch # 090713p4) and γ_2 P83S containing receptors (patch # 090724p1) showing the

response modulation by 1 μM diazepam. Mutant responses are indistinguishable from wildtype responses. **C.** Diazepam potentiation was characterized by measuring the area under the curve for each response. This panel summarizes the mean charge transfer (in arbitrary units) for the $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 1\beta 2\gamma 2(\text{P83S})$ receptors. Bars indicate means; error bars indicate standard errors of the mean. Responses from $\gamma 2$ -containing receptors were significantly potentiated by diazepam. **D.** This graph demonstrates the relationship between Zn^{2+} block and diazepam potentiation for $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 1\beta 2\gamma 2(\text{P83S})$ receptors. Receptors containing a $\gamma 2$ subunit (wildtype or mutant) exhibit substantial diazepam potentiation and little Zn^{2+} block, while receptors lacking a $\gamma 2$ subunit show the opposite relationship.

Tableau 3.2.6.12. Supplemental Table 1. Clinical manifestations of the 16 affected individuals carrying novel GABA_A receptor mutations

Individual	Febrile seizures	Atypical febrile seizures	Onset afebrile seizures	Seizure types	EEG	Photosensitivity
A-II-02	No	-	25	GTC	Normal	No
A-III-01	No	-	13	GTC	GSW	Yes
A-III-03	No	-	25	GTC	Atypical SW	Yes
B-II-02	Yes	No	38	GTC	Atypical SW	No
B-II-03	Yes	Yes	2	Absence, GTC	GSW	Yes
B-III-01	Yes	Yes	3	GTC	Normal	No
B-III-02	Yes	No	-	-	NA	-
C-II-02	Yes	No	5	GTC	NA	-
C-II-03	Yes	No	-	-	NA	-
C-II-05	Yes	No	-	-	NA	-
C-II-06	Yes	Yes	-	-	NA	-
C-III-01	No	-	-	-	GSW	No
C-III-02	Yes	No	13	Absence	GSW	Yes
C-III-03	No	-	11	Absence, GTC	GSW	Yes
C-III-04	Yes	Yes	-	-	NA	-
C-III-05	Yes	No	-	-	NA	-

GTC, generalized tonic-clonic seizures; EEG, electroencephalogram; GSW, generalized spike and wave discharges; photosensitivity, epileptic discharges induced by photic light stimulation; atypical SW, generalized slow waves without definite spike and wave discharges.

Figure 3.2.6.13. Supplemental Figure 1. Peptide sequence alignment of a portion of the *GABRA1* and *GABRG2* proteins from different species

```

GABRA1_D219N      EPARSVVVAEDGSRLNQYDLLGQTVDSGIVQSSTGEYVVMTTHFHLKRKI 250
GABRA1_Homo sapiens EPARSVVVAEDGSRLNQYDLLGQTVDSGIVQSSTGEYVVMTTHFHLKRKI 250
GABRA1_Pongo abelii EPARSVVVAEDGSRLNQYDLLGQTVDSGIVQSSTGEYVVMTTHFHLKRKI 250
GABRA1_Mus musculus EPARSVVVAEDGSRLNQYDLLGQTVDSGIVQSSTGEYVVMTTHFHLKRKI 249
GABRA1_Rattus norvegicus EPARSVVVAEDGSRLNQYDLLGQTVDSGIVQSSTGEYVVMTTHFHLKRKI 249
GABRA1_Bos taurus EPARSVVVAEDGSRLNQYDLLGQTVDSGIVQSSTGEYVVMTTHFHLKRKI 250
GABRA1_Gallus gallus EPARSVVVAEDGSRLNQYDLLGQTVDSGIVQSSTGEYVVMTTHFHLKRKI 250
GABRA1_Xenopus     EPAQSVVVAEDGSRLNQYDLLGQTVASGIVQSSTGEYIVVMTTHFHLKRKI 144
                   ***:*****:***** *****:*****

GABRG2_P83S       LNNLLEGYDNKLRSDIGVKPTLIHTDMYVNSIGPVNAINMEYTIDIFFAQ 119
GABRG2_Homo sapiens LNNLLEGYDNKLRPDIGVKPTLIHTDMYVNSIGPVNAINMEYTIDIFFAQ 119
GABRG2_Pongo abelii LNNLLEGYDNKLRPDIGVKPTLIHTDMYVNSIGPVNAINMEYTIDIFFAQ 119
GABRG2_Mus musculus LNNLLEGYDNKLRPDIGVKPTLIHTDMYVNSIGPVNAINMEYTIDIFFAQ 118
GABRG2_Rattus norvegicus LNNLLEGYDNKLRPDIGVKPTLIHTDMYVNSIGPVNAINMEYTIDIFFAQ 118
GABRG2_Bos taurus LNNLLEGYDNKLRPDIGVKPTLIHTDMYVNSIGPVNAINMEYTIDIFFGQ 119
GABRG2_Gallus gallus LNGLLEGYDNKLRPDIGVKPTVIHTDMYVNSIGPVNAINMEYTIDIFFAQ 118
GABRG2_Xenopus     LNGLLKGYDNKLRPDIGVKPTVIHTDMYVNSIGPVNAINMEYTIDIFFAQ 149
                   **.*:*****:*****:*****:*****:*****.*

```

Supplemental Fig. 1. Peptide sequence alignment of a portion of the *GABRA1* and *GABRG2* proteins from different species. The sequences are orthologous to the human residues 201-250 and 70-119 respectively. The orange boxes show evolutionary conservation of the aspartate 219 residue and the proline 83 residue across species. Highly conserved residues near to the mutated amino acids are indicated by an asterisk.

4. Criblage génétique et analyse mutationnelle des gènes

GABA_A

4.1 Présentation de l'article

Au moment où ce projet a été entrepris (janvier 2008), les études de reséquencage des gènes candidats s'étaient avérées les recherches les plus concluantes. Outre les études de liaisons sur certaines grandes familles, notre cohorte de patients épileptiques n'avait pas encore été investiguée à grande échelle. Le lancement du projet « Synapse to Disease » (de la synapse à la maladie, aussi appelé S2D) dans le laboratoire du Dr Rouleau, a été l'occasion parfaite pour débiter notre projet. Côté cette équipe nous a permis d'appliquer des protocoles adaptés au séquençage traditionnel de plusieurs individus (380) simultanément. L'infrastructure du projet S2D nous a procuré une grande capacité d'analyse pour l'époque. Malgré ses limites technologiques, (chaque exon était séquencé séparément et chaque amorce était dessinée individuellement dans le but de séquencer les fragments générés par séquençage Sanger) les 19 gènes GABRA ont initialement été séquencés chez 95 patients ÉGG.

Il s'avère évident que l'arrivée en 2009 des nouvelles technologies de séquençage nous a donné la possibilité de réévaluer notre stratégie et d'envisager d'autres outils de séquençage. Dans un second souffle, les nouvelles technologies de séquençage nous ont permis de mieux comparer le taux de mutations observées chez nos patients et nos contrôles. Le système de préparation d'échantillons « Access Array » et le réseau de circuits fluidiques intégrés (IFC) de Fluidigm nous ont permis de séquencer un plus grand nombre d'individus atteints et sains, et ce spécifiquement pour les gènes GABRA. Cette technologie nous a permis d'obtenir des ensembles de résultats pour les régions d'intérêt à partir d'un grand nombre d'échantillons, tout en évitant le coût et le temps requis pour le séquençage et l'analyse du génome entier. L'utilisation de cette méthode a pallié aux faiblesses de notre design expérimental original en nous donnant la puissance statistique nécessaire.

4.1.1 Contribution des auteurs

Planification de l'étude : PLT et PC

Collecte des patients et informations cliniques : MG et PC

Préparation des échantillons et validation: PLT et SD

Sélection de la cohorte : PLT, CM

Analyses bioinformatiques : SLG et PLT

Rédaction du manuscrit : PLT et SLG

4.2 Excess of rare variants in GABA_A receptor genes in patients with genetic generalized epilepsy

Pamela Lachance-Touchette¹, Simon Girard^{1,2}, Sylvia Dobrzeniecka¹, Caroline Meloche¹, Micheline Gravel¹ & Patrick Cossette¹

¹CHUM Research Center (CRCHUM), University of Montreal, Montreal, Canada

²McGill University and Genome Quebec Innovation Center, Montreal, Canada

Article en preparation

4.2.1 Abstract

Epilepsy is a complex trait that affects approximately 1% of the general population. Previous genetic studies on familial epileptic cases revealed that genetic generalized epilepsy (GGE) form part of a group of disorders named channelopathies. Recently, the dysfunction of ion channels believed to underlie this condition was further highlighted by multiple sequencing studies that identified *de novo* and inherited mutations in multiple ion channel genes in GGE patients. So far, 4 genes encoding for GABA_A receptor subunits have been clearly related to genetic generalized epilepsy. In this study, we propose to evaluate the overall contribution of GABRA genes to the genetic background of genetic generalized epilepsy. In order to achieve this, we re-sequenced 19 GABRA genes in a cohort of 310 genetic generalized epilepsy cases and 170 controls. Using target-enrichment Access Array system, we detected 22 rare variants in 24 GGE patients in 14 GABRA genes and only 5 missenses in 5 controls in 4 different GABRA genes. Although our power of detection was limited, we observed an elevation of the mutation burden in GABRA genes in our epileptic cohort compare to healthy individuals. Our discoveries demonstrate that molecular mechanisms underlying genetic generalized epilepsy can be caused by mutations in complementary subunits of the same molecular complex.

4.2.2 Introduction

Epilepsy is a highly prevalent neurological disorder. According to the World Health Organization, Epilepsy affects approximately 50 million individuals worldwide¹⁷⁸. The

disease is characterized by recurrent episodes of excessive electrical discharges in the brain (epileptic activity). A seizure is considered to be *generalized* when the epileptic discharge is occurring engages rapidly in bilaterally distributed networks¹². In the majority of epileptic individuals (65%), seizures occur without lesion detectable by MRI in the brain and seem to have no underlying cause other than an assumed genetic predisposition. While the 95% concordance rate in identical twins suggests an almost complete genetic aetiology for this syndrome, the genetic factors predisposing to genetic generalized epilepsy (GGE) have not been fully elucidated^{32,33}. Identifying a definite mode of inheritance is challenging for the majority of GGE cases. However, many researchers, including our group, have identified large GGE families where the pattern of inheritance is compatible with an autosomal dominant mode of inheritance (review in¹⁷⁹). Overall, these observations suggest that GGE is not a single entity, but rather represents the sum of a large variety of different genetic diseases: some being clearly Mendelian traits, while others might exhibit polygenic background. After considerable efforts, an increasing number of extremely rare highly penetrant variants in causative genes have been identified for various subtypes of GGE^{57,58,179}, the majority of which encoding voltage- or ligand-gated ion-channel in familial and sporadic forms of the disease¹⁸⁰. This finding has led to the conclusion that GGE is primarily a “channelopathy”¹³⁸; although not all mutated genes associated with GGE encode for ion-channels (e.g.¹⁸¹).

GABA_A receptors are ligand-gated chloride channels that mediate fast inhibition in the adult central nervous system (CNS). Their molecular structures comprise a heteropentameric protein complex assembled from 8 distinct subunits located around the central ion channel. These subunits are classified based on sequence similarity: (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ , and ρ 1-3). So far, epilepsy-causing mutations have been identified in *GABRA1*^{41,83,125,182-184}, *GABRG2*^{39,40,86,145-149,183,185-188}, *GABRB3*^{38,83,128}, and *GABRD*^{80,126,189} encoding respectively the α 1, γ 2, β 3 and δ subunits (Table 1). *In vitro* functional studies have revealed that the majority of these mutations result in a reduction of GABA-activated chloride currents¹³⁵.

Several studies have investigated the role of the GABA_A receptors in GGE by direct sequencing of one or several subunits of the receptor, leading to the identification of a very small proportion of families with mutated GABA_ARs. So far, systematic screening of all

GABA_AR genes has not been performed. Deep resequencing technologies are efficient to identified rare variants in neurologic disease¹⁹⁰. In order to assess the contribution of mutation in GABA_AR genes in GGE, we used a direct resequencing approach of those GABA-related genes (n=19) in epileptic families, sporadic cases and healthy controls followed by a systematic screen for all spectrum of rare mutations. Our screen reveal a higher burden of mutations in GABA_AR genes in GGE compared to the general population, and confirm that deleterious mutation in this group of genes is an important mechanism contributing to the development of GGE.

4.2.3 Materials and Methods

4.2.3.1 Subjects and Healthy-control Samples

310 individuals were collected by referral from neurologists or paediatricians in Quebec, Canada. All patients were located in greater Montreal and Quebec City regions. Informed consent was obtained from all participants and the ethics committee of the CHUM-Notre Dame Hospital approved the study. The diagnosis of GGE was based on detailed clinical interview, full neurological examination and a 21 channel EEG recording when available. In total, our cohort constituted of 115 families with a minimum of two affected clear CGE individuals, 51 families with epileptic familial history of epilepsy but with only one affected individual available and 144 sporadic cases. Patients were diagnosed with juvenile myoclonic epilepsy (JME), childhood absence epilepsy (CAE), juvenile absence epilepsy (JAE) or genetic generalized epilepsy (GGE) not otherwise specified according to ILAE definitions^{12,191}. Only one member per family was selected. In total, 18 different neurologists were involved in the referral of patients. However all charts and investigations were reviewed by a single physician (PC) before making a final clinical diagnosis. A summary of clinical details of affected individuals with mutations in GABRA genes is provided in Table 3. Phenotypic information was centrally databased at CHUM-Notre Dame Hospital and blood samples were collected and stored at the Research Centre of the CHUM. DNA was extracted from peripheral blood by using standard protocols. We also studied 170 unrelated non-epileptic controls.

4.2.3.2 Design, target enrichment and sequencing

A total of 19 genes encoding for all known subunits of GABA_A receptor were selected for deep sequencing (*GABRA1*, *GABRA2*, *GABRA3*, *GABRA4*, *GABRA5*, *GABRA6*, *GABRB1*, *GABRB2*, *GABRB3*, *GABRD*, *GABRE*, *GABRG1*, *GABRG2*, *GABRG3*, *GABRP*, *GABRQ*, *GABRR1*, *GABRR2*, *GABRR3*). Four of them were previously associated with GGE syndromes (Table 1). We first performed exon PCR amplification and direct Sanger DNA sequence analysis of the open reading frame of candidate genes in a cohort of 95 GGE families (≥ 2 affected individuals). Clinicals details, the methods used for the clinical characterization of this cohort and the re-sequencing protocol have already been described previously¹⁸³. In a second phase, Exome targets were generated based on RefSeqgenes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>), representing 184 exons from 19 genes. Primer design was made using the Primer3 oligonucleotide design tool and In Silico PCR tool for validating the specificity of each amplicons. Human genome reference sequence (hg19) was used. Target regions were enriched by PCR using the 48.48 Access Array Integrated Fluidic Circuit (IFC) (Fluidigm, San Francisco, CA). In the final assay, 185 amplicons targeted the protein-coding sequence of 19 GABRA genes with an overhang at exon boundaries in order to capture splice site variants. GABRA exon-specific primers with Fluidigm tags were tested along with materials and reagents as recommended in the Access Array System User Guide (Fluidigm, South San Francisco, CA). Target regions were enriched by PCR using the 48.48 Access Array Integrated Fluidic Circuit (Fluidigm, San Francisco, CA). Sequencing was performed on an Illumina (San Diego, CA) MiSeq instrument at the Genome Quebec Innovation Center (Montreal, Quebec, CA).

4.2.3.3 Alignment, enrichment assessment and variant calling

Using Trimmomatic, all reads were trimmed and clipped to remove Illumina MiSeq adapters and bad quality bases (24695404). BWA mem was used to align reads to the b37 reference of the human genome (19451168). All alignments files were stored in the SAM/BAM format (19505943) and the Picard suite was used to merge all alignment in a

single file (<http://picard.sourceforge.net>). GATK suite was used to produce metrics file and to perform variant calling using UnifiedGenotyper (21478889). Finally, Annovar was used to provide accurate information for each variant calls (20601685).

4.2.3.4 Statistical analysis

In order to test for differences in mutation burden, we used the Sequence Kernel Association Test (SKAT) algorithm¹⁹². SKAT is a statistical analysis package using a computationally efficient regression method that tests for associations between genetic variants in a region and a continuous or discontinuous trait. SKAT offers different parameters to give a different weight according to variation frequencies. The default SKAT parameters were used for a first analysis (low weight to common variants, moderate weight to intermediate variants and heavy weight to rare variants). As our main focus is rare variations, we decided to use the manual recommended settings for rare variants (B1=0.5, B2=0.5). Those parameters set full weight to rare variants (<1%) while ignoring the other variations. Statistical analyses were performed using R statistical software v.2.15.0.

4.2.3.5 Validation of rare variants

All rare variants were confirmed by Sanger DNA sequence analysis using forward and reverse oligos. Transmission of any rare variants was tested in parents and relatives of the probands when available. Primers were designed by Exon primer or Primer3 of regions containing variants to validate. Polymerase chain reactions (PCRs) were performed using the Amplitaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) as per manufacturer's instructions. PCR products were sequenced at the Genome Quebec Innovation Center (Montreal, Quebec, CA) using a 3730 XL DNAnalyzer (Applied Biosystem, Foster City, California, USA). Mutation Surveyor (v3.10, SoftGenetics, State College, Pennsylvania, USA) was used for mutation detection analysis. For the genotyping assays, fragments were detected on the ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) at the Genome Quebec

Innovation Center (Montreal, Quebec, CA) and results were analyzed using GeneMapper v3.7 Software (Applied Biosystems).

4.2.4 Results

4.2.4.1 Identification of mutations in the *GABRA* genes

We performed targeted sequencing on 310 probands and 170 controls. After our quality filters, 295 probands and 159 controls were left for analysis. The exon capture was effective with an average 94% of bases with more than >100x coverage across individuals. Moreover, an average of 96.7% bp/gene was covered. Low coverage regions were excluded from the analysis (see Supp Table 1). We prioritized variants by considering only rare (<1% Minor Allele Frequency (MAF)) and deleterious (missense, nonsense, splice, frameshift and exonic splicing enhancer (ESE)) variants that were not present in the control dataset for further analysis.

A total of 22 rare variants in all *GABRA* genes were identified in 24 subjects with epilepsy. A total of 19 of these variants are missense mutations and 3 are nonsense mutations including 1 frameshift mutation (Table 2). For 14 variants for which DNA of family members were available, the segregation analysis shows that they were all transmitted by one of the two parents in a dominant mode (Figure 3). Five rare variants were found in the control cohort. All of them are missense and one, p.T436A, is located in *GABRG2* epilepsy gene (Suppl Table 4). Rare variations in *GABRA* genes are thus present in both groups but at significantly different frequencies (8.1% in cases vs 3.1% in controls $p < 0.05$). In addition, when we analyzed all missense substitutions with the bioinformatic tools Polyphen, Grantham, PhastCons and Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP), we were able to observe that variants in cases were predicted to be more damaging and lead to more radical amino acid changes compare to variants in controls (Figure 1). All identified variants were confirmed by Sanger Sequencing. All changes were heterozygous and none of those rare variants were reported in the Exome Variant Server (NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>, date (May 2014) accessed).

4.2.4.2 Rare variants in known epilepsy genes

Interestingly, two families (D and E) had rare variants in two distinct GABRA genes including *GABRG2* (*GABRA5/GABRG2* and *GABRB2/GABRG2*) (Figure 2A) which may suggest a epispastic effect.

The nonsense mutation, observed in individual E-II-1, produces a stop codon at Y253 that truncates the last 263 amino acids (a.a.) from the $\gamma 2$ protein. A 4 bp deletion in the genomic sequence of *GABRG2*, that leads to a frameshift in the reading frame causing a premature stop codon in family D. This 4 bp deletion in the genomic sequence of *GABRG2* (g.chr5: 161524768_161524771delTCTT) changes the open reading frame resulting in a translation of 19 new amino acids and creates a stop codon at position X170 of the $\gamma 2$ protein (Figure 1). A total of two affected members from this family carry this F151Sfs*19 mutation in *GABRG2*, as well as an obligated carrier (Figure 2A).

Two exons of *GABRD* were not properly amplified in the IFC technology and were excluded from the analysis. However, during our precedent re-sequencing project of 95 GGE families, we found two rare exonic variants in regions of *GABRD* gene (p.A3S and p.R220C) (Figure 2A). The variant p.R220C was already detected in a small family with generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) ¹²⁶. The variant p.A3S substitutions are located on the extracellular loop, and more precisely on ligand-binding domain. The A3S variant is present in five members of the family A, over three generations and seems to have a small effect size on heritability (Figure 2A).

4.2.4.3 Rare variants in candidate epilepsy genes

For the first time in GABRA genes, we reported the same missense mutation in multiple probands. Mutation p.R3S was identified in three unrelated epileptic cases in *GABRB2* (Figure 2B; Families K, L and M). Using a combination of microsatellites and SNP markers (Supp Figure 4), we confirmed that those three individuals did not share common ancestral haplotype for chromosomal segments 5q33.3-5q34 suggesting a hotspot for mutation

rather than a founder mutation. A nonsense mutation, observed in family T, produces a stop codon at Q190 predicted to result in the loss of the last 276 amino acids from the $\rho 2$ protein (Figure 2B). We detected an additional missense (V297L) in *GABRA6* gene previously implicated in GGE family⁸⁰. Interestingly, the rare variant P423L in *GABRA5* were also reported in Klassen et al., 2011 after they performed the resequencing of more than 200 channel genes in epileptic cases¹⁸⁴. Among all 19 missenses, 15 variants occurred in novel candidate genes (*GABRA2*, *GABRA3*, *GABRA5*, *GABRA6*, *GABRB1*, *GABRB2*, *GABRG3*, *GABRP*, *GABRQ*, *GABRR1*, *GABRR2*). $\alpha 5$, $\beta 2$, θ and $\rho 2$ subunits exhibit ≥ 2 rare variants. Moreover, these genes are part of the most intolerant genes for rare variants (0.01%) based on their RVIS scores of -0.52 (19.77%), -0.43 (24.45%), -0.59 (19.35%) and -0.64 (14.9%) respectively¹⁹³, thereby supporting a role of these mutation in GGE.

In order to evaluate the global contribution of the identified variants to GGE, we resequenced the same genes in a control cohort (n=170). Using a kernel association testing algorithm (SKAT¹⁹²), we were able to collapse all variants into sets of genes (n=19) and to test for additive association. SKAT is also able to combine protective and damaging effect of variants in the same association testing. We first used the defaults SKAT parameters, which give low weight to common variants (>5%), moderate weight to intermediate frequency variants (1% - 5%) and high weight to rare variants (<1%). Unfortunately, our limited power poses a challenge when we used the sequence kernel association test (SKAT) for the association analysis and by using those weights; no genes reached the significance threshold of (p-value <0.0026) defined by a bonferonni correction. We then proceed to a new association testing, by keeping only rare variants with a direct effect on proteins (nonsynonymous variants). The rationale for this approach is that most disease causing mutations have been found to be very rare with large effect/contribution on phenotype. Also, it is expected that all common and intermediate variants associated with epilepsy would have already been detected by Genome Wide Association studies⁷¹. By evaluating only the combined effect of rare variants and considering their predicted function, we showed that deleterious variants are significantly enriched in GGE group compare to controls (p-value 0.04). We also observed that amino acid substitutions occurring in evolutionary conserved sites are more present in case versus control

samples (Figure 3).

4.2.5 Discussion

4.2.5.1 *GABRA1* and *GABRG2* risk factors for epilepsy

Some previous reports were not able to identify disease-causing mutations in their respective epileptic cohorts and they concluded that mutations in principal subunits of GABA_A receptor stay rare^{80,95,184}. Helbig et al., 2008 as well as Tan and Berkovic, 2010 have demonstrated that epilepsies have a complex genetic background and suggest that new strategies need to be employed^{58,194}. Our approach consisted in re-sequencing candidate genes (n=19) for rare variants with a new targeting sequencing technology. In total, approximately 8% of our GGE cohort exhibits rare variants in one or multiple GABRA genes suggesting that all together, this group of genes represent a common etiology of GGE.

Although sequencing studies on GABA_A receptors have been done in the past, we report here the first systematic re-sequencing study on the full family of receptors. It is relevant to note that a lot of previous “candidate gene” design studies have introduced bias by sequencing controls only in mutated exons. This methodology prevents other groups from assessing the rate of mutations in control population. Our study provides a unique opportunity to evaluate without previous bias the real genetic contribution of GABAR genes to the complex genetic architecture of GGE. Our results set bases for diagnostic testing and genetic counselling of epileptic patients and their families.

Overall our data allow us to draw other conclusions. The most obvious is that there are a substantial number of patients (>90%) for which no rare variants in GABRA genes could be identified. This number is not surprising considering the complex genetic background underlying pathogenesis of GGE phenotypes and the low number of candidate genes. However, given certain technical limitations, it is not excluded that some variants were missed. Even if β 3 subunit GABA_A receptor is clearly associated with epilepsy, we did not

identify rare variants in this gene. This result may be explained by the previously screening of our childhood absence epileptic cases in Lachance-Touchette et al., 2010 for *GABRB3* and the absence of severe phenotypes like epileptic encephalopathy syndromes in this present GGE cohort³⁸.

4.2.5.2 New candidate epilepsy genes

Three probands were found to possess novel variants in two different genes (Figure 2; Families D, E and M). Collectively, these “double-hits” illustrated that the concept of mutations in complementary subunits of the same molecular complex could be a major piece of genetic background of an epileptic patient. This hypothesis should be integrated in the future analysis models of massive parallel sequencing data and will be better appreciated by using large cohort of GGE cases. Genetic susceptibility for genetic generalized epilepsies may be less heterogeneous than we anticipated. Furthermore, combined with the frequency of rare variants in *GABRA5* and *GABRB2* in our cohort. These discoveries suggest that they are significant contributors to GGE and related phenotypes. They should be considered in future testing in larger cohort of epileptic syndromes.

We will need to rethink about the definition of rare variants in further genetic studies. We systematically excluded recorded single nucleotide variants (SNV) when they were in EVS database. Some of them present a MAF of less than 1% but still categorize as polymorphic (data not shown). Furthermore, it will be necessary in the future to reproduce those results in a larger cohort that will allow for a greater power of detection for mutation burden tests.

4.2.5.3 Conclusion

This report presents the mutation screening results of the coding regions of 19 GABRA genes in 310 epileptic patients and 170 controls. Our findings support that variants in GABA_A receptors are rare and could explain just a portion of the heritability of the common epilepsy. Our findings revealed that evaluating the risk of even deleterious ion channel mutations to an individual could be complex and depend on the other « epilepsy prone » variants with which they are combined.

ACKNOWLEDGEMENTS: We wish to thank Dr Eva Anderman, Dr Arline-Aude Bérubé, Dr Boulet, Dr Lionel Carmant, Dr Cécile Cieuta-Walti, Dr Clément, Dr Charles Deacon, Dr Richard Desbiens, Dr Francois Dubeau, Dr Normand Giard, Dr Anne Lortie, Dr Dang Khoa Nguyen, Dr Rioux, Dr Guy Rouleau, Dr Jean-Marc Saint-Hilaire, Dr Michael Shevell and Dr Michel Vanasse for their participation to the recruitment of the patients. This work was supported by operating grants to Dr. Cossette from the Canadian Institutes for Health Research as well as the Savoy Foundation. P. Lachance-Touchette is supported by a doctoral fellowship from the FRQS. S. Girard is supported by a postdoctoral fellowship from the FRQS. We would like to thank all the families and patients who participated in this study.

4.2.6 Tableaux et figures

Tableau 4.2.6.1. Table 1. Summary of mutations in GABA_A receptor subunit genes associated with genetic epilepsy syndromes

Genes	Loci	Mutations	Phenotypes	Transmission mode	Number of families/cases/controls	References
<i>GABRD</i>	1p36.33	E177A	GEFS+	AD	1 family	Dibbens et al., 2004
		R220H	GEFS+/GGE/FS	AD	Rs41307846	Dibbens et al., 2004; 2009; Lenzen et al., 2005
		R220C	GEFS+	N/A	1 family	Dibbens, 2004
<i>GABRG2</i>	5q34	Q40X	DS	AD	1 family	Ishii et al., 2014
		N79S	GTCS	N/A	1 case	Shi et al., 2010
		R82Q	CAE/FS	AD/N/A	1 family + 25 cases + 8 controls	Wallace et al., 2001; Hancili et al., 2014
		P83S	FS/AE	AD	1 family	Lachance-Touchette et al., 2011
		R136X	GEFS+	AD	1 family	Johnston et al., 2014
		R177G	FS	AD	1 family	Audenaert et al., 2006
		IVS6+2T→G	CAE/FS	AD	1 family	Kananura et al., 2002
		R323Q	MAE	De Novo	1 case	Carvill et al., 2013
		K328M	GEFS+	AD	1 family	Baulac et al., 2001
		Q390X	GEFS+	AD	1 family	Harkin et al., 2002
		W429X	GEFS+	AD	1 family	Sun et al., 2008
		S443delC	GEFS+	AD	1 famille	Tian et al., 2013
		<i>GABRA1</i>	5q34	T20I	GGE	N/A
R112Q	DS			De Novo/N/A	2 cases	Carvill et al., 2014
D219N	FS/AE			AD	1 family	Lachance-Touchette et al., 2011
G251S	DS			De Novo	1 case	Carvill et al., 2014
T292I	Infantile spasms			De Novo	1 case	Epi4K and EPGP Investigators, 2013
K306T	DS			De Novo	1 case	Carvill et al., 2014
A322D	JME			AD	1 family	Cossette et al., 2002
S326fs328X	CAE			De Novo	1 case	Maljevik et al., 2006
K353delins18X	GGE			AD	1 family	Lachance-Touchette et al., 2011
<i>GABRB3</i>	15q12			P11S	CAE/Autism	AD
		S15F	CAE	AD	1 family	Tanaka et al., 2008
		G32R	CAE	AD	1 family	Tanaka et al., 2008
		N110D	Infantile spasms	De Novo	1 case	Epi4K and EPGP Investigators, 2013
		D120N	Lennox-Gastaut Syndrome	De Novo	1 case	Epi4K and EPGP Investigators, 2013
		E180G	Lennox-Gastaut Syndrome	De Novo	1 case	Epi4K and EPGP Investigators, 2013
		Y302C	Lennox-Gastaut Syndrome	De Novo	1 case	Epi4K and EPGP Investigators, 2013

Table 1. Summary of mutations in GABA_A receptor subunit genes associated with genetic epilepsy syndromes. Abbreviations: GGE, genetic generalized epilepsy; GEFS+, generalized epilepsy with febrile seizures plus; CAE, childhood absence epilepsy; AE, absence epilepsy; MAE, myoclonic absence epilepsy; JME, juvenile myoclonic epilepsy; FS, febrile seizures; DS, Dravet syndrome; GTCS, generalized tonic-clonic seizures; AD, autosomic dominant; N/A, not available.

Tableau 4.2.6.2. Table 2. Rare and disruptive variants found in patients with GGE detected by candidate gene targeted resequencing

Chromosome	Position	GeneList	Function/GVS	Freq. patients	Freq. controls	Alleles	rsID	Aminoacids	Inheritance	PopPhen	Grantham	PhastCons	GERP	Distance	Isosplice	PPI	MAF	Genome ESP
Mutations in known epilepsy genes																		
3	161309659	GABRA1	missense	0/001701	0	G/A	novel#	D219N	AD	1	23	1.000	5.340	49	none	none	not present	
5	161322780	GABRA1	missense	0/001695	0	C/A	121434579	A322D	AD	1	126	1.000	5.470	95	none	none	not present	
5	161520973	GABRG2	missense	0/001695	0	C/T	novel#	P83S	AD	1	74	1.000	5.820	13	none	none	not present	
5	161524666	GABRG2	missense	0/001695	0	T/G	novel	F117C	AD	1	205	1.000	5.820	23	none	none	not present	
5	161524764	GABRG2	frameshift	0/001695	0	TCTT	novel	E151SIS*19	N/A	N/A	N/A	1.000	5.720	97	none	none	not present	
5	161530902	GABRG2	stop-gained	0/001695	0	T/A	novel	Y253X	AD	N/A	N/A	N/A	-0.836	8	none	none	not present	
Mutations in candidate epilepsy genes																		
4	46252609	GABRA2	missense	0/001695	0	C/G	novel	A358P	N/A	0.757	27	0.035	3.030	13	none	none	not present	
X	151533008	GABRA3	missense	0/001695	0	G/T	200794179	T12N	N/A	0.004	65	0.000	-3.510	61	none	none	not present	
15	27185074	GABRA5	missense	0/001701	0	G/A	novel	E243K	AD	0.769	56	0.980	5.200	3	none	none	not present	
15	27193349	GABRA5	missense	0/001695	0	C/T	novel	P453L	N/A	0.515	98	0.953	5.060	269	none	none	not present	
5	161119009	GABRA6	missense	0/001695	0	G/T	novel	V297L	N/A	0.995	32	1.000	5.320	63	none	none	not present	
4	47405341	GABRB1	missense	0/001695	0	A/G	novel	Y184C	AD	1	194	1.000	5.420	7	none	none	not present	
5	160753473	GABRB2	missense	0/001695	0	T/C	novel	I365V	AD	0	29	1.000	4.040	16	none	none	not present	
5	160763656	GABRB2	missense	0/001695	0	T/C	novel	K221R	N/A	0.081	26	1.000	5.470	18	none	none	not present	
5	160973641	GABRB2	missense	0/005085	0	T/A	novel	R38S	AD/N/A	0.376	110	1.000	5.580	69	none	none	not present	
15	27772753	GABRG3	missense	0/001695	0	C/A	novel	T347N	AD	0	65	0.000	2.210	23	none	none	not present	
5	170222400	GABRP	missense	0/001695	0	C/G	novel	F143L	AD	0.999	22	1.000	4.720	30	none	none	not present	
X	151806720	GABRQ	missense	0/001701	0	G/A	novel	E22K	AD	0.884	56	0.571	4.140	86	none	none	not present	
X	151821707	GABRQ	missense	0/001695	0	T/C	novel	L621S	N/A	0.984	145	0.810	5.940	704	none	none	not present	
6	89907781	GABRR1	missense	0/001695	0	A/G	novel	M177T	AD	0.975	81	1.000	5.830	43	none	none	not present	
6	89977760	GABRR2	stop-gained	0/001701	0	G/A	novel	Q190X	AD	N/A	N/A	0.998	5.910	28	none	none	not present	
6	89978790	GABRR2	missense	0/001701	0	G/A	novel	T151I	N/A	0.977	89	1.000	5.700	61	none	none	not present	

Table 2. Rare and disruptive variants found in patients with GGE detected by candidate gene targeted resequencing. Abbreviations: #, previously reported variants ^{41,183}; AD, autosomic dominant; N/A, One or both parents are unavailable to determine variant segregation; MAF, minor allele frequency in the Exome Sequencing Project (ESP) control dataset. PolyPhen-2 algorithm qualitatively predicts that amino acid changes will be benign, possibly damaging or probably damaging, corresponding to posterior probability intervals (0, 0.2), (0.2, 0.85), and (0.85, 1) respectively ¹⁹⁵. PhastCons score is a number between 0 and 1 that describes the degree of sequence conservation among 17 vertebrate species ¹⁹⁶. The Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP) score was obtained from the GERP website in May 2014. It ranges from -12.3 to 6.17, with 6.17 being the most conserved. Grantham Score: the score ranges is between 0 and 215 and <50 were classified as nonsynonymous conservative, 51 to 100 as moderately conservative, 101 to 150 as moderately radical, and >151 as radical ¹⁹⁷.

Figure 4.2.6.3. Figure 1. Sequencing of the f151sfs*19 mutation in *GABRG2* gene

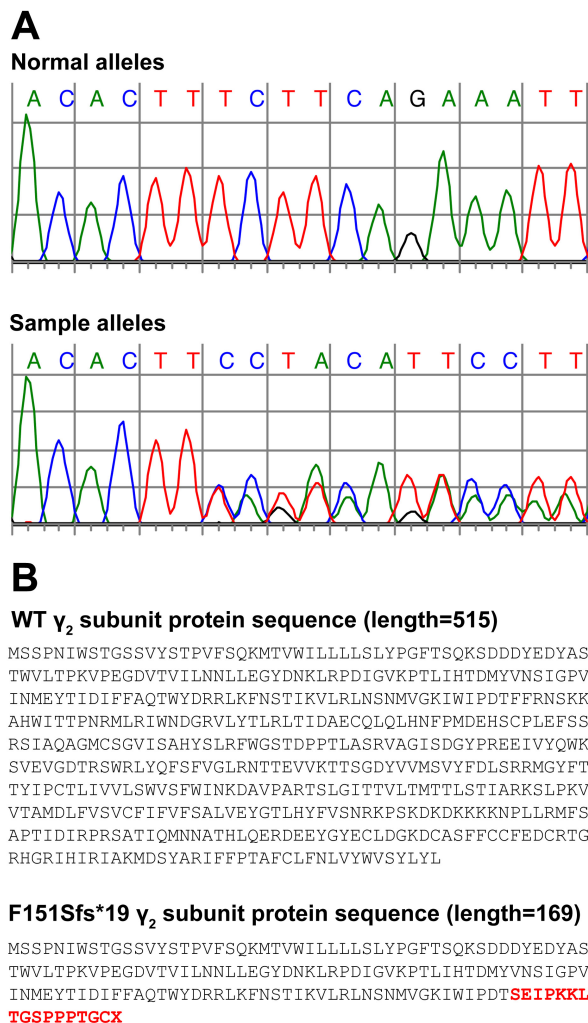


Figure 1. Sequencing of the f151sfs*19 mutation in *GABRG2* gene. **A.** The mutation consists in a deletion of 4 nucleotides located in exon 4 of the *GABRG2* gene (g.chr5: 161524768_161524771delTCTT). **B.** The amino acid sequence of the wildtype (top) and mutant (bottom) GABA_A receptor. The mutation results in the translation of 19 new amino acids and a premature stop codon (red) at position X170 and the deletion of 346 amino acids of the γ_2 protein. All amino acid changes resulting from frameshift mutation are predicted using Expassy translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>).

Figure 4.2.6.4. Figure 2. Segregation profiles of the novel GABA_A receptor mutants in families affected with GGE and related phenotypes

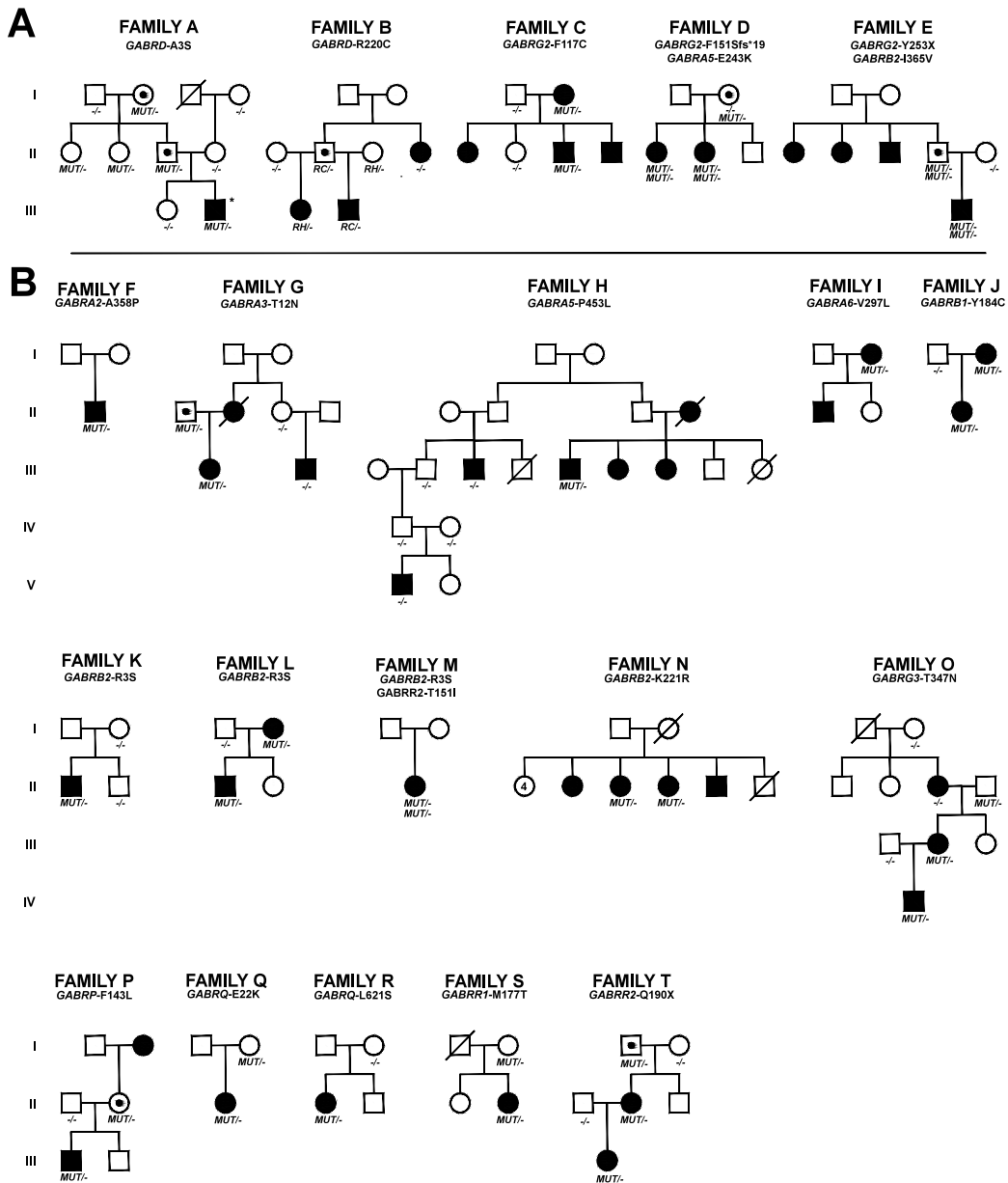


Figure 2. Segregation profiles of the novel GABA_A receptor mutants in families affected with GGE and related phenotypes. A. Families showing individuals with rare variants in known epilepsy genes B. Families showing individuals with rare variants in new candidate epilepsy genes.

Figure 4.2.6.5. Figure 3. Box-plot diagrams showing the *in silico* scores for all rare variants in GABRA genes between the two groups (cases vs controls)

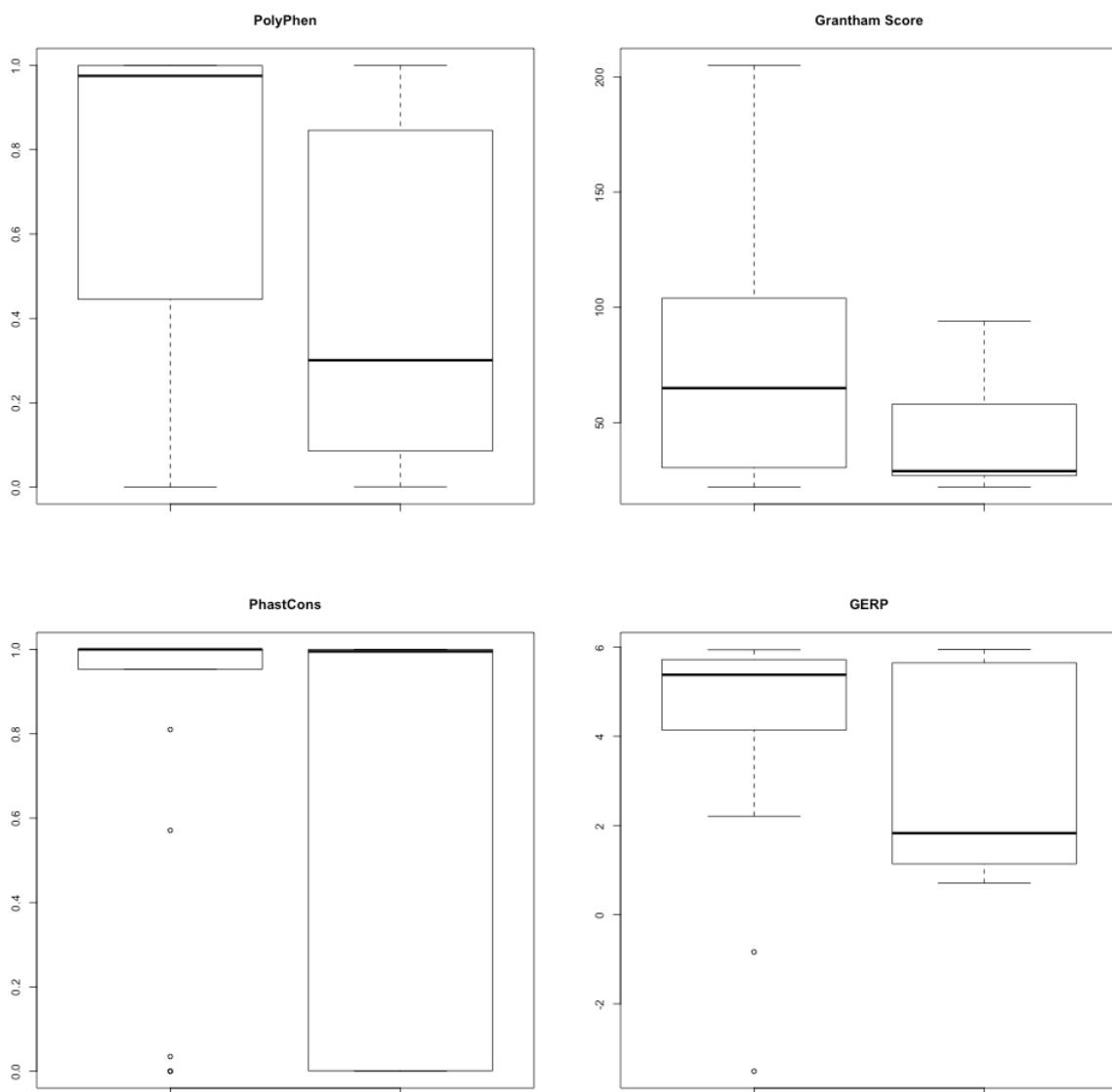


Figure 3. Box-plot diagrams showing the *in silico* scores for all rare variants in GABRA genes between the two groups (cases vs controls). Boxes represent the 25th and 75th percentiles, horizontal lines inside the boxes are the median values, bars represent minimum and maximum values and the open circles are outlier values. The plot elements they represent refer to Table 2.

Tableau 4.2.6.6. Supplementary Table 1. Clinical features of patients and related family members carrying novel GABA_A receptor mutations

Individual	Febrile seizures	Atypical febrile seizures	Onset afebrile seizures	Seizure types	EEG	Photosensitivity
A-I-2	-	-	-	-	-	-
A-II-1	-	-	-	-	-	-
A-II-2	-	-	-	-	-	-
A-II-3	-	-	-	-	-	-
A-III-2	Possible	-	36 months	GTC	GSW	No
B-II-2	No	-	-	No seizure	-	-
B-II-3	-	-	-	-	-	-
B-III-1	No	-	-	GTC, Absences, Myoclony	-	No
B-III-2	No	-	-	GTC, Absences, Myoclony	GSW	No
C-I-2	Yes	-	-	GE	-	-
C-II-3	Yes	-	-	FS	-	-
D-I-2	No	-	-	-	-	-
D-II-1	Yes	-	36 months	GTC	GSW	-
D-II-2	Yes	-	8 months	GTC, Absences	GSW	-
E-I-1	No	-	-	-	-	-
E-II-1	Yes	-	8 months	Absences	GSW	Possible
F-I-1	No	-	-	GTC	Normal	-
G-II-1	-	-	-	-	-	-
G-III-1	No	-	-	Absences, Myoclonies	GSW	Yes
H-III-5	No	-	-	GTC, Myoclony	GSW	No
I-I-2	No	-	-	Absences, GTC	Bilateral slow dysfunction	No
J-I-2	No	-	-	GTC, Absences, Aura	Irritatif burst fronto-temporal (max left)	No
J-II-1	No	-	-	Absences	Normal	-
K-II-1	Yes	No	11	Absence	GSW, bi-temporal slow waves	No
L-I-2	-	-	24	GTC	-	-
L-II-1	No	-	5	Absence	Normal	No
M-II-1	No	-	-	Absences	Burst of slow waves 4-5 Hz	No
N-I-1	No	-	-	Absences	GSW	-
N-I-2	No	-	-	-	-	-
O-II-4	No	-	-	-	-	-
O-III-2	No	-	-	Absences	GSW	No
O-IV-1	No	-	-	Absences	GSW	No
P-I-2	No	-	-	-	-	-
P-II-1	No	-	-	Absences	GSW	No
Q-I-2	No	-	-	-	-	-
Q-II-1	No	-	-	Absences	GSW	No
R-II-1	No	-	-	GTC, Absences	GSW	No
S-I-2	No	-	-	-	-	-
S-II-2	No	-	-	GTC, Myoclony	Normal	No
T-I-1	No	-	-	-	-	-
T-II-2	No	-	-	Absences	Slow spikes, right temporal	No
T-III-1	No	-	-	GTC	Irritatif activity aduring hyperventilation	No

Supplementary Table 1. Clinical features of patients and related family members carrying novel GABA_A receptor mutations. GTC, generalized tonic-clonic seizures; EEG, electroencephalogram; GSW, generalized spike and wave discharges; photosensitivity, epileptic discharges induced by photic light stimulation.

Tableau 4.2.6.7. Supplementary Table 2. Low coverage regions excluded from the analysis

Chr	Interval regions	
1	1950763	1950935
1	1959589	1959736
4	46391747	46392061
5	160975060	160975135
5	161274192	161274422
5	161275192	161275433
5	170210718	170210883
15	27017823	27017924
15	27112053	27112263
15	27113871	27113945
15	27216512	27216740
X	151143037	151143156
X	151619613	151619836

hg19 assembly

Supplementary Table 2. Low coverage regions excluded from the analysis.

Tableau 4.2.6.8. Supplementary Table 3. The sum of variants identified in controls in GABRA genes

Chromosome	Position	GeneList	FunctionGV	Freq patients	Freq controls	Alleles	rsID	AminoAcids	PolyPhen	Grantham	PhastCons	GERP	DistanceToSplice	PPI	MAF Genome ESP
4	46930505	GABRA4	missense	0	0.003145	C/G	novel A468P	0.301	27	0.001	1.830	268	none	not present	
X	151821523	GABRQ	missense	0	0.003145	C/T	novel L560F	0.846	22	0.000	0.707	520	none	not present	
5	161115980	GABRA6	missense	0	0.003145	G/A	novel R84H	1	29	1.000	5.650	26	none	not present	
5	161119122	GABRA6	missense	0	0.003145	G/C	novel K334N	0.086	94	0.995	1.140	85	none	not present	
5	161580132	GABRG2	missense	0	0.003165	A/G	novel T436A	0.001	58	1.000	5.950	34	GABARAP:974	not present	

Supplementary Table 3. The sum of variants identified in controls in GABRA gene

5. Le rôle majeur des récepteurs GABA_A mutants dans la pathogenèse de l'épilepsie génétique généralisée au cours du développement du SNC

5.1 Présentation de l'article

Les épilepsies génétiques généralisées (ÉGG) sont un groupe de syndromes épileptiques hétérogènes qui se manifestent habituellement durant les périodes de l'enfance et de l'adolescence. Au cours des dernières années, plusieurs gènes impliqués dans des formes familiales d'ÉGG ont été identifiés. La majorité d'entre eux codent pour des canaux ioniques incluant le récepteur-ligand GABA_A (RGABA_A). Chez l'adulte, ces canaux chloriques sont activés par le GABA et médient la principale réponse inhibitrice du système nerveux central (SNC). Paradoxalement, dans le cerveau immature, l'activation de ces mêmes récepteurs GABA_A induit une réponse excitatrice. Plusieurs données récentes suggèrent que cette transmission GABAergique excitatrice aurait un effet trophique sur le cerveau immature et jouerait un rôle important dès les stades précoces du développement du SNC¹⁴¹

En criblant des familles québécoises avec ÉGG, nous avons récemment identifié 22 nouvelles mutations dans les sous-unités du récepteur GABA_A. De ce groupe, 5 nouvelles mutations ont été identifiées dans les gènes déjà associés à l'épilepsie (*GABRA1* et *GABRG2*). Notre hypothèse suggérait que les RGABA_A mutants puissent altérer l'effet trophique du GABA durant le développement du SNC. L'objectif principal de ce projet visait à déterminer la contribution relative de chacune des sous-unités mutantes du récepteur GABA_A dans le développement du SNC. De façon plus précise, nous voulions démontrer qu'une telle perte de fonction a un impact significatif sur le développement des synapses GABAergiques et la plasticité des circuits corticaux. Afin de démontrer cette hypothèse, nous proposons de surexprimer les sous-unités sauvages et mutantes $\alpha 1$ dans des cultures de coupes organotypiques préparées à partir de cortex de souris B6.129 (FVB)-*Gabra1*^{tm1Geh/J}. Nous avons utilisé cette méthodologie pour étudier l'impact des récepteurs mutants sur la dynamique des réseaux néocorticaux.

5.1.1 Contribution des auteurs

Planification de l'étude : PLT, GD et PC

Génération des constructions plasmidiques, préparation des billes biolistiques et création de la colonie viable de souris: PLT, CM et MP

Transfection biolistique, immunohistochimie et imagerie confocale: MC

Analyses des cellules pyramidales et des cellules à paniers PV⁺: PLT, MC, AS

Rédaction du manuscrit : PLT, MC, GD, PC

5.2 Single-cell genetic expression of mutant GABA_A receptors causing Human genetic epilepsy alters dendritic spine and GABAergic bouton formation in a mutation-specific manner

Pamela Lachance-Touchette^{1*}, Mayukh Choudhury^{2*}, Ana Stoica¹, Graziella Di Cristo² & Patrick Cossette¹

Article publié dans Frontiers in Cellular Neuroscience, octobre 2014, volume 8(317), pages 1 à 10

¹Centre d'Excellence en Neuromique de l'Université de Montréal (CENUM), Centre de recherche CHUM, Montréal, QC, Canada

²Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

*Both authors contributed equally to this study

5.2.1 Abstract

Mutations in genes encoding for GABA_A receptor subunits is a well-established cause of genetic generalized epilepsy. GABA neurotransmission is implicated in several developmental processes including neurite outgrowth and synapse formation. Alteration in excitatory/inhibitory synaptic activities plays a critical role in epilepsy, thus here we investigated whether mutations in $\alpha 1$ subunit of GABA_A receptor may affect dendritic spine and GABAergic bouton formation. In particular, we examined the effects of three mutations of the *GABRA1* gene (D219N, A322D and K353delins18X) that were found in a cohort of French Canadian families with genetic generalized epilepsy. We used a novel single-cell genetic approach, by preparing cortical organotypic cultures from *GABRA1*^{flox/flox} mice and simultaneously inactivating endogenous *GABRA1* and transfecting mutant $\alpha 1$ subunits in single glutamatergic pyramidal cells and basket GABAergic interneurons by biolistic transfection. We found that *GABRA1*^{-/-} GABAergic cells showed reduced innervation field, which was rescued by co-expressing $\alpha 1$ -A322D and $\alpha 1$ -WT but not $\alpha 1$ -D219N. We further found that the expression of the most severe *GABRA1* missense mutation ($\alpha 1$ -A322D) induced a striking increase of spine density in pyramidal cells along with an increase in the number of

mushroom-like spines. In addition, $\alpha 1$ -A322D expression in GABAergic cells slightly increased perisomatic bouton density, whereas other mutations did not alter bouton formation. All together, these results suggest that the effects of different GABA_AR mutations on GABAergic bouton and dendritic spine formation are specific to the mutation and cannot be always explained by a simple loss-of-function gene model. The use of single cell genetic manipulation in organotypic cultures may provide a better understanding of the specific and distinct neural circuit alterations caused by different GABA_A receptor subunit mutations and will help define the pathophysiology of genetic generalized epilepsy syndromes.

5.2.2 Introduction

Genetic factors play a key role in the development and severity of genetic generalized epilepsy (GGE). Epilepsy-causing mutations have been identified in several GABA_A receptor (GABA_AR) subunits, including $\alpha 1$, $\beta 3$, $\gamma 2$, and δ subunits^{38-41,80,83,86,125,126,128,145-148,182-188,198}. GABA_ARs are ligand-gated ion channels that are permeable to chloride and bicarbonate anions and mediate most of cortical inhibitory neurotransmission. Their molecular structure comprises of a heteropentameric protein complex assembled from 19 different subunits ($\alpha 1$ -6, $\beta 1$ -3, $\gamma 1$ -3, δ , ϵ , π , θ , and $\rho 1$ -3). Although there is the potential for a high variability of combinations, the $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ is the most abundant and represents approximately 60% of all GABA_ARs in adult brain¹⁰⁴. Mutations in the *GABRA1* gene are linked to a spectrum of endophenotypes of GGE syndromes as well as more severe forms of epilepsy associated with intellectual disability¹⁸². We previously reported D219N, A322D, K353delins18X mutations in families with autosomal dominant genetic generalized epilepsy^{41,183}. Whether these mutations cause protein inactivation and thus loss of function is still unclear. Deletion of $\alpha 1$ in mice produced EEG spike-wave discharges and absence-like seizures¹⁹⁹. This mouse model recapitulates some of the epilepsy phenotypes that were reported in human carriers of *GABRA1* mutations^{41,125,183,184}. *In vitro* investigations in heterologous cells demonstrated that *GABRA1* mutants could affect mRNA transcript stability, cell surface GABA_AR composition and channel gating properties^{41,125,152,182,183,200,201}. By expressing wild type or mutant $\alpha 1$ in heterologous cells, we previously showed that A322D and K353delins18X mutations reduced GABA-evoked currents amplitude by impairing $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ receptor surface expression due to endoplasmic reticulum retention^{152,183}. In addition, two *GABRA1* mutations (A322D, D219N)

exhibited altered gating kinetic properties¹⁸³. Further, studies in cultured neurons revealed that $\alpha 1$ -A322D mutation altered the kinetics and the amplitude of miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) in pyramidal neurons²⁰². These data support the hypothesis that reduced inhibition underlies network hyperexcitability in GGE associated with GABA_AR mutations.

On the other hand, GABA_AR mutations may also alter specific developmental processes. Alterations in the number and strength of inhibitory and excitatory synapses are thought to contribute to epilepsy²⁰³. In addition, GABA transmission have been shown to play a key role during brain development, influencing virtually all developmental steps from neurogenesis to the establishment of neuronal connectivity^{204,205}. Focusing in particular on synaptogenesis, recent studies demonstrated in organotypic cortical slices that endogenous GABA regulates axonal branching and synapse formation of cortical basket cells- a prominent class of GABAergic neurons- through the activation of GABA_A and GABA_B receptors²⁰⁶⁻²⁰⁸. GABAergic transmission can also play a critical role in excitatory synapse development. In pyramidal neurons of the cerebral cortices, excitatory synaptic inputs are made on small dendritic protrusions, called dendritic spines. Hayama and collaborators (2012) showed that dendritic spine shrinkage and elimination can be promoted either by uncaging of a caged GABA compound that mimics IPSCs or by tonic application of a GABA_A agonist, muscimol²⁰⁹. Whether and how *GABRA1* mutations affect dendritic spines and GABAergic bouton formation, thus contributing to the epilepsy phenotype has not been so far examined.

So far, the vast majority of mutations in GABA_AR subunits causing Human epilepsy are associated with loss-of-function, when assessing gating properties of the GABA-evoked currents *in vitro*²¹⁰. However, review of functional studies on GABRA mutations in heterologous cell system revealed controversial findings between different groups (reviewed in¹⁷⁹). For example, for long time no consensus was reached regarding the impact of *GABRG2* missense mutations on GABA currents amplitude or kinetics as well as cell surface expression by using heterologous cell culture. Only the generation of a mouse model harbouring the $\gamma 2$ point mutation (R82Q) dissipated all these ambiguities¹⁷⁵. The emergence of massive gene-sequencing studies will generate an enormous amount of data, on the other hand developing

mouse knock-in models for each new GABRA mutations is unrealistic, both because it is time consuming and far too expensive.

Here, we propose of using single cell genetic manipulation to investigate the effects of different mutations of GABA_A $\alpha 1$ subunit on both dendritic spine and GABAergic bouton formation in cortical organotypic slices, which maintain the three dimensional structure of the brain tissue and the tight spatial relationships between different cell types. In particular, we analyzed the density and morphology of pyramidal cell dendritic spines, which are the preferential postsynaptic site of glutamatergic synapses. We also examined the axon morphology and bouton density of basket cells, which are the most prominent type of GABAergic interneurons in the cortex.

5.2.3 Materials and methods

5.2.3.1 Mice

Funder mice B6.129(FVB)-*Gabra1*^{tm1Geh}/J, first described in Vicini et al. (2001), were kindly gifted by Dr. Rudolph (McLean Hospital, Harvard Medical School)²¹¹. They were bred to establish a colony in the animal facility at the *Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal* (CRCHUM). All mice were housed under standard pathogen-free conditions in a 12-hour light/dark cycle with *ad libitum* access to sterilized laboratory chow diet. Animals were treated in accordance with Canadian Council for Animal Care and protocols were approved by the Animal Care Committee of the CRCHUM and of CHU Ste-Justine Research Center. B6.129(FVB)-*Gabra1*^{tm1Geh}/J mice were previously produced in a mixed background. The background was characterized with a microsatellite panel consisting of 110 markers spread across the genome at about 15 cM intervals and was confirmed to be 99.08% congenic to C57BL/6J background (Charles River, NY). B6.129(FVB)-*Gabra1*^{tm1Geh}/J mice possess three *loxP* sites on both sides of the $\alpha 1$ exon encoding an essential transmembrane domain of GABA_A receptor.

5.2.3.2 DNA constructs

P_{G67}-GFP was generated by subcloning of a 10 kb region of *Gad1* gene promoter by gap repair in front of the GFP coding region in pEGFP (Clontech) as previously described²¹². We subcloned CRE, *GABRA1*-A322D, *GABRA1*-D219N, *GABRA1*-K353delins18X constructs^{41,183} in P_{G67} vector by using restriction site PmeI via sequence and ligation-independent cloning method (SLIC)²¹³. All constructs were sequenced to confirm the presence of the mutations and to exclude any other variants that may have been introduced during PCR amplification.

5.2.3.3 Slice culture and biolistic transfection

Slice culture preparation was done as described by²¹⁴. Postnatal day 4 or 5 (P4 or P5) mouse pups were decapitated, and brains were rapidly removed and immersed in ice-cold culture medium (containing DMEM, 20% horse serum, 1 mM glutamine, 13 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 0.5 μm/ml insulin, 30 mM HEPES, 5 mM NaHCO₃, and 0.001% ascorbic acid). Coronal brain slices of the occipital cortex, 400 μm thick, were cut with a Chopper (Stoelting, Wood Dale, IL). Slices were then placed on transparent Millicell membrane inserts (Millipore, Bedford, MA), usually three slices/insert, in 30 mm Petri dishes containing 0.75 ml of culture medium. Finally, the slices were incubated in a humidified incubator at 34°C with a 5% CO₂-enriched atmosphere and the medium was changed three times per week. All procedures were performed under sterile conditions. Constructs to be transfected were incorporated into “bullets” that were made using 1.6 μm gold particles coated with a total of ~60 μg of the DNA(s) of interest. These bullets were used to biolistically transfect slices by Gene gun (Bio-Rad, Hercules, CA) at high pressure (180 ψ), and the transfected slices were incubated for 8 days *in vitro* under the same conditions as described above, before imaging. For each experimental group, cortical slices were prepared from at least three mice. On average 6-7 neurons were transfected per cortical organotypic slice. The majority of neurons labeled by this promoter were parvalbumin-positive basket cells (as described in^{206,212}), while a minority (~10%) were pyramidal cells. Pyramidal cells were recognized by the complexity of their dendritic arbor, including an apical dendrite, and the presence of numerous dendritic spines.

5.2.3.4 Imaging and spine analysis of pyramidal cells

Pyramidal neurons were imaged using a Leica confocal microscope SPE (63X glycerol immersion objective; NA 1.3). At least 6 labeled pyramidal neurons, characterized by the presence of a well defined apical dendrite, were randomly selected from cortical layers 2/3 and 5. Image stacks of basal dendrites were acquired with a z-step of 0.5 μm and then reconstructed in 3-D with NeuroLucida (MicroBrightField) software. Cortical pyramidal cells from at least four animals were used for each experimental condition. Dendritic length, total spine density, spine morphology and spine length were quantified using NeuroExplorer software (MicroBrightField). Mushroom spines were defined as spine with a neck and bearing a head, which was at least twice as large as the neck. Thin spines were defined as dendritic protrusions shorter than 5 μm and lacking a clearly defined head. All quantifications were done blind to the treatment.

5.2.3.5 Analysis of basket cell innervation

We quantified two aspects of basket cell axon innervation field – 1) the extent of perisomatic innervation around single neuronal somata (terminal branching and perisomatic GFP-positive bouton density) and 2) the percentage of potentially innervated cells in the field (percentage of innervation). We have previously shown that the vast majority of GFP-labeled boutons in our experimental condition most likely represent presynaptic terminals, by localization of pre- and post-synaptic markers and electron microscopy^{206,207,212}. For each experimental group, we took care to acquire an equal number of basket cells localized in layers 2/3 and 5/6 of the cortex. We acquired at least two confocal stacks of each basket cell axon arbor in the first 150 μm from the basket cell soma using a 63X glycerol objective (NA 1.3, Leica) and a Leica TCS SPE confocal microscope. The typical confocal stack size was 116.4 X 116.4 μm with an average depth of 40–70 μm and a z-step of 1 μm . Analysis of basket cell perisomatic innervation and bouton size was performed essentially as described by Chattopadhyaya *et al.* (2013). Briefly, in our Three-Dimensional Sholl analysis, Sholl spheres with a 1 μm increment from the center of a pyramidal soma were used to quantify basket axon terminal branch complexity and bouton density around the pyramidal cell soma. Axon branch complexity around a single pyramidal cell soma was quantified by the average number of intersections between basket cell axons and the Sholl spheres in the first 9 μm from the center

of the pyramidal cell soma. We choose 9 μm as the limiting radius for a Sholl sphere because it approximates the average pyramidal cell soma diameter measured from pyramidal neurons immunostained with NeuN antibody. Between 10 and 15 pyramidal neurons were analyzed for each basket cell. Bouton density around each pyramidal cell soma was measured within the same set of Sholl spheres and averaged among pyramidal neurons for each condition. Only pyramidal cell somata with Sholl spheres, which intersected the basket cell axon in the first 9 μm from the center of their soma, were taken for analysis. Using this approach, we obtained an unbiased estimate of the number of presumptive boutons on individual labeled pyramidal cell soma. The percentage of neuron somata innervated by a basket cell was defined in a confocal stack by the number of NeuN-positive cells contacted by at least one GFP-positive-bouton divided by the total number of NeuN-positive cells. This was repeated over all the fields of each basket axon and the results were averaged²¹⁵. All data were first averaged per basket cell, statistical analysis was then done using the number of basket cells as n .

5.2.3.6 Statistical analysis

Differences between groups were assessed with one-way ANOVA followed by post-hoc Holm-Sidak test for normally distributed data or one-way ANOVA followed by post-hoc Kruskal-Wallis test for not-normally distributed data. The cells analyzed derived from at least three different sets of experiments. Data are expressed in term of mean \pm standard error of mean (SEM).

5.2.4 Results

GABRA1 is broadly expressed in the nervous system and GABA_AR-mediated signalling plays multiple roles during development²¹⁶. In order to examine how different *GABRA1* mutants may affect the formation of dendritic spine and GABAergic bouton formation, we used a transgenic mouse carrying a conditional allele of *GABRA1*²¹¹, which allows cell-type and developmental-stage restricted knockdown of *GABRA1* synthesis. In this

floxed-*GABRA1* mouse (*GABRA1*^{lox/flox}), Cre-mediated recombination results in excision of exon 8, causing a shift in reading frame and premature termination of translation.

To inhibit *GABRA1* expression in isolated pyramidal neurons and GABAergic basket cells and simultaneously label their dendritic and axonal arbors at high resolution, we used a previously characterized promoter region P_{G67}²¹² to express either Cre recombinase together with GFP (P_{G67}-GFP/Cre) or GFP alone (P_{G67}-GFP) in cortical organotypic cultures of *GABRA1*^{lox/flox} mice (Figure 1). For pyramidal neurons, we focussed our analysis on dendritic spines, because dendritic spine alterations have been observed both in experimental animal models of epilepsy^{217,218} and in human epilepsy patients^{219,220}. GABAergic basket cells (BCs), which represent about 40% of all cortical GABAergic cells in rodents, form synapses onto the somata and proximal dendrites of excitatory pyramidal cells. Because of the perisomatic localization and strength of their synapses, BCs strongly control the firing output of pyramidal cells and are thought to be important contributors to the maintenance of the overall excitation/inhibition balance in the cortex²²¹. Further, BCs could act as a gate to prevent runaway excitation, which underlies the propagation of epileptiform activity²²². Previous studies have shown that the basic features of dendritic spine formation and of the maturation of perisomatic innervation by BCs onto pyramidal cells are retained in cortical organotypic cultures^{212,223,224}. We genetically manipulated pyramidal cells and BCs between the third and fourth postnatal week during which a significant and stereotyped maturation of BCs perisomatic innervation occurs^{206,212,225}. Pyramidal cells from *GABRA1*^{lox/flox} cultures transfected with P_{G67}-GFP/Cre (referred here on as *GABRA1*^{-/-} cells) from equivalent postnatal day 16 (EP16, P4 + 12 days *in vitro*) to EP24 showed no significant alterations in the overall spine density and morphology compared to age-matched control transfected only with P_{G67}-GFP (Figure 2G-H; Suppl Figure 1; total spine density *GABRA1*^{+/+} vs *GABRA1*^{-/-}; 0.63 ± 0.04 vs 0.71 ± 0.05 spine/μm; p>0.05). *GABRA1*^{-/-} BCs showed a significant reduction in the number of contacted target cells (Figure 3H; *GABRA1*^{+/+} vs *GABRA1*^{-/-}; 61 ± 2% vs 41 ± 3%; p<0.05). In turn, the perisomatic innervations they formed around contacted neurons did not differ from those formed by control age-matched BCs, in term of bouton density or terminal branching (Figure 3F; *GABRA1*^{+/+} vs *GABRA1*^{-/-}; 9.1 ± 0.5 vs 9.6 ± 0.7 boutons/soma; p>0.05). The axon density and average internode axon length were also not significantly different between these two groups

(Suppl. Figure 2), thus suggesting that knockdown of *GABRA1* in this developmental time window did not affect overall axon growth.

To explore whether and how specific *GABRA1* mutants associated with GGE affect pyramidal cell spine and BCs GABAergic bouton formation, we inactivated the endogenous *GABRA1* alleles and simultaneously re-introduced either *GABRA1*^{WT/WT} or each of the *GABRA1* mutant separately in single pyramidal and BCs from EP16-24. We choose this approach because global *GABRA1* manipulations may alter the excitation/inhibition balance of the whole slice, therefore making it difficult to distinguish between specific effects of distinct *GABRA1* mutants and unspecific, generalized effects of altered neuronal activity. In our experimental model, *GABRA1* was deleted only in sparse neurons in an otherwise wild-type background. It is therefore unlikely that the overall excitation levels in the slices was altered. A second critical advantage of our single-cell labeling/genetic manipulation approach is that we could visualize, reconstruct and quantify at high-resolution the dendritic and axonal arbours of single neurons with their putative boutons.

GABRA1^{WT/WT} expression in *GABRA1*^{-/-} pyramidal cells did not alter overall spine density (Figure 2G; *GABRA1*^{+/+} vs *GABRA1*^{WT/WT}; 0.63 ± 0.04 vs 0.74 ± 0.05 spine/ μm $p > 0.05$), although we observed a slight increase in the density of thin spines (Figure 2H; *GABRA1*^{+/+} vs *GABRA1*^{WT/WT}; 0.02 ± 0.005 vs 0.09 ± 0.02 thin spines/ μm ; $p < 0.001$). Importantly, *GABRA1*^{WT/WT} expression rescued the number of target cells contacted by each *GABRA1*^{-/-} BC (Figure 3H; *GABRA1*^{+/+} vs *GABRA1*^{WT/WT}; $61 \pm 2\%$ vs $59 \pm 4\%$; $p > 0.05$ and Figure 3H; *GABRA1*^{-/-} vs *GABRA1*^{WT/WT}; $41 \pm 3\%$ vs $59 \pm 4\%$; $p < 0.001$) suggesting that biolistic transfection of *GABRA1*^{WT/WT} under the P_{G67} promoter can drive the expression of enough protein to rescue *GABRA1* deficits in single cells.

Interestingly, we found that $\alpha 1$ -A322D expression in *GABRA1*^{-/-} pyramidal cells specifically and significantly increased both total spine density (Figure 2G; *GABRA1*^{+/+} vs *GABRA1*^{AD/AD}; 0.63 ± 0.04 vs 0.9 ± 0.1 spines/ μm ; $p < 0.05$) and the proportion of mushroom-like spines on pyramidal cells basal dendrites (Figure 2H; Suppl Figure 1; *GABRA1*^{+/+} vs *GABRA1*^{AD/AD}; 0.48 ± 0.05 vs 0.8 ± 0.1 mushroom spines/ μm ; $p < 0.05$). As dendritic spines are the preferential site

for glutamatergic synapse formation and mushroom spines in particular tend to show larger EPSCs compared to other spine types²²⁶, these data suggest that $\alpha 1$ -A322D expression may increase both the number and strength of excitatory synapses. In parallel, we found that $\alpha 1$ -A322D expression in *GABRA1*^{-/-} BCs rescued the loss of innervated targets caused by *GABRA1* deletion (Figure 3H; *GABRA1*^{+/+} vs *GABRA1*^{AD/AD}; $61 \pm 2\%$ vs $51 \pm 2\%$; $p > 0.05$) and further increased the number of GABAergic boutons formed by BCs onto target cell somata compared to age-matched controls (Figure 3F; *GABRA1*^{+/+} vs *GABRA1*^{AD/AD}; 9.1 ± 0.5 vs 13 ± 1 boutons/soma; $p < 0.05$), suggesting that $\alpha 1$ -A322D expression can increase the formation of GABAergic boutons.

Finally, we found that the expression of the other mutants, $\alpha 1$ -D219N or $\alpha 1$ -K353delins18X, had no effects on spine density and morphology in *GABRA1*^{-/-} pyramidal cells. On the other hand, $\alpha 1$ -D219N expression failed to rescue the loss of innervated targeted cells caused by *GABRA1* deletion (Figure 3H; *GABRA1*^{+/+} vs *GABRA1*^{DN/DN}; $61 \pm 2\%$ vs $46 \pm 5\%$; $p < 0.001$) and showed a trend towards reduced bouton density, which however did not reach significance (Figure 3F; *GABRA1*^{+/+} vs *GABRA1*^{DN/DN}; 9.1 ± 0.5 vs 7.5 ± 0.8 boutons/soma; $p > 0.05$). In summary, our data show a remarkably *GABRA1* mutant-specific effects on both dendritic spine and GABAergic bouton formation.

5.2.5 Discussion

All together, our data show for the first time that different *GABRA1* mutations associated with familial autosomal dominant GGE can affect dendritic spine and GABAergic bouton formation in a mutation-specific manner. Interestingly, *GABRA1* deletion in single pyramidal neurons did not affect their dendritic spine density or morphology, likely due to the compensatory action of other $\alpha 1$ subunits of GABA_AR. Consistently, $\alpha 2$ and $\alpha 3$ proteins were expressed at higher-level in the cerebral cortex of *GABRA1*-KO mice^{227,228}. In the same mouse model, global deletion of the $\alpha 1$ subunit triggered an increase in the density of postsynaptic sites expressing $\alpha 3$ subunit in the molecular layer of the cerebellum, which has been interpreted as a reorganization of cerebellar networks²²⁹. On the other hand, *GABRA1*

deletion reduced the extent of BC innervation field in a cell-autonomous fashion (Figure 3), indicating that compensatory expression of other alpha subunits may not occur in GABAergic cells or that changes in inhibitory inputs caused by the presence of GABA_AR lacking the $\alpha 1$ subunit may alter BC development. In fact, it has been shown that the maturation of the innervation field of GABAergic BCs is exquisitely dependent on neuron excitability and GABA release²⁰⁶⁻²⁰⁸. Consistent with this hypothesis, Purkinje cells from *GABRA1*^{-/-} mice lacked spontaneous and evoked IPSCs²³⁰. In addition, stellate cell synapses on Purkinje cells dendrites were reduced by 75% in the same mouse model²³⁰. Unexpectedly, the expression of $\alpha 1$ -WT in a knock-out background (*GABRA1*^{-/-} pyramidal neurons) increased the formation of thin spines, which are generally thought to represent immature/new synapses. One possibility is that the overexpression of $\alpha 1$ -WT causes excess inhibition, which in turn promotes the formation of new excitatory synapses²³¹. Quantitative analysis of inhibitory and excitatory inputs onto transfected neurons will be necessary to clarify this issue and will be the focus on future studies.

Surprisingly, we found that different $\alpha 1$ mutants have very different impacts on the development of GABAergic boutons and dendritic spines. The *GABRA1* mutant that showed the most dramatic effects on both pyramidal cell spines and basket cell innervation field was $\alpha 1$ -A322D. This observation is consistent with previous electrophysiological studies showing that this mutation has more severe effect *in vitro* on the gating properties of the GABA-evoked currents, compared to other *GABRA1* missense mutations^{135,183}. One possibility is that $\alpha 1$ -A322D may act as dominant negative. Using cell cultures, Ding and collaborators (2010) showed that $\alpha 1$ -A322D reduced the overall surface expression of GABA_AR by associating with the wild type subunits within the endoplasmic reticulum and preventing them from trafficking to the cell surface^{183,202}. Reduction in cell surface expression of GABA_AR resulted in decreased postsynaptic inhibition²⁰², which may in turn facilitate long-term potentiation (LTP) of excitatory synapses²³². One of the main effects of LTP is the increase in AMPA-receptor density at postsynaptic sites on dendritic spines^{233,234}, which correlate with the presence of more mature mushroom spines characterized by large heads²³⁵, consistently to what we observed (Figure 2). Similarly, reduction of inhibition onto BCs could promote GABA release and, subsequently, formation of GABAergic boutons^{206,208}. Therefore, these

results suggest that altered excitatory/inhibitory synaptic balance may be partially responsible for the increased excitability of cortical networks in human carriers of $\alpha 1$ -A322D.

Interestingly, $\alpha 1$ -D219N expression in *GABRA1*^{-/-} BC was unable to rescue the deficits in their innervation field, while it did not affect dendritic spine density. Our prior works showed that GABA_ARs containing $\alpha 1$ -D219N were trafficked to the membrane and that mutation altered GABA_A receptor gating kinetics. In particular, GABA_ARs containing $\alpha 1$ -D219N have slower desensitization rates and faster off-kinetics compared to wild-type receptors¹⁸³. It is therefore possible that reduced inhibition may be partially responsible for both altered development of GABAergic cells and increased excitability of neuronal circuits in human carriers of $\alpha 1$ -D219N. Finally, the expression of $\alpha 1$ -K353delins18X did not affect any of the developmental events we analyzed. We have previously reported that this frameshift mutation altered the downstream amino acid sequence and resulted in the introduction of a premature translation-termination codon (PTC)¹⁸³. The premature translation termination is likely to cause mRNA degradation by a process called nonsense-mediated mRNA decay²³⁶, thereby explaining why expression of $\alpha 1$ -K353delins18X did not affect the phenotype of *GABRA1*^{-/-} neurons.

All together, our data suggest that a “loss-of-function” model may not always explain the effects of *GABRA1* mutations on dendritic spines and GABAergic bouton formation. For example, reduced inhibition is most often mentioned as a cause of epileptic syndromes. Here, our data suggest that $\alpha 1$ -A322D may instead increase the number of dendritic spines, which are the preferential site of excitatory synapse formation, an event that may result in higher cortical excitation. These potential effects on developing neuronal networks need to be further explored by recording miniature inhibitory (mIPSCs) and excitatory (mEPSCs) postsynaptic currents in transfected neurons.

With the advance in the technology of large-scale multiplex sequencing or next-generation sequencing (NGS), it is now possible to obtain the sequence of the whole exome (WES) and even the whole genome (WGS) for a given individual. These methodological approaches are very powerful and are already opening new frontiers of genomics research. However, by

sequencing many more genomes, we will need *in vitro* models to determine the functional biological role of all new variants that we will find. The use of heterologous models such as HEK cells and xenopus oocytes may not be the best systems to test the impact of mutations in GABA_AR subunits. For example, despite a large number of studies, the functional alterations caused by missense mutations identified in *GABRG2* in epileptic patients are still not well understood. In fact, there is no consensus about the effect of the mutations R82Q, P83S, R177G and K328M on the GABA currents amplitude^{39,40,145,166,171,172,183,237-243}. As another example, it is still debated whether β 3-P11S, β 3-G32R and γ 2-P83S altered surface expression of the GABA_AR or of the subunit itself^{128,183,244,245}. In addition, the exclusive use of non-neuronal cells will not answer the question on how biophysical alterations in mutated receptor properties may alter brain development and ultimately lead to hyperexcitable networks. Here, we suggest that organotypic slice cultures may provide an accessible system for investigating the specific effects of GABA receptor mutants on neuronal development. Moreover, in contrast to what occur in dissociated neuronal cultures, organotypic slice cultures retain complex 3-dimensional interactions between different cell types as they occur *in vivo*. Therefore, we believe that the single cell genetic manipulation described here is a novel tool to understand how GABA_A receptor mutants disrupt neuronal circuit formation and will help define the pathophysiology of genetic epilepsy syndromes.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We are grateful to Caroline Meloche and Marylise Piché for animal handling and technical support. We thank also Dr. Devendra Amre who was consulted for statistical analysis. This work was supported by operating grants to P. Cossette from the Canadian Institutes for Health Research, the Savoy Foundation and Genome Canada. G. Di Cristo is supported by a Canada Research Chair and Savoy Foundation. P. Lachance-Touchette is supported by a doctoral fellowship from FRQS. We are grateful to Dr. Jean-Claude Lacaille (Université de Montréal) for data discussion.

5.2.6 Tableaux et figures

Figure 5.2.6.1. Figure 1. Schematic of the experimental approach

Figure 1.

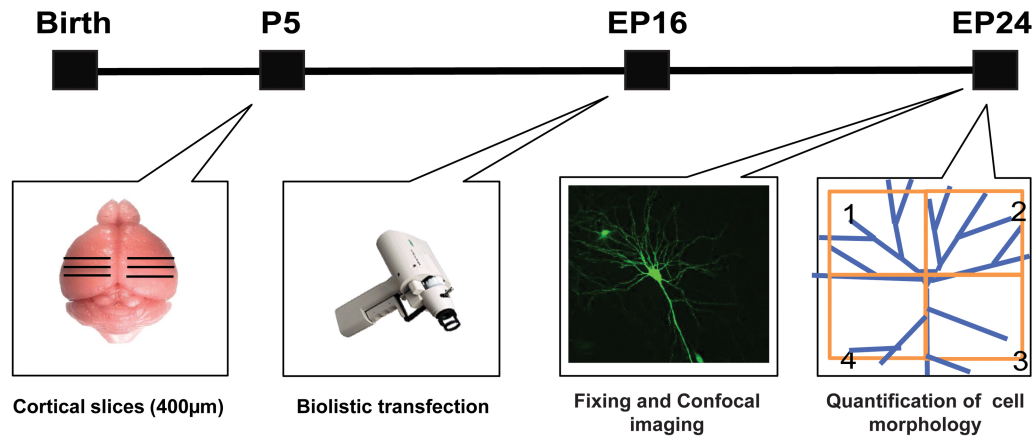


Figure 1. Schematic of the experimental approach. Single cell transfection strategy avoids altering the overall activity level in the cortex

Figure 5.2.6.2. Figure 2. $\alpha 1$ -A322D expression induces a significant increase in the number and maturation of dendritic spines in cortical pyramidal cells

Figure 2.

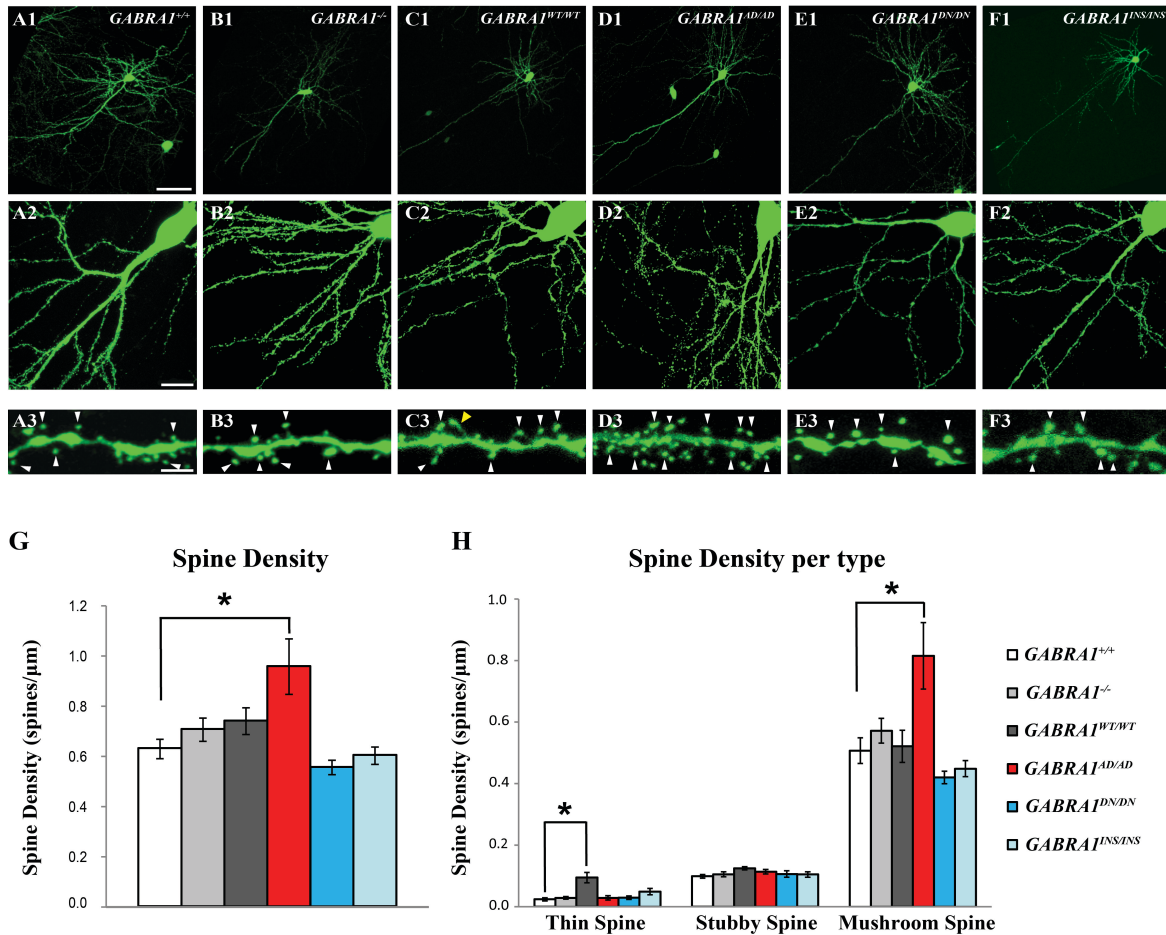


Figure 2. $\alpha 1$ -A322D expression induces a significant increase in the number and maturation of dendritic spines in cortical pyramidal cells. (A1-A3) Confocal images showing pyramidal cells transfected with GFP (green) alone (control, *GABRA1*^{+/+} cells) or (B1-B3) GFP and CRE (*GABRA1*^{-/-}) to knockdown endogenous $\alpha 1$ subunits, or GFP-CRE and either one of the wild-type or mutants $\alpha 1$ (C1-F3) to investigate the effects of different $\alpha 1$ mutants on spine density and morphology, in organotypic cultures. (A3-F3) High-magnification images of dendrites from pyramidal cells in A2-F2. White arrowheads indicates mushroom spines, yellow arrowhead indicate a thin spine. (G, H) $\alpha 1$ -A322D mutant pyramidal cells show significantly increased density of total (G) and mushroom-like spines

(**H**) compared to control age-matched pyramidal cells (1-way ANOVA; * $p < 0.05$). $\alpha 1$ -WT expression induces a significant increase in thin-like spines (**H**, 1-way ANOVA; * $p < 0.05$). GFP $n=7$; GFP-CRE $n=9$; GFP-CRE-WT $n=7$; GFP-CRE-A322D $n=7$; GFP-CRE-D219N $n=6$; GFP-CRE-K353delins18X $n=7$ pyramidal cells. Scale bars: **A1-F1**, 50 μm ; **A2-F2**, 10 μm ; **A3-F3**, 5 μm .

Figure 5.2.6.3. Figure 3. $\alpha 1$ -A322D expression induces a significant increase in synapses formed by GABAergic cortical basket cells

Figure 3.

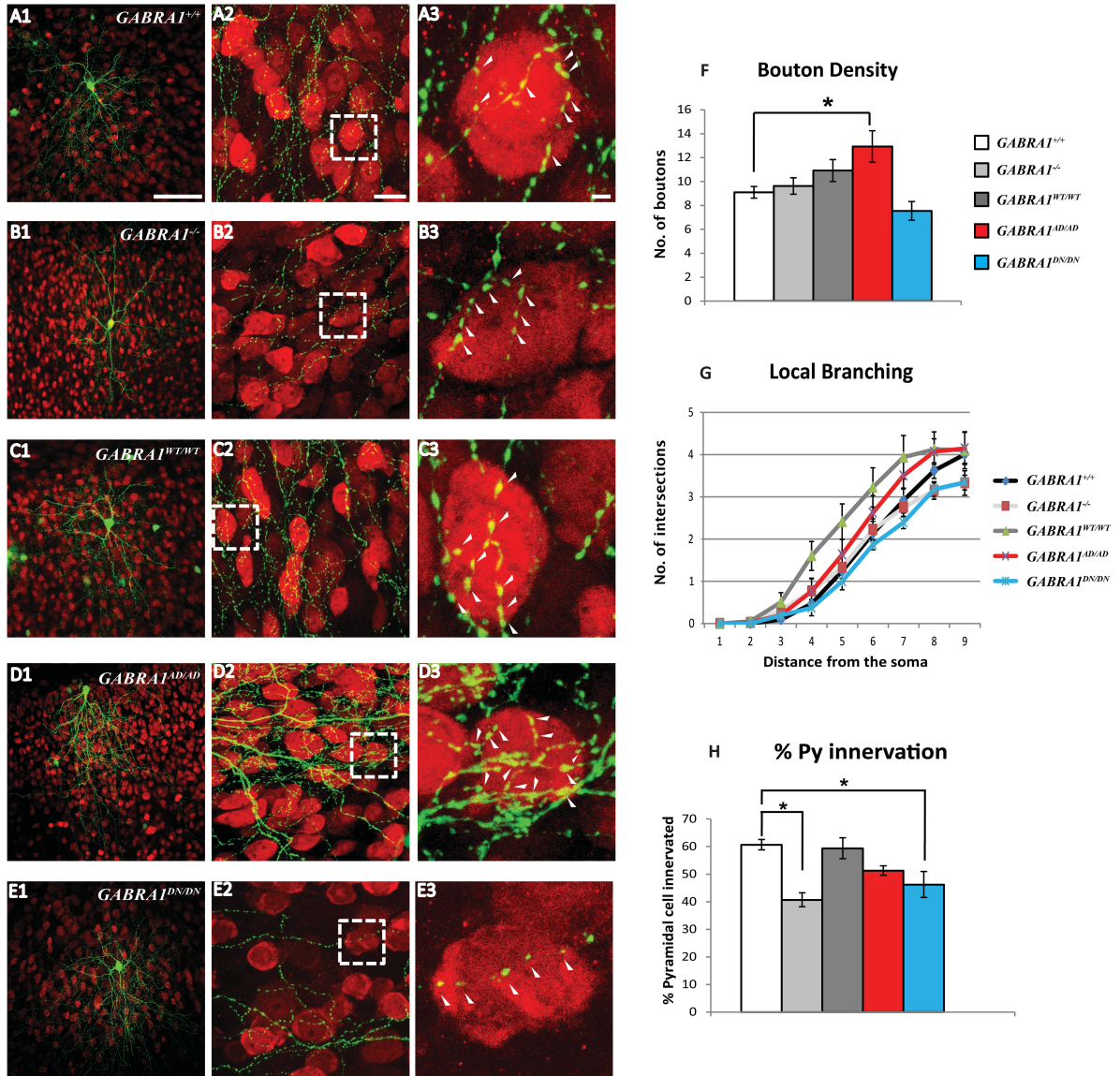
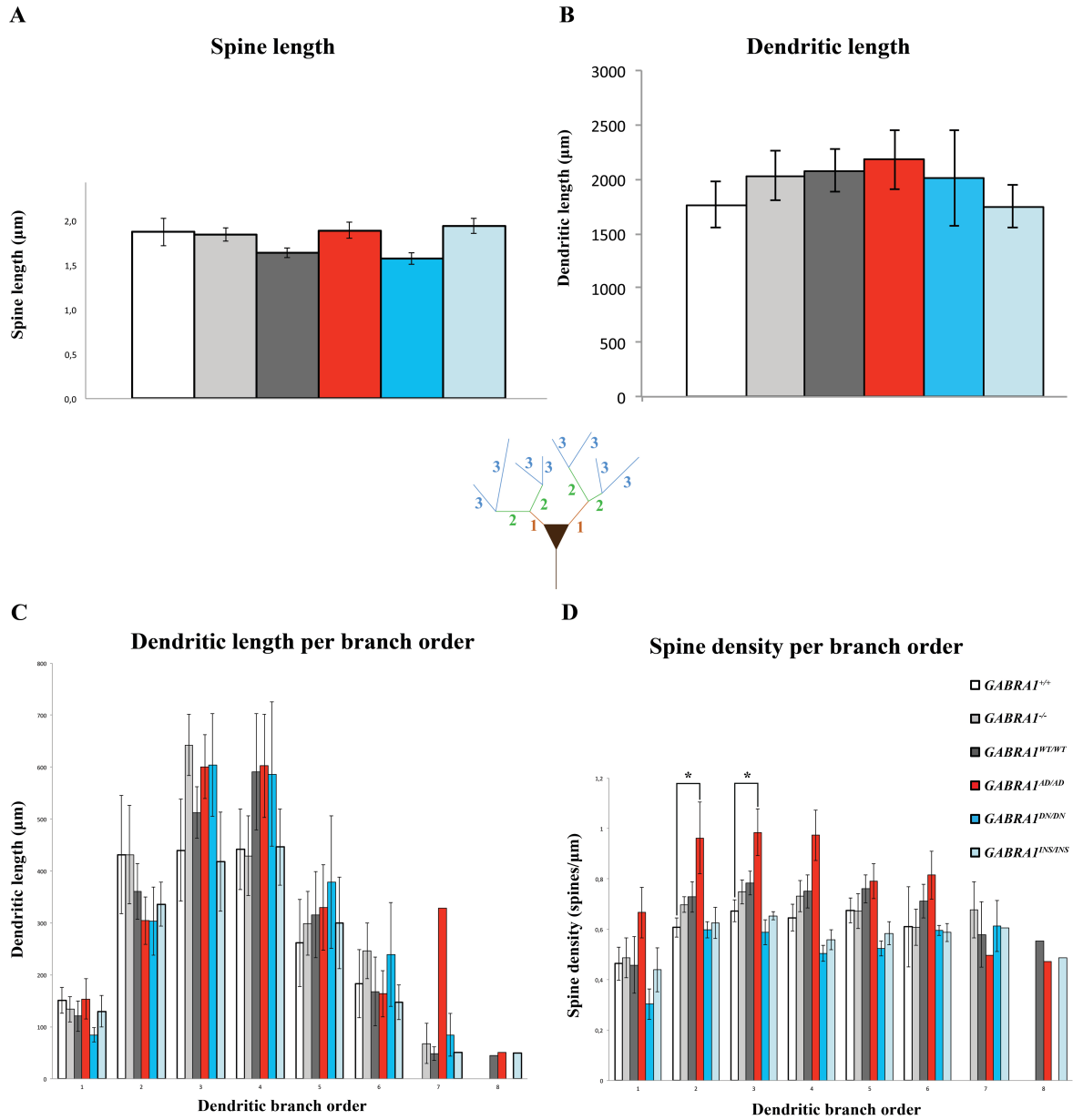


Figure 3. $\alpha 1$ -A322D expression induces a significant increase in boutons formed by GABAergic cortical basket cells. (A-E) Low (A1-E1) and high magnification (A2-E2) confocal images showing basket cells transfected with GFP (green) alone (A, *GABRA1*^{+/+} cells) or GFP and CRE (B, *GABRA1*^{-/-} cells), or GFP-CRE and either one of the

wild-type or mutants $\alpha 1$ subunits (**C-E**). Basket cells form terminal axon branching bearing numerous presynaptic boutons around NeuN (red)-positive somata (arrowheads). **A3-E3** are high-magnification images from boxed areas in **A2-E2**. (**F**) *GABRA1*^{-/-} basket cells transfected with $\alpha 1$ -A322D show significant increase in bouton density (**F**). Local branching (**G**) does not differ across the groups. (**H**) *GABRA1*^{-/-} basket cells contact less pyramidal somata compared to age-matched basket cells. This deficit is rescued by the expressions of $\alpha 1$ -wild-type or $\alpha 1$ -A322D but not of $\alpha 1$ -D219N (1-way ANOVA; * $p < 0.05$). GFP n=6; GFP-CRE, n=6; GFP-CRE-WT, n=6; GFP-CRE-A322D, n=6; GFP-CRE-D219N, n=4 basket cells. Scale bars: **A1-E1**, 50 μm ; **A2-E2**, 10 μm ; **A3-E3**, 5 μm .

Figure 5.2.6.4. Supplementary Figure 1. α 1-A322D expression induces a significant increase in spines density in cortical pyramidal cells

Supplemental Figure 1.

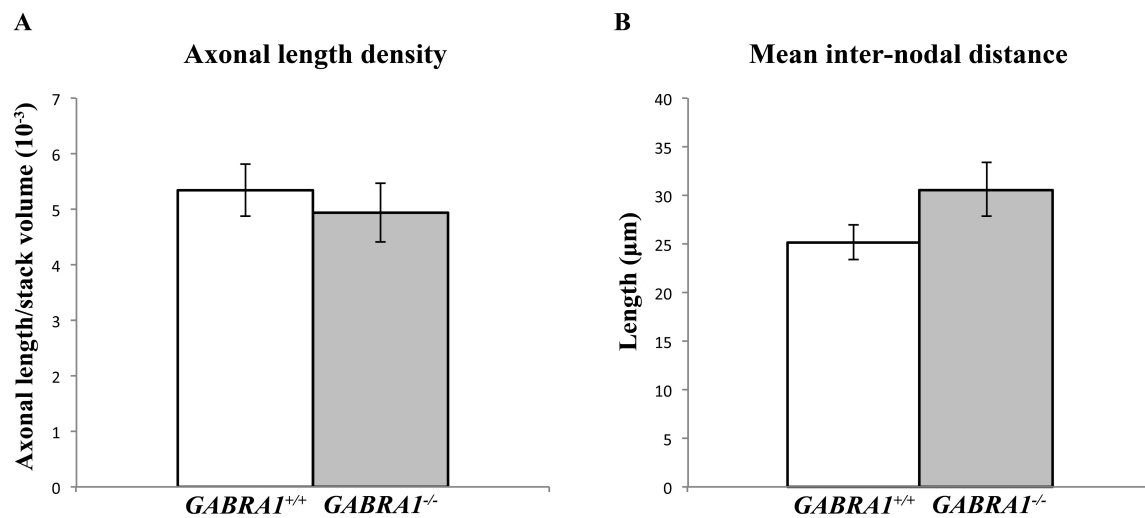


Supplemental Figure 1. α 1-A322D expression induces a significant increase in spines density in cortical pyramidal cells. (A) Spine length, (B) dendritic length and (C) dendritic length per branch order do not differ across the groups. (D) *GABRA1^{AD/AD}* mutant pyramidal

cells show significantly increased density of spines in dendritic branch order two and three compared to control age-matched pyramidal cells *GABRA1*^{+/+} (1-way ANOVA; *p<0.05). GFP n=7; GFP-CRE n=9; GFP-CRE-WT n=7; GFP-CRE-A322D n=7; GFP-CRE-D219N n=6; GFP-CRE-K353delins18X n=7.

Figure 5.2.6.5. Supplementary Figure 2. *GABRA1* knockdown does not alter the overall axonal morphology of BCs

Supplemental Figure 2.



Supplementary Figure 2. *GABRA1* knockdown does not alter the overall axonal morphology of BCs. (A) Axonal density and (B) inter-branch axonal length are not significantly different between *GABRA1*^{-/-} and *GABRA1*^{+/+} basket cells. GFP n=6; GFP-CRE, n=6 basket cells.

6. Discussion

6.1 Manifestations cliniques associées à des sous-unités mutantes du RGABA_A

6.1.2 Les syndromes épileptiques

La plupart des épilepsies héréditaires appartiennent à la grande famille des canalopathies. Jusqu'à présent, des mutations associées à l'épilepsie ont été identifiées dans 4 gènes du récepteur GABA_A: *GABRG2*, *GABRA1*, *GABRD* et *GABRB3*, codant respectivement pour les sous-unités $\gamma 2$, $\alpha 1$, δ et $\beta 3$. La vaste majorité de ces mutations ont été identifiées dans de grandes familles avec plusieurs individus atteints. Les porteurs expriment un large spectre phénotypique allant de crises généralisées aux convulsions fébriles. Le mode de transmission est généralement autosomique dominant, bien que des patrons de transmission plus complexes ainsi que des mutations *do novo* ont été rapportées. Les manifestations cliniques des ces familles sont résumées dans le tableau 6.1.1.

6.1.2.1 *GABRG2*

De façon concomitante, les premières mutations dans *GABRG2* ont été décrites dans une famille avec GEFS+ et une famille avec convulsions fébriles et absences^{39,40}. Depuis, les nombreuses études fonctionnelles traitées plus bas ont démontré l'implication de ce gène dans la pathogénèse de l'épilepsie. Le criblage de *GABRG2* dans plusieurs cohortes composées de patients GEFS+ a permis de décrire 10 mutations additionnelles. Bien que *GABRG2* ne soit pas associé à un phénotype précis, un dénominateur commun semble se dessiner. En effet, la moitié des variants retrouvés dans *GABRG2* conduit à la production de protéines tronquées. Même si les liens génotype-phénotype sont difficiles à établir, il n'en demeure pas moins que le gène *GABRG2* possède un nombre anormalement élevé de mutations non-sens. *GABRG2* a été largement investigué dans les formes familiales d'ÉGG, et la venue prochaine de résultats portant sur des cohortes de cas sporadiques modifiera assurément la liste ci-dessous.

6.1.2.2 *GABRA1*

Notre laboratoire a localisé en 5q34 le premier gène responsable de l'épilepsie myoclonique juvénile à transmission autosomique dominante (JME)⁴¹. La mutation Ala322Asp a été identifiée dans le gène *GABRA1* dans une grande famille JME⁴¹. En 2006, le criblage de *GABRA1* chez 98 cas CAE a permis d'identifier la première délétion nucléotidique entraînant la production d'une protéine tronquée chez un cas atteint d'épilepsie-absence de l'enfant¹²⁵. Notre travail de reséquençage a également permis de greffer deux nouvelles familles ÉGG au tableau¹⁸³. L'utilisation des technologies de séquençage à haut débit a donné un second souffle à la génétique des épilepsies et nous a démontré que les phénotypes cliniques associés à *GABRA1* sont plus hétérogènes que ce que nous avons préalablement envisagé. Au cours de la dernière année, le consortium Epi4K a rapporté une mutation *de novo* associée au syndrome de West⁸³. Ce syndrome est aussi connu sous le nom de spasmes infantiles et se caractérise par la survenue de séries de contractions musculaires involontaires chez les nourrissons. L'implication de *GABRA1* dans des formes plus sévères d'épilepsie a également été identifiée dans une récente étude qui a combiné le séquençage d'exomes entiers, de même que le reséquençage de gènes candidats déjà associés à l'épilepsie chez une cohorte de patients atteints du syndrome de Dravet. Quatre nouvelles mutations dans *GABRA1* ont ainsi pu être associées à ce phénotype¹⁸². Ces dernières publications soulignent la complexité de la génétique des épilepsies et dénotent par le fait même l'implication de *GABRA1* dans le « background » génétique de syndromes épileptiques tant sévères que bénins.

6.1.2.3 *GABRD*

Comparativement à *GABRG2* et *GABRA1*, nous retrouvons de plus petites familles (3 atteints et moins) dans les cas où le gène *GABRD* a été associé. Le variant faux-sens R220H sous la forme homozygote a initialement été présenté comme un facteur de susceptibilité pour l'épilepsie. Malgré des études fonctionnelles *in vitro* concluantes, les études d'association ultérieures ont mis un bémol sur la pathogénicité de ce polymorphisme^{80,189}. Le variant R220C a quant à lui été rapporté dans deux études indépendantes^{126, Lachance-Touchette et al., 2014}.

6.1.2.4 *GABRB3*

Pour l'instant, les phénotypes associés aux mutations dans *GABRB3* sont majoritairement homogènes. Ils se divisent en deux groupes apparaissant au cours de l'enfance, soient les épilepsies absences et les encéphalopathies épileptiques. Une équipe sud-américaine ainsi que notre laboratoire ont décrit 5 familles partageant des mutations faux-sens (P11S, S15F et G32R) dans la sous-unité $\beta 3$ du récepteur GABA_A ^{38,128}. Le consortium Épi4k cité plus haut a quant à lui rapporté 4 nouvelles mutations dans 4 cas sporadiques⁸³. En effet, un patient avec spasmes infantiles et 3 autres individus atteints du syndrome de Lennox-Gastaut ont été déclarés comme étant porteurs de variants *de novo* dans *GABRB3*. Les encéphalopathies épileptiques sont un regroupement de conditions sévères rassemblant des syndromes où une détérioration des fonctions cérébrales (cognitives, sensorielles et/ou motrices) est due à l'activité épileptique²⁴⁶. Est-ce qu'un mécanisme pathologique commun peut être partagé par des maladies neurodéveloppementales même si celles-ci ne font pas partie du même spectre de sévérité? À prime à bord, il peut être difficile de l'envisager mais les études fonctionnelles détaillées plus bas sur les mutations dans *GABRB3* soulèvent l'hypothèse que la régulation de ce gène pourrait contribuer à l'épileptogénèse.

Bien que les variants présents dans les gènes codant pour les sous-unités du récepteur GABA_A ont été retrouvés pour la plupart qu'une seule fois dans une famille (mutations privées), il n'en demeure pas moins que ces locus identifiés sont d'une importance capitale pour la génétique des épilepsies. Les variants *GABRG2-R82Q* et *GABRB3-P11S* ont néanmoins été retrouvés chez plusieurs individus et les récentes découvertes de variants *de novo* nous ont également poussés à élargir notre champ d'investigation puisque ces gènes n'étaient plus seulement associés à des mutations privées familiales. Cela justifie l'addition de cas sporadiques lors de nos études génétiques subséquentes et contribue à établir *GABRA1*, *GABRB3* et *GABRG2* comme des gènes importants pour la susceptibilité à l'épilepsie.

Tableau 6.1.1. Liste des variants des sous-unités du récepteur GABA_A associés à l'épilepsie

Gènes	Locii	Mutations	Phénotypes	Mode de transmission	Nombre de familles/cas/contrôles	Références
<i>GABRD</i>	1p36.33	E177A	GEFS+	AD	1 famille	Dibbens et al., 2004
		R220H	GEFS+/GGE/FS	AD	R=41 307/846	Dibbens et al., 2004; 2009; Lenzen et al., 2005
		R220C	GEFS+	ND	1 familles	Dibbens, 2004
<i>GABRG2</i>	5q34	Q40X	DS	AD	1 famille	Ishii et al., 2014
		N79S	GTCS	ND	1 cas	Shi et al., 2010
		R82Q	CAE/FS	AD/ND	1 famille + 25 cas + 8 contrôles	Wallace et al., 2001; Hancili et al., 2014
		P83S	FS/AE	AD	1 famille	Lachance-Touche et al., 2011
		R136X	GEFS+	AD	1 famille	Johnston et al., 2014
		R177G	FS	AD	1 famille	Audenaert et al., 2006
		IVS6+2T→G	CAE/FS	AD	1 famille	Kanamura et al., 2002
		R323Q	MAE	De Novo	1 cas	Carvill et al., 2013
		K328M	GEFS+	AD	1 famille	Baulac et al., 2001
		Q390X	GEFS+	AD	1 famille	Harkin et al., 2002
		W429X	GEFS+	AD	1 famille	Sun et al., 2008
		S443delC	GEFS+	AD	1 famille	Tian et al., 2013
		<i>GABRA1</i>	5q34	T20I	GGE	ND
R112Q	DS			De Novo/ND	2 cas	Carvill et al., 2014
D219N	FS/AE			AD	1 famille	Lachance-Touche et al., 2011
G251S	DS			De Novo	1 cas	Carvill et al., 2014
T292I	Spasmes infantiles			De Novo	1 cas	Epi4K and EPGP Investigators, 2013
K306T	DS			De Novo	1 cas	Carvill et al., 2014
A322D	JME			AD	1 famille	Cossette et al., 2002
<i>GABRB3</i>	15q12	S326fs328X	CAE	De Novo	1 cas	Majjevik et al., 2006
		K353delins18X	GGE	AD	1 famille	Lachance-Touche et al., 2011
		P11S	CAE/Autism	AD	3 familles	Tanaka et al., 2008; Lachance-Touche et al., 2010
<i>GABRB3</i>	15q12	S15F	CAE	AD	1 famille	Tanaka et al., 2008
		G32R	CAE	AD	1 famille	Tanaka et al., 2008
		N110D	Spasmes infantiles	De Novo	1 cas	Epi4K and EPGP Investigators, 2013
		D120N	Syndrome Lennox-Gastaut	De Novo	1 cas	Epi4K and EPGP Investigators, 2013
		E180G	Syndrome Lennox-Gastaut	De Novo	1 cas	Epi4K and EPGP Investigators, 2013
		Y302C	Syndrome Lennox-Gastaut	De Novo	1 cas	Epi4K and EPGP Investigators, 2013

Abbréviations: AD, autosomique dominant; AE, épilepsie-absence; CAE, épilepsie-absence de l'enfant; DS, syndrome de Dravet; FS, crises fébriles; GEFS+, épilepsie généralisée avec convulsions fébriles plus; GGE, épilepsie génétique généralisée; GTCS, crises généralisées tonico-cloniques; JME, épilepsie myoclonique juvénile; MAE, épilepsie myoclonique infantile; ND, non-disponible.

6.1.2 Autres syndromes neurologiques

L'épilepsie est une maladie présentant une forte comorbidité. En effet, il est fréquent que des troubles de la cognition, des troubles du comportement, un retard mental ou encore des troubles psychiatriques y soient associés²⁴⁷. Globalement, l'incidence des troubles psychiatriques est plus élevée chez des patients atteints d'épilepsie que dans la population générale²⁴⁸. Selon une étude épidémiologique sur 713 patients épileptiques réalisée en Scandinavie, la prévalence d'un trouble mental est de 5,9%²⁴⁹. Dans une seconde étude américaine menée chez 125 individus ayant reçu un diagnostic d'épilepsie dans les 6 dernières années, 19% d'entre eux présentent des difficultés d'apprentissage et ont des problèmes psychosociaux²⁵⁰. Une telle comorbidité contribue certainement à diminuer la qualité de vie des patients épileptiques²⁵¹.

Les gènes GABRA se sont également révélés être impliqués dans l'étiologie de d'autres maladies neurologiques. Suite à une étude d'association pangénomique (GWAS)²⁵², un raffinement du phénotype sur une cohorte de 1868 patients atteints de troubles bipolaires a révélé une forte association entre un groupe de 279 cas souffrant de troubles schizo-affectif de type bipolaire (SABP) et le polymorphisme rs768032 dans *GABRB1*²⁵³. De plus, la transmission GABAergique occupe un rôle central dans le développement du SNC. Il n'est donc pas surprenant que ce mécanisme neuronal puisse être en cause dans des maladies neurodéveloppementales autres que l'épilepsie. Une délétion du locus 15q11-13 d'origine maternelle est responsable de plus de 70% des individus atteints du syndrome d'Angelman. Lorsque cette dernière est d'origine paternelle elle est à l'origine du syndrome de Prader-Willi²⁵⁴. Bien que la délétion de cette région critique ne soit pas le seul mécanisme génétique menant à ces syndromes, les défauts d'expression d'un ou plusieurs gènes de ce locus où se

retrouvent trois gènes GABRA (*GABRB3*, *GABRA5* et *GABRG3*) sont à l'origine de la majorité des cas ($\geq 75\%$)²⁵⁵. Des changements dans la composition des sous-unités du RGABA_A ont été observés dans le syndrome de l'X fragile ainsi que dans la sclérose tubéreuse (TSC : *Tuberous Sclerosis Complex*). Plusieurs études ont montré une association entre des polymorphismes communs du gène *GABRB3* et les troubles du spectre autistique (TSA)²⁵⁶⁻²⁵⁸ de même que chez un groupe de patients souffrant de stress post-traumatique avec insomnie chronique²⁵⁹. En effectuant une méta-analyse sur des données de GWAS, Weng *et al.*, 2010 ont rapporté une association significative entre le SNP rs12201676 localisé à proximité des gènes *GABRR1* et *GABRR2* et la schizophrénie en plus des troubles bipolaires²⁶⁰. Ces deux gènes contribueraient également au risque de développer une dépendance à l'alcool. En effet, une étude d'association sur 1923 patients provenant de familles multiplexes a démontré une association significative entre des SNPs retrouvés dans les gènes *GABRR1* et *GABRR2* et cette condition²⁶¹. Les variants rares semblent également jouer un rôle dans la comorbidité entre l'épilepsie et l'autisme. La mutation P11S-*GABRB3* (voir tableau 6.1.1) a par ailleurs été retrouvée dans des familles TSA²⁴⁴. Ce gène étant fortement exprimé dans le cerveau au cours du développement²⁶², *GABRB3* s'avère être un facteur de susceptibilité majeur commun à ces pathologies. D'autre part, le criblage de 111 gènes synaptiques sur chromosome X dans des cohortes de patients TSA (n=142) et schizophréniques (n=143) ont permis d'identifier des variants rares M102I et T12S respectivement sur les gènes *GABRQ* et *GABRA3*²⁶³. Ces variants induisent l'utilisation de sites d'épissage alternatifs créant ainsi des protéines tronquées²⁶⁴.

6.2 Modèle animaux destinés à l'étude du $RGABA_A$

L'expérimentation animale reste indispensable pour comprendre les mécanismes intimes qui régissent le dysfonctionnement d'un réseau neuronal épileptique. Les méthodes *in vitro*, si sophistiquées soient-elles, ne peuvent reproduire entièrement la complexité d'un organisme vivant. La nature complexe de l'épileptogénèse requière une investigation dans des modèles *in vivo* (Tableau 6.2.1). Leur utilisation permet notamment d'évaluer l'impact des mutations à plusieurs niveaux organisationnels dans le cerveau. Il est ainsi plus facile d'établir des liens génotypes-phénotypes. Les études utilisant des méthodes invasives chez l'humain ne sont pas envisageables dans le cas de l'épilepsie généralisée. Les modèles *knock-in* (KI) pourraient même permettre de tester des drogues antiepileptiques avant l'apparition des crises (créant ainsi une nouvelle fenêtre d'intervention thérapeutique). Les modèles d'animaux transgéniques permettent l'étude de l'impact des variants sur le développement cérébral. En effet, les modèles *in vivo* permettent d'étudier l'implication d'un variant dans la pathophysiologie sur une plus grande échelle de temps comparativement aux modèles hétérologues. Il est également possible d'étudier les adaptations développementales du système nerveux à l'expression de mutations et par le fait même rechercher comment celles-ci mènent à la formation d'un système anormal.

Tableau 6.2.1. Liste des modèles de souris knock-out et knock-in pour les gènes *GABRD*, *GABRG2*, *GABRA1* et *GABRB3*

Gènes	Modèles		Pharmacologie	Phénotypes			Références					
	Types	Détails		Morphologiques	Comportementaux	Physiologiques						
<i>GABRD</i>	Souris KO (Mihalek et al., 1999)		Atténuation de la réponse aux neurostéroïdes Réduction de la consommation d'éthanol (libre choix) ↓ de l'effet anticonvulsant de l'éthanol ↓ de la sensibilité au THIP, muscimol	↓ fécondité (5%)	Convulsion durant sevrage de l'éthanol (suite à exposition chronique)	↑ rapidité du <i>decay time</i> des mIPSCs ↑ des sous-unités $\alpha 1$, $\beta 3$ et $\gamma 2$ et ↓ $\alpha 4$ ↑ nb de RGABAA type $\alpha \beta$	Mihalek et al., 1999, 2001; Treter, 2001; Korpi, 2002; Spigelman, 2002; Spigelman, 2003; Boehm II, 2006					
<i>GABRG2</i>	Souris KO (Günther et al., 1995)	Homozygote		Mortalité néonatale Déficit locomoteur	Anxiété chronique Décharges pointe-ondes	↓ conductance du RGABAA ↓ de la densité des RGABAA ↓ mPSCs ↓ du <i>clustering</i> synaptiques	Günther et al., 1995; Essrich et al., 1998					
								Homozygote	Naisances rares, apparence physique altérée, tremblements sévères, dysfonction neurologique sévère, meurt avant P19	Crises spontanées avec absences (début à P20) Immobilité accompagnée de décharges pointe-ondes à 6-7 Hz (SWD)	↓ de la sous-unité $\gamma 2$ ↓ de l'amplitude des mIPSCs Déficit de l'efficacité d'inhibition dans le cortex somatosensoriel	Tan et al., 2007; Hill et al., 2011
	Souris KI conditionnel (R43Q) (Chiu et al., 2008)	Expression de l'allèle mutante après P21	↓ seuil de convulsion par le pentylentétrazol (PTZ)	↓ phénotypes épileptiques		Chiu et al., 2008						

Gènes	Modèles		Pharmacologie		Morphologiques		Phénotypes		Références
	Types	Détails				Comportementaux	Physiologiques		
<i>GABRA1</i>	Souris KO (Vicini et al., 2001)		Perte des sites de liaison au BZ de type I ↑ de la sensibilité au diazépam ↓ de la sensibilité au zolpidem ↓ seuil de convulsion par la bicuculline	↓ de la masse corporelle		Épilepsie avec absences Tremblements	↑ durée des IPSCs dans le cortex et le cervelet ↓ de la fréquence et de l'amplitude des mIPSCs ↓ de la densité des RGABAA ↑ des sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$; ↓ $\beta 2$, $\beta 3$ et $\gamma 2$	Vicini et al., 2001; Goldstein et al., 2002; Kralic et al., 2002a; Kralic et al., 2002b; Kralic et al., 2006	
	Souris KO (Sur et al., 2001)	Gène sélectivement enlevé des cellules de Purkinje		↓ de la sensibilité au zolpidem	↓ de la masse corporelle ↓ du nombre d'épines matures (de type "mushroom")		↓ de la densité des RGABAA ↑ des sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$; ↓ $\beta 2$, $\beta 3$ et $\gamma 2$	Sur et al., 2001; Reynolds et al., 2003; Heinen et al., 2003; Blednov et al., 2002; Bosman et al., 2005; Britatore et al., 2010	
	Souris KO conditionnel (Britatore et al., 2010)						↓ de l'innervation GABAergique		
<i>GABRB3</i>									
	Souris KO (Homanics et al., 1997)	Homozygote	associée au syndrome d'Angelman, à l'épilepsie et à l'autisme	↓ du nb de sites GABA et BZ (50%)	Mortalité néonatale (90%) Fente palatine ↓ de l'espérance de vie	Hyperactivité, déficits neurologiques Crises généralisées, tonico-cloniques, myocloniques, EEG anormal Déficits moteurs, faible coordination motrice, hypotonique Déficits comportementaux	↑ de la densité des RGABAA ↓ amplitude du courant-GABA (80%)	Homanics et al., 1997; Del'orey et al., 1998; Hashemi, 2007; Del'orey, 2008	
		Hétérozygote			↑ de la région pericoeruleus (LC)				
						EEG anormal	↓ amplitude du courant-GABA (25%)	Homanics et al., 1997	

Le modèle knock-out (KO) *GABRG2* chez la souris est létal après la naissance (Tableau 6.2.1). Les souris mutantes présentent des épisodes anormaux d'hyperactivité qui pourraient être compatibles avec des convulsions néonatales²⁶⁵. En 2007, un groupe de chercheurs australiens ont produit la première souris *knock-in GABRG2* (R43Q)¹⁷⁵. Les souris homozygotes pour la mutation *GABRG2*^{R43Q/R43Q} naissent rarement et lorsqu'elles arrivent à terme, elles présentent d'importants troubles développementaux. Ces dernières sont sujettes à des tremblements sévères et meurent habituellement avant P19 (nombre de jours postnataux). La souris hétérozygote *GABRG2*^{R43Q/+} présente des absences accompagnées de pointes-ondes (SWDs). La mutation a été insérée dans deux lignées avec des fonds (*background*) génétiques distincts (C57BL/6 et DBA/2J). Ces souches ont respectivement la plus haute et la plus faible résistance aux crises d'épilepsie chez les lignées couramment utilisées²⁶⁶. La pénétrance de R43Q est plus grande chez la souche DBA/2J (>90%) et la durée des épisodes pointes-ondes est plus longue. Par contre, le background génétique n'a pas affecté la fréquence, l'amplitude et le taux d'apparition des SWDs. Parallèlement à l'épilepsie absence de l'enfant chez l'humain, les crises se manifestent tôt dans le développement vers P20 et s'intensifient vers P24 dans ce modèle KI. Le phénotype épileptique a été observé jusqu'à P133. Il ne semble pas avoir de remission ou d'aggravation des symptômes. Le courant GABA est réduit dans les neurones pyramidaux corticaux. Une réduction de l'inhibition corticale pourrait être à l'origine des absences dans ce modèle. Aucun changement dans le patron d'expression de $\gamma 2$ et de $\alpha 1$ n'a été observé pour la souris hétérozygote *GABRG2*^{R43Q/+}. Le même groupe a ensuite fabriqué une souris dans laquelle ils ont manipulé l'expression temporelle de $\gamma 2$ ¹⁷⁶. Ce système permet de mieux comprendre les liens entre une modification génétique et les mécanismes impliqués lors du développement ou encore de la vie adulte. Ils ont réduit l'expression de l'allèle mutante Q43 au cours du développement (de la conception jusqu'à P21). Cette réduction a entraîné un retard dans l'apparition des crises. On peut y voir ici un moyen futur de prévenir l'état épileptique au stade adulte chez les porteurs en intervenant dans les premières semaines de vie post-natales. De plus, les études fonctionnelles subséquentes ont démontré une plus grande susceptibilité aux crises induites par la température pour la souris *GABRG2*^{R43Q/+}²⁶⁷. Un volet d'étude a été jusqu'à présent négligé. Aucune étude morphologique n'a à ce jour évalué l'impact de R43Q sur la synaptogénèse, l'élongation neuronale ou encore sur l'arborisation axonale.

Deux modèles *knock-out* (KO) *GABRA1* chez la souris ont été publiés en 2001 (Tableau 6.2.1)^{211,268}. À l'origine, aucun des deux groupes n'a dénoté de phénotypes épileptiques apparents chez leur modèle *GABRA1*^{-/-}. En 2002, Kralic et al., 2002 ont évalué une réduction du seuil de convulsions induit par la bicuculline de 37%. Des tremblements chez la souris *GABRA1*^{-/-}²¹¹ ainsi qu'une augmentation de la sévérité des crises comparativement à la souris WT ont certes été mentionnés, mais ces observations ne furent malheureusement pas quantifiées. Les publications subséquentes ont utilisé ces modèles principalement dans l'optique de mieux comprendre la pharmacologie du récepteur GABA_A ainsi que l'implication de la sous-unité $\alpha 1$ dans sa physiologie dont, entre autre, les processus compensatoires entre les différentes sous-unités^{229,269-274}. Ce mécanisme compensatoire fut d'ailleurs suspecté afin de justifier l'absence de phénotype²⁷¹. Kralic et al., 2006 ont même stipulé que ces changements « adaptatifs » en l'absence de $\alpha 1$ entraînaient une profonde réorganisation cérébelleuse qui préviendrait le déséquilibre de l'excitabilité neuronale²²⁹. Fritschy et al., 2006 ont observé une réduction de 75% des synapses des neurones stellaires sur les dendrites des PCs et n'ont pas enregistré de courants GABAergiques (IPSCs) toniques ou phasiques dans les PCs de la souris *GABRA1*^{-/-}²³⁰.

De plus, la souris *GABRA1*^{-/-} a été proposée comme un modèle de tremblement essentiel par Kralic et al., 2005. Les souris se développent normalement mais montrent des tremblements lorsqu'elles se déplacent librement dans sa cage. Des tremblements « pathologiques » de grande puissance (amplitude) à des fréquences de 17-21 hertz (Hz) ont été enregistrés chez la souris *knock-out* homozygote lorsqu'elle était suspendue par la queue. Ces dernières démontraient une altération significative de leurs capacités à se maintenir sur la poutre rotative (Rotarod). Les auteurs ont ainsi conclu à une incoordination motrice importante. Ces phénotypes persistent dans le temps (mesurés jusqu'à 3 ans de vie) et à travers les générations (testés sur 9 générations). Des enregistrements électrophysiologiques sur des coupes cérébelleuses ont démontré une perte complète de l'inhibition GABAergique dans les cellules de Purkinje (PC)²⁷⁵. Il faut toutefois noter que malgré la pertinence de cet article, ce dernier n'a pas fait d'enregistrements électroencéphalographiques sur le modèle *GABRA1*^{-/-} et n'a pas suscité l'intérêt voulu dans la communauté scientifique.

Au cours de l'année où nous avons acquis la souris B6.129(FVB)-*Gabra1*^{tm1Geh}/J de Dr Rudolph, Arain et *al.*, 2012 ont publié les résultats de leur étude en EEG sur ce même modèle. Leurs résultats les plus pertinents furent les enregistrements de pointes-ondes (SWDs) ainsi que d'absences pour la souris *GABRA1*^{-/+}, et ce peu importe le *background* génétique (C57BL/6J et DBA/2J). Les SWDs étaient significativement plus fréquents chez les femelles que chez les mâles. Après P19, le taux de mortalité augmentait dans les deux souches KO comparativement à la souche sauvage et était plus élevé chez C57BL/6J¹⁹⁹. Cet article a enregistré pour la première fois des crises épileptiques chez le modèle KO-*GABRA1*. Par contre, une investigation plus détaillée de la sémiologie des crises devrait être effectuée à moyen terme afin de mieux décrire le phénotype épileptique.

La délétion de $\beta 3$ chez la souris est associée avec des crises épileptiques (Tableau 6.2.1)²⁷⁶. En moyenne 90% des *GABRB3*^{-/-} meurent dans les premiers 24 heures de vie. Les souris qui survivent (10%) sont physiquement amoindries, hyperactives et montrent une mauvaise coordination motrice et de mauvaises performances lors d'examens sur l'apprentissage et la mémoire²⁷⁶⁻²⁷⁸. Certains groupes ont associé la présence de fente palatine, d'épilepsie et de certaines caractéristiques comportementales de cette souris au syndrome d'Angelman^{276,277,279}.

La majorité des autres lignées *knock-out* pour les gènes codants pour des sous-unités du RGABA_A tels que les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 2$, $\gamma 3$ et δ ne sont pas associées avec un phénotype épileptique clair^{268,280-283}. Elles sont en santé, fertiles et démontrent peu de phénotypes comportementaux.

6.3 Altération des fonctions du RGABA_A mutant

6.3.1 Investigations *in silico* des mutations dans les sous-unités du RGABA_A

Dans un premier temps, le nombre croissant de variants détectés suite au séquençage d'un ou plusieurs gènes a rendu nécessaire le développement d'outils bioinformatiques spécifiques à ces nouveaux jeux de données. Le chapitre 4 illustre parfaitement la difficulté que nous rencontrons à effectuer un lien de cause à effet entre les variants génétiques rares et la maladie. Cet article démontre également comment ces outils peuvent en faciliter l'analyse et contribuer à prédire leurs impacts, qu'ils soient pathogéniques ou bénins. Un certain nombre de paramètres tels que la conservation orthologue de la région concernée, la conservation dans les domaines similaires, les propriétés physico-chimiques, l'analyse des structures secondaires et tertiaires, les changements de polarité et/ou de la charge de l'acide aminé substitutif ou encore la prédiction de l'impact sur l'épissage doivent être considérés afin de prédire l'effet pathogène des variants. La combinaison de ces programmes permet d'établir une liste de priorisation des mutations basée sur leur caractère causal. Malgré les limites de ces programmes, un consensus existe quant à leur utilité. En effet, une étude a démontré que les logiciels Sift et PROVEAN étaient comparables et que leur « performance » pour établir avec précision l'effet délétère d'un variant était évaluée entre 75 et 80%²⁸⁴. De plus, Tavtigian *al.* ont décrit comment la combinaison de plusieurs algorithmes d'analyse de variants faux-sens conduisait à une meilleure analyse *in silico*²⁸⁵. Chan *et al.* ont quant à eux utilisé 254 substitutions d'a.a. répertoriées dans les gènes *CDKN2A*, *MLH1*, *MSH2*, *MECP2* et *TYR* pour lesquelles des études fonctionnelles avaient préalablement validé leur statut (délétère ou neutre)²⁸⁶. Ils ont notamment observé qu'on retrouvait un faible taux de faux-positifs lorsqu'un variant était classé « neutre » avec SIFT et PolyPhen, et qu'une concordance entre méthodes était un facteur prédictif fort (de l'ordre de 88,1%)²⁸⁶. Le tableau 6.3.1.1 indique plusieurs scores *in silico* pour les mutations retrouvées dans les gènes GABRA associés à l'épilepsie.

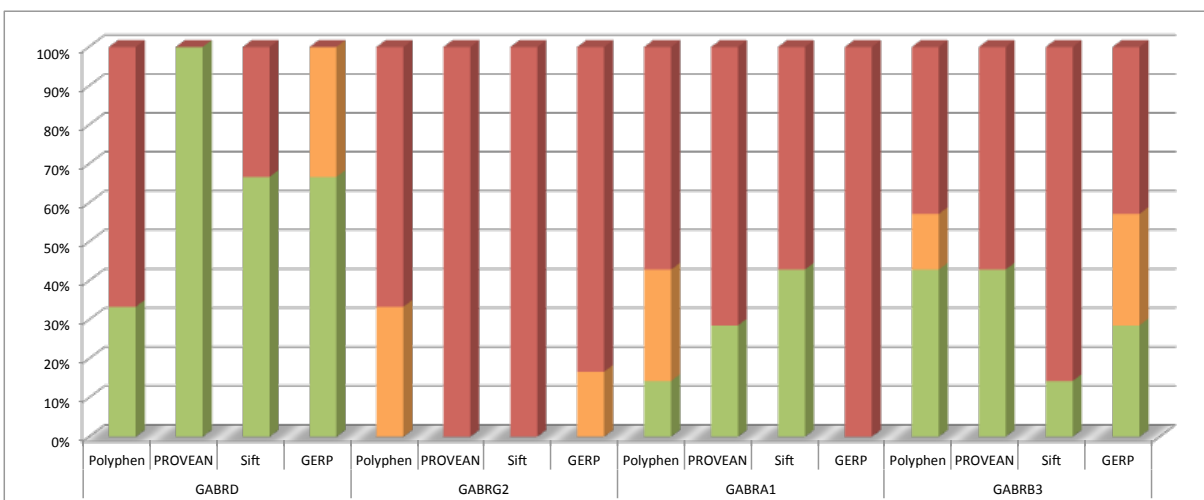
Tableau 6.3.1.1. Sommaire des prédictions *in silico* pour les variants connus des gènes GABRA associés à l'épilepsie

Gènes	SNV	Position génomique	Nucleotide	Polyphe	Score Polyphe	PROVEAN	Score PROVEAN	Sift	Score Sift	GERP - Score
GABRD	E177A	chr1:1959075	c.754>C	Probably damaging	0,999	Neutral	-1,462	Damaging	0,011	3,11
	R220H	chr1:1959699	c.699G>A	Benign	0,021	Neutral	-0,420	Tolerated	0,735	1,47
	R220C	chr1:1959700	c.700C>T	Probably damaging	0,998	Neutral	0,000	Tolerated	1,000	1,34
GABRG2	Q40X	chr5:161520844	c.844C>T	--	--	--	--	--	--	5,82
	N79S	chr5:161520962	c.962A>G	Possibly damaging	0,550	Deleterious	-2,855	Damaging	0,020	5,82
	R82Q	chr5:161520971	c.971G>A	Probably damaging	1,000	Deleterious	-3,194	Damaging	0,001	5,82
	P83S	chr5:161520973	c.973C>T	Probably damaging	1,000	Deleterious	-6,479	Damaging	0,001	5,82
	R136X	chr5:161524722	c.722C>T	--	--	--	--	--	--	4,87
	R177G	chr5:161524845	c.845C>G	Possibly damaging	0,947	Deleterious	-3,703	Damaging	0,046	3,91
	IVS6+2T->G	chr5:161531034	c.034T>G	--	--	--	--	--	--	5,39
	R323Q	chr5:161576159	c.159G>A	Probably damaging	0,998	Deleterious	-3,717	Damaging	0,000	5,88
	K328M	chr5:161576174	c.174A>T	Probably damaging	0,999	Deleterious	-4,273	Damaging	0,000	5,88
	Q390X	chr5:161580138	c.138C>T	--	--	--	--	--	--	5,95
	W429X	chr5:161580256	c.256G>A	--	--	--	--	--	--	5,95
	GABRA1	T20I	chr5:161277875	c.875C>T	Benign	0,001	Neutral	0,175	Tolerated	0,531
R112Q		chr5:161300202	c.202G>A	Possibly damaging	0,827	Neutral	-1,719	Tolerated	0,093	5,85
D219N		chr5:161309659	c.659G>A	Probably damaging	1,000	Deleterious	-2,780	Tolerated	0,098	5,34
G251S		chr5:161317951	c.951G>A	Possibly damaging	0,931	Deleterious	-5,152	Damaging	0,000	5,52
T292I		chr5:161322690	c.690C>T	Probably damaging	1,000	Deleterious	-5,343	Damaging	0,000	5,80
K306T		chr5:161322732	c.732A>C	Probably damaging	0,988	Deleterious	-5,219	Damaging	0,000	5,47
A322D		chr5:161322780	c.780C>A	Probably damaging	1,000	Deleterious	-4,785	Damaging	0,006	5,47
S326fs328X		chr5:161322790	c.790 del C	--	--	--	--	--	--	4,49
K333delins18X		chr5:161324096	c.96 ins 25 nt	--	--	--	--	--	--	-2,86
GABRB3		P11S	chr15:27018841	c.841C>T	Benign	0,137	Neutral	-0,489	Tolerated	0,703
	S15F	chr15:27018828	c.828C>T	Benign	0,104	Neutral	-0,176	Damaging	0,006	2,70
	G32R	chr15:27017906	c.906G>A	Benign	0,012	Neutral	-0,489	Damaging	0,003	3,81
	N110D	chr15:26866594	c.594A>G	Probably damaging	0,983	Deleterious	-2,675	Damaging	0,015	5,81
	D120N	chr15:26866564	c.564G>A	Probably damaging	1,000	Deleterious	-4,747	Damaging	0,001	5,81
	E180G	chr15:26828484	c.484A>G	Probably damaging	0,998	Deleterious	-6,398	Damaging	0,001	4,98
Y302C	chr15:26806254	c.254A>G	Possibly damaging	0,887	Deleterious	-7,554	Damaging	0,000	5,19	

Légende : Le logiciel Polyphen permet d'évaluer le taux de conservation entre les gènes homologues, les propriétés physicochimiques des résidus échangés et la proximité de la substitution par rapport aux différents domaines fonctionnels de la protéine¹⁹⁵. Les outils de prédiction SIFT et PROVEAN prédisent l'importance fonctionnelle d'une substitution d'acide aminé à partir d'un alignement avec des séquences protéiques orthologues et/ou paralogues^{284,287}. Le score GERP (*The Genomic Evolutionary Rate Profiling*) se base sur l'alignement de régions conservées à travers plusieurs espèces pour l'ensemble du génome²⁸⁸. Il donne un score de conservation pour chaque position nucléotidique donnée.

Bien que cette liste de logiciels ne soit pas exhaustive et que l'interprétation de ces résultats soit limitée, elle permet d'évaluer rapidement l'impact des substitutions nucléotidiques et d'orienter de manière efficace le travail expérimental. Le tableau 6.3.1.2 classe les mutations rapportées des gènes GABRA dans 3 catégories (vert, orange et rouge: Voir légende ci-dessous) selon les prédictions des programmes PolyPhen, PROVEAN, Sift et GERP. Ce tableau illustre bien la concordance entre ces programmes et établit un parallèle avec les études citées précédemment^{285,286}. Une tendance délétère plus importante pour les variants retrouvés dans les gènes *GABRG2* et *GABRA1* est également observée. Dans le cas précis des mutations dans les gènes GABRA, les nombreux résultats fonctionnels présentés dans le chapitre 3 viennent corroborer ces prédictions.

Tableau 6.3.1.2. Distribution des scores *in silico* par programme et par gène



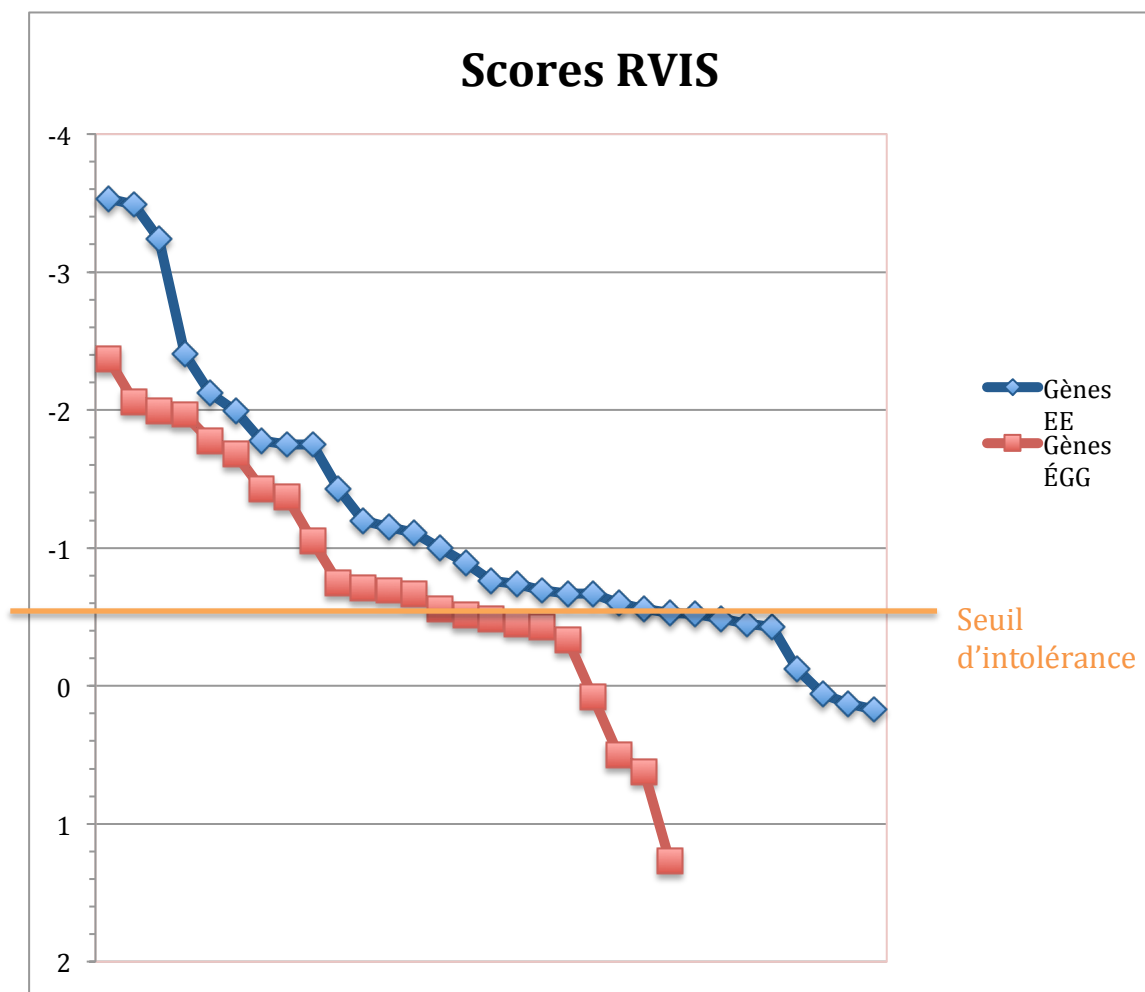
Légende :

Polyphen	Bénin	Possiblement dommageable	Probablement dommageable
	0-0.2	0.2-0.85	0.85-1
PROVEAN	Neutre		Délétère
	>2.5		≤-2.5
Sift	Toléré		Domageable
	>0.05	<0.05	
GERP	Faiblement conservé	Modérément conservé	Parfaitement conservé
	<3	3-5	>5

Le consortium Epi4K a abordé cette problématique d'un autre angle. Ils n'ont pas développé un outil pour évaluer un variant mais plutôt pour évaluer le gène dans lequel il se trouve. Leur stratégie fut d'attribuer un score aux gènes en se basant sur leur niveau d'intolérance aux mutations nommées RVIS (*Residual Variation Intolerance Score*)¹⁹³. En effet, ils ont utilisé une approche intégrée en combinant le taux de variation d'un gène dans la population en général, le type de variants s'y retrouvant (fonctionnel/non-fonctionnel) et sa fréquence dans la population (commun/rare) pour arriver à un score « d'intolérance » pour chaque gène. Cette stratégie nous permet d'illustrer un lien génotype-phénotype dans le tableau 6.3.1.3. Actuellement, 26 des 31 gènes liés aux encéphalopathies épileptiques, un groupe de

syndromes épileptiques sévères, font partie des 25% des gènes les plus intolérants chez l'humain. Pour les épilepsies génétiques généralisées, un groupe de syndromes plus complexes, 17 des 23 gènes associés sont supérieurs au seuil d'intolérance. Trois gènes GABRA sont communs à ces groupes (*GABRA1*, *GABRG2*, *GABRB3*) et les gènes *GABRB3* et *GABRA1* obtiennent le score d'intolérance le plus élevé avec respectivement -0,49 (22,36%) et -0,45 (24%).

Tableau 6.3.1.3. Distribution des scores RVIS pour 54 gènes épileptiques



Légende : EE, encéphalopathie épileptique; ÉGG, épilepsie génétique généralisée; La liste des gènes est basée sur la publication Klassen et *al.*, 2011¹⁸⁴ ; Le seuil d'intolérance représente les 25% de gènes considérés comme étant les plus intolérants chez l'humain.

6.3.2 Études *in vitro* et investigations des propriétés biophysiques des RGABA_A mutants

Dans un deuxième temps, l'impact fonctionnel des mutations présentes dans les sous-unités du récepteur GABA_A a principalement été étudié en exprimant des récepteurs recombinants dans des lignées cellulaires (ex: HEK-293, COS-7), des neurones dissociés et des ovocytes de xénopodes. Ces expériences accessibles et peu coûteuses permettent notamment de mesurer l'expression des gènes mutés, leur mode de dégradation ainsi que l'activité du récepteur mutant. L'environnement contrôlé et simplifié de ces systèmes offre un avantage notable. Elles s'avèrent un bon compromis pour débuter des études fonctionnelles. Cette section nous permet également de comparer avec les autres groupes de recherche les résultats de l'investigation des impacts fonctionnels des mutations dans les sous-unités $\alpha 1$ et $\gamma 2$ du RGABA_A décrite dans le chapitre trois. Globalement, les résultats obtenus pour les variants dans *GABRA1* concordent avec la littérature tandis que ceux obtenus pour P83S dans *GABRG2* semblent différents des résultats précédemment publiés pour des faux-sens dans ce gène. Cette section met également en lumière l'apport d'un nouveau modèle tel que celui présenté au chapitre cinq. En effet, l'usage de cultures de coupes organotypiques et de la transfection biolistique a permis de mesurer l'influence que les récepteurs mutants avaient sur la morphologie des cellules pyramidales, sur les épines dendritiques GABAergiques et glutamatergiques ainsi que sur l'arborisation des cellules à panier. Tous sont des phénomènes dont la maturation est GABA-dépendante dans les circuits corticaux en période critique du développement. Ces études apportent des arguments majeurs pour définir le caractère causal ou non d'une mutation, mais leur fiabilité n'est pas absolue. Par la suite, il est nécessaire de poursuivre des tests *in vivo* afin de confirmer les impacts physiologiques observés *in vitro*.

Tableau 6.3.2.1. Impacts fonctionnels des mutations des gènes GABRA

Gènes	SNV	Diminution du courant évoqué GABA	Diminution de l'expression membranaire	Altération de la sensibilité au benzodiazépine	Altération de la sensibilité au Zn ²⁺	Altération des propriétés cinétiques	Références
<i>GABRD</i>	E177A	Oui	Oui	--		Oui	Dibbens et al., 2004; Feng et al., 2006
	R220H	Oui	Oui	--		Oui	Dibbens et al., 2004; 2009; Feng et al., 2006
	R220C	Non	--	--		--	Dibbens et al., 2004
<i>GABRG2</i>	Q40X	Oui	Oui	Oui	Oui	--	Huang et al., 2012; Kang et al., 2013; Ishii et al., 2014
	N79S	Non	Non	Non	Non	Oui	Migita et al., 2013; Huang et al., 2014
	R82Q	Oui / Non	Oui	Oui / Non	Oui / Non	Oui / Non	Wallace et al., 2001; Bianchi et al., 2002; Bowser et al., 2002; Kang et al., 2004; Hales et al., 2005; Kang et al., 2006; Eugène, 2007; Frugier et al., 2007; Goldschern-Ohm et al., 2010; Huang et al., 2014
	P83S	Oui / Non	Oui / Non	--	Oui / Non	Non	Lachance-Touchette et al., 2011; Huang et al., 2014
	R136X	Oui	Oui	--	Oui	--	Lachance-Touchette et al., 2011; Johnston et al., 2014
	R177G	Oui / Non	Oui	Oui	Non	Oui / Non	Kang et al., 2013; Johnston et al., 2014
	IVS6+2T→G	Oui	Oui	--	Oui	Oui	Audenaert et al., 2006; Todd et al., 2014
	K328M	Oui / Non	Non	Oui / Non	--	Oui	Tian et al., 2012
	Q390X	Oui	Oui	--	Oui	--	Baulac et al., 2001; Bianchi et al., 2002; Kang et al., 2006; Eugène, 2007; Frugier et al., 2007
	W429X	Oui	Oui	--	Oui	--	Harkin et al., 2002; Kang et al., 2006, 2009 et 2013
	S443delC	Oui	Oui	--	Oui	--	Kang et al., 2013
							Tian et al., 2014
	<i>GABRA1</i>	D219N	Non	Oui	--		Oui
G251S		Oui	--	--		Oui	Carvill et al., 2014
A322D		Oui	Oui	Non		Oui	Cossette et al., 2002; Krampfl et al., 2005; Gallagher et al., 2004; Kang et al., 2006; Gallagher et al., 2007; Maljevic et al., 2006
<i>GABRA6</i>	S326fs328X	Oui	Oui	--		--	Lachance-Touchette et al., 2011
	K353delins18X	Oui	Oui	--		--	
<i>GABRA6</i>	R46W	Non	--	--		Non	Dibbens et al., 2009
<i>GABRB3</i>	P11S	Oui	Oui / Non	--		--	Tanaka et al., 2008; Delahanty et al., 2011
	S15F	Oui	Non	--		--	Tanaka et al., 2008
	G32R	Oui	Oui / Non	--		Oui	Tanaka et al., 2008; Gurba et al., 2012

6.3.2.1 *GABRA1*

Pour les variants retrouvés dans *GABRA1*, il a été démontré au chapitre 2 et par l'entremise d'un autre groupe que les mutations S326fs328X et K353delins18X créent des codons stops prématurés (*premature termination codon* (PTC)) causant la synthèse de protéines tronquées^{125,183}. Pour S326fs328X et K353delins18X, les transcrits résultants sont rapidement dégradés par un processus de surveillance de l'ARNm appelé *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) qui est un mécanisme qui assure la fidélité de l'expression génique¹⁶⁷. En réduisant la production de protéines tronquées, ce système cellulaire permet de protéger la cellule contre les effets potentiellement néfastes des protéines tronquées. Les protéines $\alpha 1$ mutantes restantes sont ensuite dégradées à travers un processus de dégradation appelé ERAD (*endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation*)²⁸⁹. L'amplitude du courant GABA des récepteurs hétérozygotes pour $\alpha 1$ -A322D est ainsi significativement réduite (homozygote < hétérozygote < wildtype)²⁰¹. Le processus de dégradation protéosomale ERAD a également été étudié pour le variant A322D²⁰⁰. Lorsque les récepteurs contenant la sous-unité mutante s'insèrent à la membrane, leurs propriétés cinétiques sont altérées^{41,152,201}. Même si la principale conséquence de cette mutation est la perte de fonction, elle a de plus un effet dominant négatif sur les récepteurs sains. Les sous-unités mutantes retiennent les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 3$ sauvages au RE²⁰².

6.3.2.2 *GABRB3*

Des études de l'activité macroscopique sur des cellules entières (*whole cell patch-clamp*) ont associé les mutations dans *GABRB3* (P11S, S15F) à une réduction du courant évoqué par le GABA¹²⁸. Ce groupe a émis l'hypothèse qu'une augmentation du niveau de glycosylation de la protéine mutante $\beta 3$ serait à l'origine de cette réduction¹²⁸. Par contre, la façon dont les mutations situées sur le signal peptide peuvent altérer la fonction de la protéine $\beta 3$ mature demeure à élucider. Le gène *GABRB3* possède un exon 1 alternatif (exon 1a) qui code pour un signal peptide différent. Lorsqu'il est traduit, ce dernier produit une séquence peptidique distincte. L'exon 1a est sélectivement enrichi dans le cerveau foetal²⁹⁰. Les mutations P11S et S15F se situent dans ce signal peptide. La réduction des RGABA_A contenant la sous-unité $\beta 3$ due à ses mutations pourrait donc causer l'épilepsie plus tôt dans le

développement. De façon intéressante, bon nombre de porteurs de ces mutations sont atteints d'une épilepsie absence de l'enfant, un phénotype qui touche surtout les enfants de 3 à 10 ans.

6.3.2.3 *GABRD*

Pour le gène *GABRD*, le faux-sens E177A, comme la majorité des variants dans *GABRG2*, *GABRA1* et *GABRB3*, résulte en une baisse de l'amplitude des courants GABA-évoqué^{126,291}. En position 220 de la protéine δ , le changement de l'arginine pour une cystéine ne semble pas affecter le comportement du récepteur en étude *in vitro*. Le polymorphisme R220H altère les propriétés cinétiques ainsi que l'expression à la membrane du RGABA_A dans des études *in vitro*^{126,291}. Il est possible que R220C soit un variant rare neutre. Par contre, comme ce variant a seulement été retrouvé chez des patients épileptiques, cela nous pousse à envisager qu'il pourrait être associé à des effets plus subtils sur le récepteur GABA_A . Fait intéressant, le R220H est néanmoins associé à une réduction de l'amplitude du courant GABA. Tel que discuté précédemment, le rôle de ce polymorphisme fonctionnel dans l'épilepsie demeure incertain. Comme le variant P11S dans *GABRB3*, il est possible que R220H soit plutôt un polymorphisme rare dans la population plutôt qu'une mutation. De plus, les récepteurs contenant la sous-unité δ sont principalement extrasynaptiques, ce qui signifie que les modèles *in vitro* précédemment utilisés ne sont pas adaptés afin de caractériser le rôle fonctionnel de *GABRD* dans le système nerveux central.

6.3.2.4 *GABRG2*

Pour trois mutations non-sens du gène *GABRG2* (Q40X, R136X, Q390X), les impacts fonctionnels rapportés dans les articles d'origine ont tous été répliqués^{146,186,187,292,293}. En contre-partie, les résultats s'avèrent beaucoup plus hétérogènes en ce qui a trait aux mutations faux-sens de *GABRG2*. En effet, il n'y a pas de consensus quant à l'effet des mutations R82Q, P83S, R177G et K328M sur l'amplitude du courant GABA^{39,40,237}. Il a été clairement démontré que les mutations faux-sens (K328M, R177G et possiblement R82Q ainsi que P83S) pouvaient altérer les processus d'ouverture du récepteur GABA_A . Deux mutations dans *GABRG2* (R82Q and P83S) sont localisées à proximité d'un site de liaison aux

benzodiazepines (BZD). Cependant, seul le variant R82Q semble altérer la potentialisation du courant GABA par l'application de BZD^{39,171,172}. Ces derniers résultats demeurent controversés puisqu'ils n'ont pas été reproduits par d'autres groupes de recherche^{237,242}. Malgré la rigueur avec laquelle les expériences en électrophysiologie et en immunohistochimie ont été réalisées, les nombreux débats sur les mutations dans *GABRG2* suggèrent que trop de variables entrent en jeu dans l'étude des modèles *in vitro*. Le choix du type cellulaire, du design du plasmide, de la méthode de transfection, du milieu de culture, du type d'enregistrement en électrophysiologie et du choix des anticorps sont des exemples de facteurs pouvant gravement altérer les résultats.

Les ions zinc (Zn^{2+}) inhibent le récepteur $GABA_A$ par un mécanisme allostérique qui dépend essentiellement de la composition en sous-unité du récepteur²⁹⁴. La combinaison $\alpha\beta$ est la plus sensible tandis que la combinaison $\alpha\beta\gamma$ est la moins sensible à l'effet de ce composé. La présence de $\gamma 2$ dans le coassemblage du $RGABA_A$ entraîne l'abolition de deux des trois sites de liaison au Zn^{2+} rendant ainsi ce dernier moins sensible²⁹⁵. Il a été démontré que les sous-unités $\gamma 2$ mutantes (N79S et R177G) non dégradées s'associaient avec les sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 2$ pour former un récepteur fonctionnel à la membrane^{145,296}. Pour la majorité des autres sous-unités $\gamma 2$ mutantes, sa rétention massive au RE se traduit par une majorité de récepteurs $\alpha\beta$ à la membrane et une réduction du courant évoqué lors de l'application du Zn^{2+} (Tableau 6.2.2.1).

6.3.3 Investigations en culture neuronale des mutations dans les sous-unités du $RGABA_A$

Dans un troisième temps, des études fonctionnelles dans des cultures primaires de neurones ont succédé aux systèmes hétérologues en tentant d'expliquer davantage l'impact pathogénique de ces variants. Lorsque la sous-unité mutante $\alpha 1$ -A322D est transfectée dans des neurones en culture, elle altère significativement la cinétique et l'amplitude du courant post-synaptique miniature GABAergique (mIPSC)²⁰². Les sous-unités mutantes $\gamma 2$ -R82Q et $\gamma 2$ -P83S ne rejoignent pas la surface des neurones. Par leur effet dominant négatif, elles

retiennent également les sous-unités $\gamma 2$ endogènes à l'intérieur de la cellule et modifie conséquemment la composition des RGABA_A à la surface des neurones (\uparrow de $\alpha\beta$ et une \downarrow $\alpha\beta\gamma$)^{239,241}. Ce changement pourrait créer un déséquilibre entre l'inhibition tonique et phasique. Un autre groupe a par ailleurs enregistré une diminution du courant GABAergique tonique²³⁸. Pour sa part, la mutation $\gamma 2$ -K328M entraîne une accélération du déroulement des courants post-synaptiques miniatures GABAergiques (mIPSCs)²³⁸. Kang et *al.*, 2014 ont de leur côté démontré un point intéressant. En étudiant conjointement trois mutations non-sens de *GABRG2*, ils ont prouvé que malgré une perte de fonction commune des allèles mutantes, chaque mutation produisait un niveau intracellulaire différent de protéines tronquées et augmentait ainsi le niveau de stress lié à l'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique de manière différente ($\gamma 2$ -Q390X > $\gamma 2$ -W429X > $\gamma 2$ -W461X)²⁹³. Pour la 4^e mutation non-sens (Q40X), la quantité de sous-unités $\alpha 1$, $\beta 2$ et $\gamma 2$ transportée à la membrane des neurones est inférieure à la normale lorsque l'allèle mutante est transfectée¹⁸⁶.

Globalement, ces études suggèrent que les mutations dans les sous-unités du RGABA_A entraînent une perte de fonction. Sommairement, les études *in vitro* et en culture neuronale ont révélé que la majorité des mutations réduisaient le courant GABA-évoqué (Tableau 6.2.2.1). Pour quatre mutations dans *GABRA1* (D219N, A322D, S326fs328X, K353delins18X) et pour huit dans *GABRG2* (Q40X, R82Q, R136X, R177G, IVS6+2T→G, Q390X, W429X, S443delC), il a été établi que la réduction de l'amplitude du courant GABA était due à une réduction significative de la protéine à la membrane et à la séquestration de celles-ci au réticulum endoplasmique. Dans ce cas, la perte de fonction conduit à un mécanisme pathogénique d'haploinsuffisance de la sous-unité $\alpha 1$ ou $\gamma 2$. Pour quatre de ces mutations (A322D, Q40X, R82Q et IVS6+2T→G), le produit protéique de l'allèle muté a un effet dominant négatif sur les autres sous-unités du récepteur GABA_A tels que $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\beta 2$ et $\gamma 2$ ²⁰². Ces effets délétères impliquent les sous-unités mutantes du RGABA_A dans l'ÉGG et supportent l'hypothèse que des mutations rares dans différents gènes peuvent converger vers un mécanisme pathogénique commun.

Par ailleurs, il est bien connu que le blocage de la transmission GABA par des composés comme la bicuculline ou la picrotoxine provoque l'apparition de synchronies épileptiformes

dans le cortex ou l'hippocampe²⁹⁷. De plus, des études *in vitro* et *in vivo* ont conclu à une baisse globale des récepteurs GABA_A dans les tissus épileptiques^{298,299}. L'activité épileptique dans le cerveau résulte-t-elle uniquement d'une perte fonctionnelle? Si nous acceptons l'happloinsuffisance comme mécanisme principal, devrions-nous observer que l'augmentation de la sévérité des mutations (de faux-sense à non-sense) entraîne simultanément une augmentation progressive de la sévérité des phénotypes (de convulsions fébriles à SMEI par exemple)? Le résumé des symptômes (Tableau 6.1.1) nous illustre que le tableau est plus complexe. De plus, les tableaux 6.2.1 et 6.3.2.1 ne nous suggèrent pas que l'effet seul d'un mauvais dosage génique conduit à un phénotype épileptique. Ces recherches ont tout de même proposé un éventail de déficits des RGABA_A mutants et ont identifié des mécanismes pathogéniques fins de l'épilepsie à l'aide de mutations retrouvées chez des patients.

6.4 Avantages et limites de nos approches

Lorsque les travaux présentés dans cet ouvrage ont été entrepris, les connaissances en génétique au sein de la communauté scientifique travaillant sur les épilepsies se trouvaient bien loin de celles d'aujourd'hui. Seules de grandes familles monogéniques et des cohortes de jumeaux avaient fait l'objet de telles études. Au moment où ce projet a débuté, la réduction du coût de séquençage nous a permis d'étudier de plus grandes cohortes de patients. L'approche par gène candidat demeurait la meilleure option à ce moment et ce, malgré la tâche colossale de travail manuel et le biais de sélection des gènes. Nous avons donc dû travailler par étapes, ce qui a mené à la publication de deux articles^{38,183}. Malgré le fait que nous avons accès à un tarif réduit pour le séquençage, le coût demeurait trop élevé pour nous permettre de séquencer la totalité des contrôles prévus au départ. Nous nous sommes donc rabattus sur l'investigation des effets fonctionnels *in vitro* des mutations dans *GABRA1* et *GABRG2* retrouvées chez de grandes familles d'ÉGG. Cette piste nous a par la suite menée à nous interroger sur l'altération que les $RGABA_A$ mutants pourraient avoir sur l'effet trophique du GABA durant le développement du système nerveux central. Une telle démarche nous a permis de démontrer que cette perturbation pourrait mener à un réseau cortical aberrant et potentiellement responsable de l'excitabilité anormale du cerveau épileptique.

Dans le chapitre 1, nous avons mis en évidence les efforts déployés par les cliniciens et les chercheurs dans le but de redéfinir la terminologie des syndromes épileptiques. Ce projet nous a permis d'aborder une question importante au sujet du design des études génétiques en épilepsie : quelle est la meilleure approche expérimentale lorsque nous montons une cohorte de patients en vue d'une étude génétique? Devons-nous ratisser plus large en utilisant une terminologie qui englobe un large spectre phénotypique tel que le terme « épilepsie généralisée », ou devons-nous plutôt nous concentrer sur des critères précis tels que la photosensibilité, l'âge de début ou le type de crise? Ces questions, bien que très pertinentes, n'ont pas pu être clairement adressées dans notre étude et n'ont à ce jour pas trouvé d'échos dans la communauté scientifique. De plus, tel que discuté précédemment, le séquençage de

régions génomiques ciblées apporte un bais de sélection dans notre démarche expérimentale. Cette méthode esquive également un autre enjeu qui a été très peu abordé et qui concerne l'importance des variations génétiques non-codantes. Jusqu'à présent, la majorité des mutations génétiques impliquées dans la maladie ont été identifiées à l'intérieur des régions codantes. Les limitations technologiques ainsi qu'un manque évident de connaissances ont poussé les groupes de recherche à exclure les régions introniques et régulatrices de leurs investigations. Il s'avère donc difficile de prédire le rôle de ces dernières. Dans un avenir rapproché, le séquençage du génome en entier (WGS) de cohortes de patients soulèvera de nouveau cette question et nous forcera à étudier ces régions encore méconnues.

6.4.1 Regard sur l'avenir de la neurogénétique

Tel qu'illustré tout au long de cette thèse, l'approche de la génétique des épilepsies fut jusqu'à tout récemment essentiellement mendélienne. Une vision que je me plais à qualifier sans prétention « de traditionnelle et de confortable ». Cette approche se base principalement sur les études d'héritabilité réalisées dans les années 90, dont l'une des plus importantes pour les épilepsies généralisées provient des données recueillies sur une banque de jumeaux australiens. L'étude des jumeaux est sans contredit une technique puissante pour étudier des phénotypes aussi complexes que l'épilepsie. Sur une cohorte de 59 paires de jumeaux, on retrouve une concordance de $0,82 \pm 0,06^2$ chez les jumeaux monozygotes comparativement à $0,26 \pm 0,11$ chez les jumeaux dizygotes³². Dans cette étude, la forte concordance retrouvée entre les jumeaux monozygotes a récemment été reconfirmée à l'aide d'une cohorte de 558 paires de jumeaux. Vladamudi et *al.*, 2014 ont rapporté une concordance de 0,77 pour les jumeaux avec l'épilepsie génétique généralisée monozygotes comparativement à 0,35 pour les jumeaux dizygotes³⁰⁰. Une concordance encore plus forte a été notée pour les jumeaux atteints d'épilepsie génétique avec convulsions fébriles (MZ 0,85 vs DZ 0,25)³⁰⁰. En résumé, les données issues d'études de jumeaux épileptiques sont un bon indicateur de l'importance des gènes pour ce caractère³⁰¹.

² La probabilité qu'un membre est affecté, étant donné que l'autre est affectée.

Parallèlement aux études de jumeaux menées dans les années 90, un grand effort de recrutement fut déployé en ce qui a trait à la collecte de grandes familles comptant de nombreux individus atteints. La démographie de l'époque le permettant encore, il a été possible pour nous et d'autres équipes de travailler sur des pedigrees s'étalant sur plusieurs générations et comptant chacun plus de 5 individus atteints. À travers la littérature de cette époque, on dénote une grande homogénéité dans le design expérimental : des analyses de liaisons paramétriques à l'aide de marqueurs polymorphiques assumant une transmission autosomique dominante et une forte pénétrance du trait à l'étude. Tel qu'illustré dans le tableau 1.2.2, et ce malgré leur rareté, on ne peut nier l'importante contribution des familles « monogéniques » à la description de l'architecture génétique de l'épilepsie. Elles ont permis d'identifier de nombreux loci associés à l'épilepsie. Par la suite, le clonage positionnel et le séquençage des régions candidates ont permis d'identifier de nombreux gènes mutés résumés dans le tableau 1.2.6 du chapitre 1.

La majorité des premiers gènes « épileptiques » issus des études de liaisons se sont avérés être des gènes codant pour des canaux ioniques et des récepteurs neuronaux, jetant ainsi l'assise des études subséquentes: L'épilepsie fait partie des canalopathies. Un concept mécanistique biologiquement viable sur lequel notre propre hypothèse de travail s'est basée. Combinée avec l'amélioration des techniques de séquençage au tournant du 20^e siècle, une vague d'études par gènes candidats sur des familles épileptiques et des cohortes de patients épileptiques ont été publiées. À la lumière des résultats obtenus à l'aide de cette approche, deux conclusions peuvent être tirées :

- a. L'approche « gène candidat » a été fructueuse lorsque nous l'utilisons pour des cas familiaux d'épilepsies « monogéniques » suivant un mode de transmission mendélien.
- b. Les résultats sur des cohortes de patients non familiaux sont décevants. En effet, la majorité des cas sporadiques d'épilepsie génétique généralisée semblent suivre un patron d'hérabilité plus complexe.

Nous verrons plus loin dans cette discussion que malgré le faible taux de cas expliqués par ces gènes synaptiques, il ne faut pas jeter du revers de la main ce concept. Ils sont sans contredit une pièce essentielle du casse-tête. La cible est bonne, mais les moyens de chasse ne sont peut-être tout simplement pas encore au point.

6.4.2 Discussion sur le gène *GABRB3*

L'identification et la publication de variants dans *GABRB3* est arrivée relativement tardivement dans l'avènement des études par gènes candidats comparativement à d'autres gènes codants pour des sous-unités du récepteur GABA_A tels que *GABRA1* et *GABRG2*. Deux groupes, soient Urak et al., 2006 et Dibbens et al., 2009 n'ont rapporté aucun variant pathogénique dans leurs cohortes^{80,302} qui comptaient respectivement 45 patients CAE et 203 patients ÉGG. Pourtant, nous retrouvons plusieurs observations reliant *GABRB3* à un phénotype neurodéveloppemental tel que l'épilepsie avec absence de l'enfant dans la section 6.1.2.4 de ce document.

D'un point de vue génomique, *GABRB3* possède tout d'abord deux signaux peptides alternatifs (exon 1A et exon 1). L'exon 1A dans lequel le variant P11S a été répertorié contribue à l'obtention d'un transcrit alternatif qui est enrichi dans le cerveau foetal chez l'humain et presque inexistant dans l'hippocampe chez l'adulte²⁹⁰. Cette expression temporal-spécifique suggère un rôle dans la neurogénèse. Le sujet a été également étudié chez le rat. Le taux d'ARNm de la sous-unité $\beta 3$ atteint sa plus forte expression (jusqu'à 150% du niveau d'expression chez l'adulte) au stade périnatal (E19-P12)²⁶².

En deuxième lieu, en plus des trois mutations faux-sens (P11S, S15F et G32A) qui ségrégent dans 4 familles CAE¹²⁸ d'autres maladies neurodéveloppementales sont associées à *GABRB3*. En effet, ce gène se retrouve dans un regroupement de gènes avec *GABRA5* et *GABRG3* (voir figure 1.3.3) dans la région chromosomique 15q11-q13. Une délétion de cette région du chromosome 15 d'origine maternelle cause le syndrome d'Angelman (AS) tandis qu'une délétion de cette même région du chromosome paternel est responsable du Syndrome de

Prader-Willi (PSD). De plus, l'épilepsie réfractaire s'atténuant avec l'âge est un trait fréquemment observé chez les patients AS et PSD³⁰³. Même si Wang et *al.* ont travaillé avec un petit nombre d'individus, ils ont tout de même observé que les patients PSD sans la délétion paternelle (12 patients) ne présentaient pas de crises épileptiques tandis que 21% des patients avec la délétion avaient des crises³⁰⁴. Plusieurs mutations dans le gène *MeCP2* ont également été identifiées chez des patients atteints du syndrome de Rett une autre pathologie neurodéveloppementale. *MeCP2* est une protéine qui régule l'expression de *GABRB3*³⁰⁵. Finalement, cette même région a également été impliquée dans l'autisme. La variation du nombre de copie (CNV) la plus répertoriée dans cette cohorte est la duplication de la région chromosomique 15q11-q13³⁰⁶. Récemment, la transmission maternelle du variant P11S originalement associé à l'épilepsie avec absence de l'enfant a été retrouvée chez 11 familles avec des probands atteints de troubles du spectre autistique²⁴⁴.

En résumé, nous pourrions spéculer qu'une plus grande expression de *GABRB3* mutant aux stades embryonnaire et néonatal chez un individu porteur, de même qu'une réduction de son expression dans certaines régions comme le thalamus à l'âge adulte pourraient expliquer la rémission des crises à l'adolescence chez les patients CAE. Cette hypothèse nécessite un examen plus approfondi de l'expression des différents transcrits de *GABRB3* dans le cerveau de patients épileptiques au cours du développement. Malheureusement, une seule étude datant de 1993 a travaillé avec des échantillons humains sains. Le modèle de souris AS³⁰⁷ et la souris knock-out *GABRB3*²⁷⁶ pourraient servir de canevas à l'étude de l'importance de l'empreinte parentale sur son expression. L'interaction des modulateurs épigénétiques tels que *MeCP2*, *UBE3A* et *REST* agissant sur l'expression de *GABRB3* devrait également être davantage explorée. Notre étude sur *GABRB3* s'inscrit dans ce lot de découvertes fournissant plusieurs évidences quant à l'implication d'une régulation épigénétique déficiente de *GABRB3* dans le développement des maladies neurologiques tel que l'épilepsie.

6.4.3 Discussion sur les gènes *GABRA1* et *GABRG2*

L'implication de *GABRA1* et *GABRG2* dans la pathogénèse de l'épilepsie a été largement démontrée tout au long de cette thèse. Les chapitres 2, 3 et 4 nous ont permis d'illustrer dans quelle mesure ces sous-unités sont mutées dans notre cohorte d'ÉGG. Les chapitres 3 et 5 s'imbriquent dans un effort collectif visant à mieux évaluer l'impact de ces sous-unités mutantes dans les mécanismes biologiques responsables du développement de la maladie.

D'autres arguments en faveur de ces gènes proviennent d'études récentes qui ont redéfini leurs implications. *GABRA1* et *GABRG2* étaient des gènes précédemment associés à un spectre phénotypique « moyen », allant de l'épilepsie génétique généralisée aux convulsions fébriles (voir tableau 6.1.1). Nous savons maintenant qu'ils peuvent être impliqués dans des formes d'épilepsie plus sévère telles que le syndrome de Dravet et l'encéphalopathie épileptique^{182,186}. À présent, comment transférer ces connaissances de manière plus concrète dans notre pratique? Il s'avère de plus en plus évident que les gènes codant pour des canaux ioniques sont fréquemment mutés dans l'épilepsie génétique généralisée. Avec l'avènement du NGS, ne pourrions nous pas cribler systématiquement un « panel de gènes candidats » avant de séquencer le génome entier de l'ensemble de nos cohortes d'épileptiques? Je vois dans cette étape pré-séquençage une fenêtre de travail où nous pourrions économiser temps et argent. La technique de reséquençage de régions candidates utilisée au chapitre 4 pourrait être appliquée à un groupe de gènes de susceptibilité présélectionnés. Une autre option nommée *Molecular Inversion Probes* (MIPs) est basée sur un principe similaire et capture également les exons des gènes sélectionnés. Cette technique a d'ailleurs été utilisée par un groupe australien en 2013, ce qui a mené à la publication du reséquençage de 19 gènes déjà associés à l'encéphalopathie épileptique (EE) et de 46 gènes candidats dans une cohorte de 500 patients EE⁸⁶. Les gènes candidats ont été sélectionnés à partir de variations du nombre de copies (CNVs) (n=33) et de d'autres mutations associées à l'épilepsie et certaines comorbidités. En utilisant cette approche, ils ont pu établir un diagnostic génétique chez 10% de leur cohorte. Ils ont parallèlement décrit six nouveaux gènes EE incluant *CHD2* et *SYNGAP1* expliquant respectivement environ 1% de leurs cas. Une fois la méthode mise au point, il serait pertinent

de l'utiliser pour l'ensemble de notre cohorte épileptique ainsi que pour des patients atteints de maladies neurodéveloppementales.

De plus, les designs expérimentaux utilisés aux chapitres 2, 3 et 4 ne nous ont pas permis de détecter des variants structuraux tels que les variations du nombre de copies. Pourtant, plusieurs publications récentes sur les CNVs suggèrent avec raison de les prioriser en l'épilepsie³⁰⁸. En effet, tel que présenté dans la section 1.2.4 de cet ouvrage, les CNVs s'avèrent être une source importante de mutations pathogéniques pour les patients atteints de diverses formes d'épilepsie. L'avènement des puces d'hybridation génomique comparative (CGHs) et de polymorphismes nucléotidiques (SNPs) a permis un plus grand pouvoir de détection pour les CNVs de petites tailles, précision que l'analyse par karyotype ne parvenait pas à accomplir. Pour l'instant, un seul CNV récurrent sur le chromosome 15 (15q11.2-q13) (qui est le résultat d'une recombinaison homologue non-allélique (*non allelic homologous recombination* ou NAHR) au cours de la méiose dûe à une architecture de séquence prédisposant au remaniement chromosomique³⁰⁹) inclut des gènes GABRA. Sachant qu'il existe cinq *clusters* comptant deux gènes GABRA et plus, (voir figure 1.3.3) il serait intéressant dans une futur rapproché d'utiliser les données de séquençage du génome entier (WGS) afin de vérifier si ces *clusters* ne pourraient pas être sujet à des microdélétions ou microduplications dans nos cohortes de patients ÉGG.

6.4.4 Approches émergentes dans le dépistage des gènes « épileptiques »

Les technologies de séquençage à haut débit étant présentement accessibles à tous, le défi n'est plus d'obtenir de l'information génétique sur les patients épileptiques mais plutôt de mettre au point de nouvelles stratégies d'analyse. Incessamment, nous devons élaborer des outils bioinformatiques qui nous permettront de découvrir de nouveaux gènes et d'identifier les variants causatifs à travers ces immenses jeux de données. Globalement, plusieurs prémisses à nos analyses devront être remises en question telles que:

6.4.4.1 L'approche « par famille »

Malgré un certain succès, l'approche génétique « par famille » devra assurément être questionnée. Avec cette approche, nous assumons *a priori* que l'épilepsie est une maladie mendélienne. Nous priorisons donc des variants rares partagés par l'ensemble des individus atteints de la famille. Pourtant, nous savons maintenant que l'étiologie de l'ÉGG est beaucoup plus complexe. La variabilité phénotypique des porteurs ainsi que le taux de pénétrance variable sont des indices criants. L'exclusion des gènes mutés non communs à une proportion des individus atteints d'une même famille empêche systématiquement leur analyse. Par conséquent, des modèles génétiques oligogéniques ou polygéniques ne peuvent être explorés avec cette approche (Figure 6.4.4.2). Une approche populationnelle (cas-contrôles) serait plus puissante, non biaisée et aurait le potentiel d'identifier ces facteurs de risque. À titre d'exemple, le consortium Epi4K a répertorié à travers 4000 génomes, 329 mutations *de novo* dans 320 gènes chez 264 patients atteints d'encéphalopathie épileptique. Uniquement neuf gènes partageaient des mutations dans deux individus et plus⁸³.

6.4.4.2 Le modèle CD-RV vs CD-CV

Dans l'ensemble, les résultats des études génétiques sur l'épilepsie et d'autres troubles neurogénétiques, soutiennent l'hypothèse alternative d'un modèle CD-RV maladie commune – variant rare. Dans ce modèle, les variants génétiques rares présentent : 1) une fréquence de moins de 5 % de la population générale ; 2) une surreprésentation chez les individus affectés ; 3) un effet plus important sur la maladie (risque relatif >2) ; et 4) un effet fonctionnel direct. Avec les progrès des technologies de séquençage à grande échelle multiplex ou de séquençage à haut débit, il est maintenant possible d'obtenir la séquence de l'ensemble de l'exome (WES) et même de l'ensemble du génome (WGS) pour un individu donné. Ces approches méthodologiques étaient prédites pour être particulièrement puissantes dans le cas des troubles génétiques tels que l'épilepsie, les troubles de déficiences intellectuelles et les troubles neurodéveloppementaux connexes causés par des variants génétiques rares mais très pénétrants. Pour l'instant, nous n'arrivons à expliquer qu'un faible pourcentage du fardeau génétique de l'épilepsie. Plusieurs consortiums s'affèrent présentement à valider ou non ce

modèle. Nous saurons incessamment si cette hypothèse est valable pour l'épilepsie génétique généralisée.

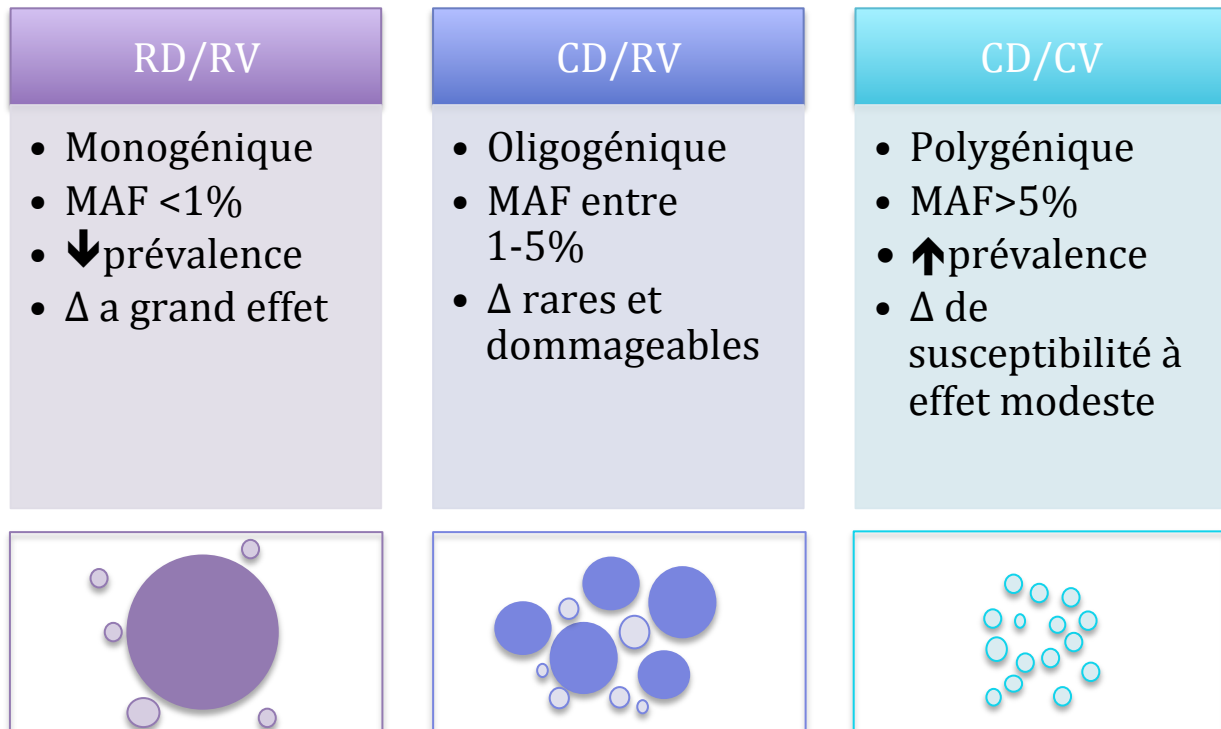


Figure 6.4.4.2. Modèles génétiques pour l'étude de l'épilepsie génétique généralisée

6.4.4.3 La distribution de mutations héritées et acquises dans le génome

Nous devons développer de nouvelles méthodologies et de nouveaux outils bio-informatiques afin de notamment intégrer l'ensemble des variants communs, rares et *de novo*. Ainsi, il faut évaluer de manière plus systématique le potentiel pathogénique d'un variant. Je désire souligner ici l'immense biais que nous créons présentement en laissant un « pouvoir » discrétionnaire beaucoup trop grand au généticien tout au long du processus d'analyse. Effectivement, cet outil devra incorporer les connaissances du gène dans lequel ils se trouvent. Par exemple, cet outil devra catégoriser les variants se retrouvant dans des gènes candidats ou déjà associés à la maladie. Les outils bioinformatiques et l'avancement des connaissances nous permettent de plus en plus de donner « un poids » aux variants et aux gènes, fournissant

ainsi un tableau plus complet du profil de susceptibilité d'un individu à développer l'épilepsie au cours de sa vie. Le pointage d'intolérance pour un gène (RVIS) développé par le laboratoire du Dr Goldstein au *Duke Center for Human for Human Variation* de même que les autres logiciels d'analyse *in silico* abordés dans la section 6.3.1 devront assurément faire partie de ces protocoles d'analyse¹⁹³.

Par ailleurs, nous avons traditionnellement cherché des mutations héritées d'un ou des deux parents. Par la suite, le rôle des mutations *de novo* dans l'étiologie de l'épilepsie a fait l'objet d'investigations, principalement dans les gènes déjà associés à cette maladie. Les mutations *de novo* peuvent survenir non seulement dans les gamètes des parents mais également au cours de l'embryogénèse, créant ainsi des mutations somatiques. Aujourd'hui, un nouvel effort de recherche est déployé afin d'explorer la fréquence des mutations somatiques dans plusieurs phénotypes neurodéveloppementaux tels que les troubles du spectre autistique, la déficience intellectuelle et l'épilepsie^{310,311}. Pour l'instant, les détecter représente un défi de taille puisque les stratégies de séquençage d'ADN utilisent principalement des échantillons sanguins. Les mutations somatiques peuvent engendrer des phénotypes sévères tels que le syndrome de Protée, qui résulte d'une mutation de l'oncogène *ARKT1* codant pour protéine kinase B³¹². De plus, les mutations somatiques peuvent également être à l'origine de maladies neurologiques. Des mutations somatiques dans *SCN1A* ont été décrites chez des cas atteints du syndrome de Dravet³¹³. Une étude travaillant directement avec des échantillons de tissus épileptiques extraits de cerveaux de patients avec hémimégalencéphalie a retrouvé de telles mutations dans *ARKT3*³¹⁰. Néanmoins, l'optimisation de nouvelles techniques telles que le séquençage d'une seule cellule, le séquençage à haut-débit et les MIPs combinés avec de meilleures analyses bioinformatiques, vont nous permettre d'aborder le rôle des mutations somatiques dans des maladies neurodéveloppementales. Bien entendu, ces dernières seront détectables uniquement si les mutations se sont produites tôt lors de la division cellulaire postzygotique. Elles seront alors présentes dans une petite proportion de cellules accessibles telles les leucocytes ou les fibroblastes de la peau³¹⁴.

6.5 Perspectives et pistes à explorer pour des études fonctionnelles ultérieures

6.5.1 Continuité sur notre modèle actuel

Les résultats présentés au chapitre 5 illustrent des modifications microscopiques de l'architecture cérébrale. Ils démontrent l'utilité de cibler des mutations dans des types de cellules neuronales spécifiques et comment nous avons pu étudier les conséquences sur les mécanismes de base dans ces types cellulaires en particulier. Ils ouvrent une porte sur la compréhension de la pathophysiologie de l'épilepsie. Les changements dans la formation des synapses GABAergiques et glutamatergiques peuvent causer un déséquilibre entre l'excitation et l'inhibition. Ainsi, il serait pertinent d'explorer si les récepteurs GABA_A porteurs d'une sous-unité $\alpha 1$ mutée modifient l'excitabilité des cellules pyramidales et s'ils permettent d'expliquer la désinhibition corticale soupçonnée chez les personnes épileptiques. Nous pourrions ainsi :

- a. Vérifier le chargement adéquat du GABA par VGAT dans les vésicules pré-synaptiques. Cette expérience nous permettrait d'exclure le mauvais relargage du GABA comme étant la cause des modifications morphologiques des épines dendritiques observées lorsque la sous-unité α du récepteur GABA_A est mutée.
- b. Effectuer l'enregistrement de courants post-synaptiques miniatures excitateurs (mEPSC) et inhibiteurs (mIPSC) de cellules pyramidales transfectées des coupes corticales organotypiques de six différents groupes : $GABRA1^{+/+}$; $GABRA1^{-/-}$; $GABRA1^{WT/WT}$; $GABRA1^{AD/AD}$; $GABRA1^{DN/DN}$; $GABRA1^{INS/INS}$. Selon les résultats de l'analyse morphologique, il semblerait qu'*a priori* la signalisation des cellules pyramidales puisse être altérée. De plus, il sera important de déterminer quel est le signal de sortie effectif des cellules pyramidales étant donné un effet contraire de la densité de synapses pour deux mutations (A322D et D219N). En effet, il semble que les mutations produisent des effets distincts sur la communication intercellulaire. Basé

sur les résultats des études *in vitro*, la sous-unité $\alpha 1$ -A322D possède un effet dominant négatif en réduisant sa propre expression ainsi que celle de d'autres sous-unités GABRA sauvages²⁰². Cette réduction du nombre de récepteurs GABA_A à la surface peut se traduire par une réduction de l'inhibition permettant ainsi une potentialisation à long terme (LTP) des synapses excitatrices, alors plus aptes à mûrir. Une augmentation de l'amplitude du courant post-synaptique excitateur (mEPSC) et une diminution de l'inhibition (mIPSC) seraient fort probablement observées. De plus, les investigations *in vitro* démontrent que le RGABA_A porteur de la mutation D219N ouvre plus longtemps en présence du GABA mais qu'il a moins d'affinité avec ce neurotransmetteur¹⁸³. Il sera donc pertinent de voir l'impact de ces changements cinétiques du RGABA_A mutant sur la balance excitation/inhibition. Enfin, la sous-unité $\alpha 1$ -K353delins18X mutante n'étant pas exprimée à la surface cellulaire, ce qui signifie qu'un système de secours impliquant l'assemblage de récepteurs contenant des sous-unités alternatives telles que $\alpha 3$ pourrait être mis en place. La transfection des neurones en phase de prolifération et de maturation²⁰⁶, soit à PN16, permettra d'investiguer l'impact de mutations de la sous-unité $\alpha 1$ sur la cinétique du récepteur lors du développement cérébral.

6.5.2 Limites du modèle

Bien que notre modèle soit adéquat pour investiguer la pathophysiologie de l'épilepsie, certaines questions ne peuvent être explorées. Effectivement, les patients épileptiques sont hétérozygotes pour les mutations sur le gène *GABRA1* alors que notre modèle inactive la totalité de la sous-unité $\alpha 1$ endogène et surexprime la forme mutante, créant ainsi un modèle d'étude homozygote. De plus, le faible taux de transfection nous permet d'un côté de bien mesurer l'effet de nos mutations sur l'arborisation neuronale et de l'autre, nous empêche de reproduire avec fidélité ce qui se passe dans le cerveau du patient puisque pour ce dernier la sous-unité mutante est exprimée dans l'ensemble du réseau neuronal. Bien sûr, des souris transgéniques (KI) possédant les mutations, à l'image de ce qu'il a été développé pour la mutation R82Q dans *GABRG2*, seraient préférables. Toutefois, les facteurs temps et argent limitent bien souvent la réalisation des projets auprès des modèles animaux *knock-in*.

6.5.3 Autres modèles d'avenir

6.5.3.1 Le modèle de cellule souche pluripotente induite

En continuité avec les intérêts développés par les découvertes de ce projet, nous pourrions envisager un projet reposant sur la technologie de reprogrammation cellulaire permettant de produire des lignées de cellules pluripotentes induites (iPS) à partir de lignées de fibroblastes dermiques humains. Ces lignées cellulaires pourraient ensuite être différenciées en divers types de neurones afin d'étudier les mécanismes biochimiques impliqués dans la fonction et dysfonction du développement neuronal dans un environnement épileptique. Ainsi, nous pourrions produire des iPS avec les fibroblastes de patients ÉGG ayant des génotypes différents obtenus par des biopsies de peau. Certaines pistes pourraient être explorées telles la variabilité phénotypique et l'impact des mutations dans les sous-unités du RGABA_A sur différents types cellulaires.

6.5.3.2 Modèles animaux

Les modèles d'animaux transgéniques *knock out* (KO) conditionnels pourraient être un outil alternatif au modèle de souris et de rats *knock out* traditionnels. En effet, les modèles *knock out* nous fournissent des informations sur l'impact des mutations dans l'ensemble du réseau neuronal. Toutefois, les modèles KO conditionnels n'expriment le gène mutant que dans un tissu et/ou à un moment particulier du développement, nous ouvrant ainsi une fenêtre d'étude spatiotemporelle plus précise. Une seconde option pourrait être la combinaison de shRNA et de l'électroporation *in utero*. En effet, ces approches sont rapides et moins coûteuses que le développement d'une lignée KO ou KI lorsqu'un nouveau gène associé à l'épilepsie est identifié. La section 1.2.6 fait état de mutations découvertes dans un nouveau gène *EFHC1*⁸⁹. La fonction étant encore méconnue à cette époque, des études fonctionnelles cherchant à comprendre son action sur la migration neuronale ont utilisé ces méthodes^{92,315}. À l'aide de ces techniques, on peut réprimer un gène *in utero*. Selon l'emplacement des électrodes et la période de développement, certains sous-ensembles de cellules corticales peuvent être ciblées. Ainsi, il est possible d'étudier la fonction de gènes sur le développement au cours de

l'embryogenèse. L'électroporation *in utero* offre une plus grande flexibilité puisque la répression du gène ciblé est observée 24 à 48 heures après la transfection comparativement à une transduction médiée par un virus qui peut prendre jusqu'à deux semaines avant d'agir³¹⁶. Finalement, l'optogénétique est un domaine de recherche novateur qui pourrait être une option intéressante dans l'avenir.

6.6 Les enjeux de nos recherches

Les travaux de recherche présentés ici constituent un travail multidisciplinaire dont nous sommes fiers. Par contre, nous sommes portés à croire que la recherche de nouveaux gènes est peu utile car un bon nombre de patients sont contrôlés par une médication qui ne changera pas, que les gènes soient découverts ou non.

Il est vrai qu'à première vue l'identification d'un possible gène causatif ne semble pas avoir d'impact automatique sur le patient porteur. Plusieurs découvertes viennent toutefois nous prouver le contraire. Prenons par exemple le cas des patients atteints du syndrome de Dravet pour qui nous avons pu expliquer leur pharmacorésistance. Par le passé, les médicaments bloquants principalement ou complètement le fonctionnement des canaux sodiques pouvaient provoquer une détérioration de la situation. À présent, un test génétique validant la présence de mutations sur le gène *SCN1A* permet aux intervenants d'exclure d'emblée ces médicaments. De plus, l'analyse du gène *SLC2A1* a permis d'expliquer le déficit de GLUT-1 chez certains patients pharmacorésistants. Un régime cétogène est alors envisagé comme traitement chez les porteurs. Ces exemples nous démontrent que les résultats génétiques aident à l'élaboration d'une stratégie de traitement et de prise en charge pour ces syndromes.

Deuxièmement, l'utilité des tests génétiques ne se limite pas qu'au développement de stratégies thérapeutiques. Il est important de considérer l'impact social de nos découvertes. L'identification de la cause de l'épilepsie d'une personne peut lui enlever un fardeau émotionnel. Le simple fait de « savoir pourquoi » peut aider à accepter la maladie. En outre, l'identification des gènes causals donne aux parents le pouvoir de consulter en conseil génétique et de partager leurs expériences avec d'autres. L'impact de la découverte de facteurs génétiques sur le patient est tangible et est susceptible d'augmenter dans l'avenir!

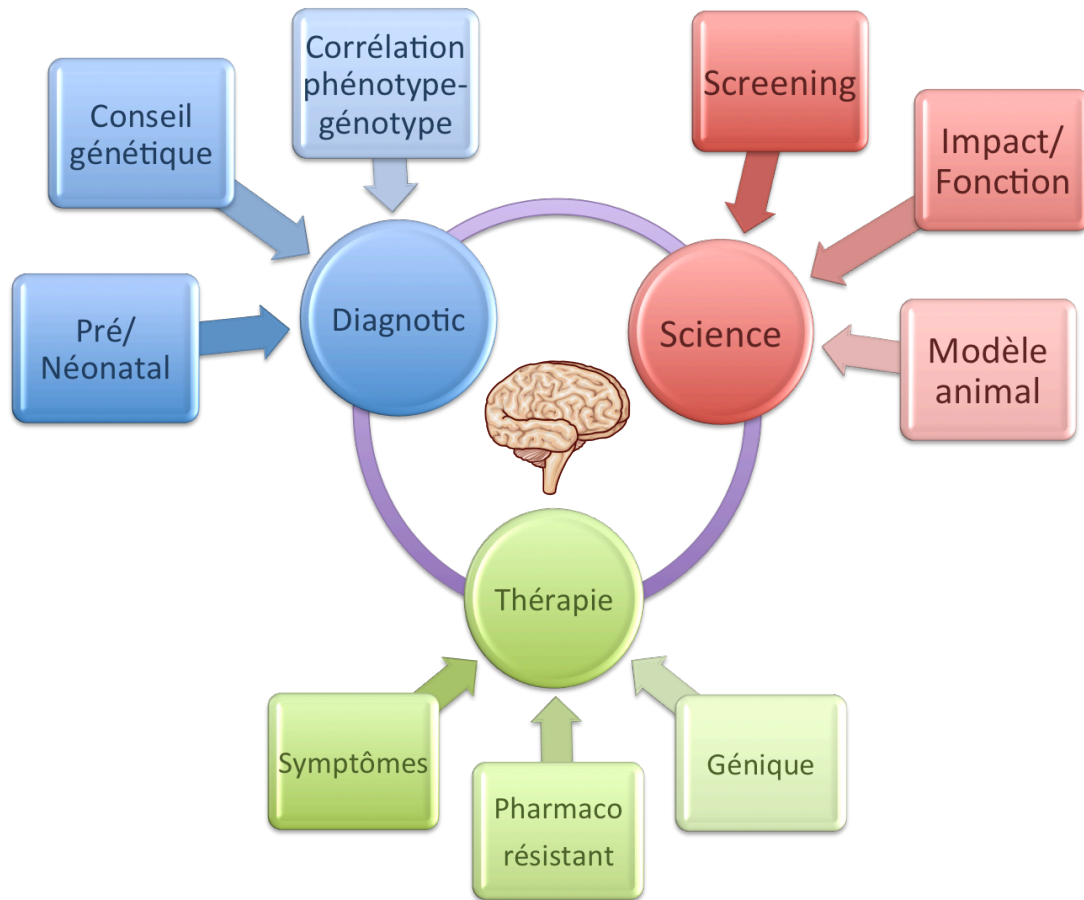


Figure 6.6.1. Ce diagramme illustre le concept « *from bench to bedside* »

Un idéal à atteindre lors de l'élaboration d'un projet de recherche en génétique. Ce diagramme met en évidence la transmission des connaissances « du laboratoire aux patients » des découvertes scientifiques.

7. Bibliographie

1. Meinardi, H., Scott, R.A., Reis, R., Sander, J.W. & World, I.C.o.t.D. The treatment gap in epilepsy: the current situation and ways forward. *Epilepsia* **42**, 136-49 (2001).
2. Tellez-Zenteno, J.F., Pondal-Sordo, M., Matijevic, S. & Wiebe, S. National and regional prevalence of self-reported epilepsy in Canada. *Epilepsia* **45**, 1623-9 (2004).
3. Mondiale, B. Rapport sur le développement dans le monde 1993 "Investir dans la santé". in *Oxford University Press* (Banque Mondiale, 1993).
4. Laxer, K.D. *et al.* The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy Behav* **37C**, 59-70 (2014).
5. Hermann, B.P., Seidenberg, M. & Bell, B. Psychiatric comorbidity in chronic epilepsy: identification, consequences, and treatment of major depression. *Epilepsia* **41 Suppl 2**, S31-41 (2000).
6. Jacoby, A. *et al.* Uptake and costs of care for epilepsy: findings from a U.K. regional study. *Epilepsia* **39**, 776-86 (1998).
7. Murray, M.I., Halpern, M.T. & Leppik, I.E. Cost of refractory epilepsy in adults in the USA. *Epilepsy Res* **23**, 139-48 (1996).
8. Fisher, R.S. *et al.* ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* **55**, 475-82 (2014).
9. Fisher, R.S. *et al.* Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* **46**, 470-2 (2005).
10. Ahmed, S.N. Epileptic seizures and epilepsy. *Epilepsia* **46**, 1700-1; author reply 1701-2 (2005).
11. Jallon, P. & Latour, P. Epidemiology of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia* **46 Suppl 9**, 10-4 (2005).
12. Berg, A.T. *et al.* Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* **51**, 676-85 (2010).
13. Kale, R. Bringing epilepsy out of the shadows. *BMJ* **315**, 2-3 (1997).
14. Pugliatti, M., Beghi, E., Forsgren, L., Ekman, M. & Sobocki, P. Estimating the cost of epilepsy in Europe: a review with economic modeling. *Epilepsia* **48**, 2224-33 (2007).
15. Kwan, P. & Brodie, M.J. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia* **46**, 224-35 (2005).
16. Wilby, J. *et al.* Clinical effectiveness, tolerability and cost-effectiveness of newer drugs for epilepsy in adults: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* **9**, 1-157, iii-iv (2005).
17. Mohammed, H.S. *et al.* Impact of epilepsy surgery on seizure control and quality of life: a 26-year follow-up study. *Epilepsia* **53**, 712-20 (2012).
18. Sander, J.W., Hart, Y.M., Johnson, A.L. & Shorvon, S.D. National General Practice Study of Epilepsy: newly diagnosed epileptic seizures in a general population. *Lancet* **336**, 1267-71 (1990).
19. Theodore, W.H. *et al.* Epilepsy in North America: a report prepared under the auspices of the global campaign against epilepsy, the International Bureau for Epilepsy, the

- International League Against Epilepsy, and the World Health Organization. *Epilepsia* **47**, 1700-22 (2006).
20. Banerjee, P.N., Filippi, D. & Allen Hauser, W. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. *Epilepsy Res* **85**, 31-45 (2009).
 21. Hauser, W.A., Annegers, J.F. & Kurland, L.T. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia* **34**, 453-68 (1993).
 22. Adelow, C. *et al.* Newly diagnosed single unprovoked seizures and epilepsy in Stockholm, Sweden: First report from the Stockholm Incidence Registry of Epilepsy (SIRE). *Epilepsia* **50**, 1094-101 (2009).
 23. Forsgren, L., Edvinsson, S.O., Nystrom, L. & Blomquist, H.K. Influence of epilepsy on mortality in mental retardation: an epidemiologic study. *Epilepsia* **37**, 956-63 (1996).
 24. Olafsson, E. *et al.* Incidence of unprovoked seizures and epilepsy in Iceland and assessment of the epilepsy syndrome classification: a prospective study. *Lancet Neurol* **4**, 627-34 (2005).
 25. Oun, A., Haldre, S. & Magi, M. Incidence of adult epilepsy in Estonia. *Acta Neurol Scand* **108**, 245-51 (2003).
 26. Kotsopoulos, I.A., van Merode, T., Kessels, F.G., de Krom, M.C. & Knottnerus, J.A. Systematic review and meta-analysis of incidence studies of epilepsy and unprovoked seizures. *Epilepsia* **43**, 1402-9 (2002).
 27. de Boer, H.M., Mula, M. & Sander, J.W. The global burden and stigma of epilepsy. *Epilepsy Behav* **12**, 540-6 (2008).
 28. Corey, L.A. *et al.* The occurrence of epilepsy and febrile seizures in Virginian and Norwegian twins. *Neurology* **41**, 1433-6 (1991).
 29. Marshall, A.G., Hutchinson, E.O. & Honisett, J. Heredity in common diseases. A retrospective survey of twins in a hospital population. *Br Med J* **1**, 1-6 (1962).
 30. Schiottz-Christensen, E. Genetic factors in febrile convulsions. An investigation of 64 same-sexed twin pairs. *Acta Neurol Scand* **48**, 538-46 (1972).
 31. Sillanpaa, M., Koskenvuo, M., Romanov, K. & Kaprio, J. Genetic factors in epileptic seizures: evidence from a large twin population. *Acta Neurol Scand* **84**, 523-6 (1991).
 32. Berkovic, S.F., Howell, R.A., Hay, D.A. & Hopper, J.L. Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Ann Neurol* **43**, 435-45 (1998).
 33. Zara, F. *et al.* Mapping of genes predisposing to idiopathic generalized epilepsy. *Hum Mol Genet* **4**, 1201-7 (1995).
 34. Vadlamudi, L. *et al.* Epilepsy in twins: insights from unique historical data of William Lennox. *Neurology* **62**, 1127-33 (2004).
 35. Annegers, J.F., Hauser, W.A., Anderson, V.E. & Kurland, L.T. The risks of seizure disorders among relatives of patients with childhood onset epilepsy. *Neurology* **32**, 174-9 (1982).
 36. Jain, S., Padma, M.V., Puri, A., Jyoti & Maheshwari, M.C. Occurrence of epilepsies in family members of Indian probands with different epileptic syndromes. *Epilepsia* **38**, 237-44 (1997).
 37. Risch, N. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am J Hum Genet* **46**, 222-8 (1990).

38. Lachance-Touchette, P. *et al.* Screening of GABRB3 in French-Canadian families with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia* **51**, 1894-7 (2010).
39. Wallace, R.H. *et al.* Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet* **28**, 49-52 (2001).
40. Baulac, S. *et al.* First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* **28**, 46-8 (2001).
41. Cossette, P. *et al.* Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* **31**, 184-9 (2002).
42. Marini, C. *et al.* Genetic architecture of idiopathic generalized epilepsy: clinical genetic analysis of 55 multiplex families. *Epilepsia* **45**, 467-78 (2004).
43. International HapMap, C. *et al.* A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* **449**, 851-61 (2007).
44. Pinto, D. *et al.* Genome-wide linkage scan of epilepsy-related photoparoxysmal electroencephalographic response: evidence for linkage on chromosomes 7q32 and 16p13. *Hum Mol Genet* **14**, 171-8 (2005).
45. Sander, T. *et al.* Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies. *Hum Mol Genet* **9**, 1465-72 (2000).
46. Audenaert, D. *et al.* A novel susceptibility locus at 2p24 for generalised epilepsy with febrile seizures plus. *J Med Genet* **42**, 947-52 (2005).
47. Durner, M. *et al.* Genome scan of idiopathic generalized epilepsy: evidence for major susceptibility gene and modifying genes influencing the seizure type. *Ann Neurol* **49**, 328-35 (2001).
48. Durner, M. *et al.* Localization of idiopathic generalized epilepsy on chromosome 6p in families of juvenile myoclonic epilepsy patients. *Neurology* **41**, 1651-5 (1991).
49. Greenberg, D.A. *et al.* Juvenile myoclonic epilepsy (JME) may be linked to the BF and HLA loci on human chromosome 6. *Am J Med Genet* **31**, 185-92 (1988).
50. Weissbecker, K.A. *et al.* Confirmation of linkage between juvenile myoclonic epilepsy locus and the HLA region of chromosome 6. *Am J Med Genet* **38**, 32-6 (1991).
51. Liu, A.W. *et al.* Juvenile myoclonic epilepsy in chromosome 6p12-p11: locus heterogeneity and recombinations. *Am J Med Genet* **63**, 438-46 (1996).
52. Durner, M. *et al.* Evidence for linkage of adolescent-onset idiopathic generalized epilepsies to chromosome 8-and genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* **64**, 1411-9 (1999).
53. Fong, G.C. *et al.* Childhood absence epilepsy with tonic-clonic seizures and electroencephalogram 3-4-Hz spike and multispikes-slow wave complexes: linkage to chromosome 8q24. *Am J Hum Genet* **63**, 1117-29 (1998).
54. Elmslie, F.V. *et al.* Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. *Hum Mol Genet* **6**, 1329-34 (1997).
55. Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Harkin, L.A., Berkovic, S.F. & Dibbens, L.M. Susceptibility genes for complex epilepsy. *Hum Mol Genet* **14 Spec No. 2**, R243-9 (2005).
56. Sander, T. *et al.* Exploration of a putative susceptibility locus for idiopathic generalized epilepsy on chromosome 8p12. *Epilepsia* **44**, 32-9 (2003).
57. Turnbull, J. *et al.* Sacred disease secrets revealed: the genetics of human epilepsy. *Hum Mol Genet* **14**, 2491-500 (2005).

58. Helbig, I., Scheffer, I.E., Mulley, J.C. & Berkovic, S.F. Navigating the channels and beyond: unravelling the genetics of the epilepsies. *Lancet Neurol* **7**, 231-45 (2008).
59. Wallace, R.H. *et al.* Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet* **19**, 366-70 (1998).
60. Phillips, H.A. *et al.* Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 20q 13.2. *Nat Genet* **10**, 117-8 (1995).
61. Steinlein, O.K. *et al.* An insertion mutation of the CHRNA4 gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Hum Mol Genet* **6**, 943-7 (1997).
62. Steinlein, O.K. *et al.* A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* **11**, 201-3 (1995).
63. Leppert, M. *et al.* Benign familial neonatal convulsions linked to genetic markers on chromosome 20. *Nature* **337**, 647-8 (1989).
64. Malafosse, A. *et al.* Confirmation of linkage of benign familial neonatal convulsions to D20S19 and D20S20. *Hum Genet* **89**, 54-8 (1992).
65. Lewis, T.B., Leach, R.J., Ward, K., O'Connell, P. & Ryan, S.G. Genetic heterogeneity in benign familial neonatal convulsions: identification of a new locus on chromosome 8q. *Am J Hum Genet* **53**, 670-5 (1993).
66. Biervert, C. *et al.* A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* **279**, 403-6 (1998).
67. Singh, N.A. *et al.* A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* **18**, 25-9 (1998).
68. Charlier, C. *et al.* A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* **18**, 53-5 (1998).
69. Kasperaviciute, D. *et al.* Common genetic variation and susceptibility to partial epilepsies: a genome-wide association study. *Brain* **133**, 2136-47 (2010).
70. Guo, Y. *et al.* Two-stage genome-wide association study identifies variants in CAMSAP1L1 as susceptibility loci for epilepsy in Chinese. *Hum Mol Genet* **21**, 1184-9 (2012).
71. Consortium, E. *et al.* Genome-wide association analysis of genetic generalized epilepsies implicates susceptibility loci at 1q43, 2p16.1, 2q22.3 and 17q21.32. *Hum Mol Genet* **21**, 5359-72 (2012).
72. Helbig, I. *et al.* 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet* **41**, 160-2 (2009).
73. Mefford, H.C. *et al.* Genome-wide copy number variation in epilepsy: novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies. *PLoS Genet* **6**, e1000962 (2010).
74. Sharp, A.J. *et al.* A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet* **40**, 322-8 (2008).
75. International Schizophrenia, C. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* **455**, 237-41 (2008).
76. Koolen, D.A. *et al.* A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat Genet* **38**, 999-1001 (2006).
77. Sebat, J. *et al.* Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* **316**, 445-9 (2007).

78. Xu, B. *et al.* Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nat Genet* **40**, 880-5 (2008).
79. de Kovel, C.G. *et al.* Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies. *Brain* **133**, 23-32 (2010).
80. Dibbens, L.M. *et al.* The role of neuronal GABA(A) receptor subunit mutations in idiopathic generalized epilepsies. *Neurosci Lett* **453**, 162-5 (2009).
81. Mefford, H.C. *et al.* Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies. *Ann Neurol* **70**, 974-85 (2011).
82. Marini, C. *et al.* The genetics of Dravet syndrome. *Epilepsia* **52 Suppl 2**, 24-9 (2011).
83. Epi, K.C. *et al.* De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature* **501**, 217-21 (2013).
84. Lemke, J.R. *et al.* Mutations in GRIN2A cause idiopathic focal epilepsy with rolandic spikes. *Nat Genet* **45**, 1067-72 (2013).
85. Lesca, G. *et al.* GRIN2A mutations in acquired epileptic aphasia and related childhood focal epilepsies and encephalopathies with speech and language dysfunction. *Nat Genet* **45**, 1061-6 (2013).
86. Carvill, G.L. *et al.* Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nat Genet* **45**, 825-30 (2013).
87. Reid, C.A., Berkovic, S.F. & Petrou, S. Mechanisms of human inherited epilepsies. *Prog Neurobiol* **87**, 41-57 (2009).
88. Reid, C.A. *et al.* Multiple molecular mechanisms for a single GABAA mutation in epilepsy. *Neurology* **80**, 1003-8 (2013).
89. Suzuki, T. *et al.* Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* **36**, 842-9 (2004).
90. de Nijs, L. *et al.* EFHC1, a protein mutated in juvenile myoclonic epilepsy, associates with the mitotic spindle through its N-terminus. *Exp Cell Res* **312**, 2872-9 (2006).
91. Conte, F.F. *et al.* Expression profile and distribution of Efhc1 gene transcript during rodent brain development. *J Mol Neurosci* **39**, 69-77 (2009).
92. de Nijs, L. *et al.* EFHC1 interacts with microtubules to regulate cell division and cortical development. *Nat Neurosci* **12**, 1266-74 (2009).
93. Suzuki, T. *et al.* Efhc1 deficiency causes spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility. *Hum Mol Genet* **18**, 1099-109 (2009).
94. Annesi, F. *et al.* Mutational analysis of EFHC1 gene in Italian families with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia* **48**, 1686-90 (2007).
95. Ma, S. *et al.* Mutations in the GABRA1 and EFHC1 genes are rare in familial juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Res* **71**, 129-34 (2006).
96. Pinto, D. *et al.* Heterogeneity at the JME 6p11-12 locus: absence of mutations in the EFHC1 gene in linked Dutch families. *Epilepsia* **47**, 1743-6 (2006).
97. Stogmann, E. *et al.* Idiopathic generalized epilepsy phenotypes associated with different EFHC1 mutations. *Neurology* **67**, 2029-31 (2006).
98. Bai, D. *et al.* DNA variants in coding region of EFHC1: SNPs do not associate with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia* **50**, 1184-90 (2009).
99. Gu, W., Sander, T., Heils, A., Lenzen, K.P. & Steinlein, O.K. A new EF-hand containing gene EFHC2 on Xp11.4: tentative evidence for association with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Res* **66**, 91-8 (2005).

100. Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.L., Tyzio, R. & Khazipov, R. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* **87**, 1215-84 (2007).
101. Farrant, M. & Nusser, Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* **6**, 215-29 (2005).
102. Han, H.A., Cortez, M.A. & Snead, O.C. GABAB Receptor and Absence Epilepsy. in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (eds. Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W. & Delgado-Escueta, A.V.) (Bethesda (MD), 2012).
103. Barnard, E.A. *et al.* International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* **50**, 291-313 (1998).
104. Sieghart, W. & Sperk, G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* **2**, 795-816 (2002).
105. Vicini, S. Pharmacologic significance of the structural heterogeneity of the GABAA receptor-chloride ion channel complex. *Neuropsychopharmacology* **4**, 9-15 (1991).
106. Mohler, H. GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res* **326**, 505-16 (2006).
107. Glykys, J. & Mody, I. Activation of GABAA receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron* **56**, 763-70 (2007).
108. Whiting, P.J. The GABAA receptor gene family: new opportunities for drug development. *Curr Opin Drug Discov Devel* **6**, 648-57 (2003).
109. Mohler, H., Fritschy, J.M., Vogt, K., Crestani, F. & Rudolph, U. Pathophysiology and pharmacology of GABA(A) receptors. *Handb Exp Pharmacol*, 225-47 (2005).
110. Ernst, M., Bruckner, S., Boesch, S. & Sieghart, W. Comparative models of GABAA receptor extracellular and transmembrane domains: important insights in pharmacology and function. *Mol Pharmacol* **68**, 1291-300 (2005).
111. Lukasiewicz, P.D. GABAC receptors in the vertebrate retina. *Mol Neurobiol* **12**, 181-94 (1996).
112. Russek, S.J. Evolution of GABA(A) receptor diversity in the human genome. *Gene* **227**, 213-22 (1999).
113. Darlison, M.G., Pahal, I. & Thode, C. Consequences of the evolution of the GABA(A) receptor gene family. *Cell Mol Neurobiol* **25**, 607-24 (2005).
114. Ben-Ari, Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* **3**, 728-39 (2002).
115. Rivera, C., Voipio, J. & Kaila, K. Two developmental switches in GABAergic signalling: the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *J Physiol* **562**, 27-36 (2005).
116. Rivera, C. *et al.* The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251-5 (1999).
117. Ganguly, K., Schinder, A.F., Wong, S.T. & Poo, M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* **105**, 521-32 (2001).
118. Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R. & Gaiarsa, J.L. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* **416**, 303-25 (1989).

119. Owens, D.F. & Kriegstein, A.R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* **3**, 715-27 (2002).
120. Ben-Ari, Y. Basic developmental rules and their implications for epilepsy in the immature brain. *Epileptic Disord* **8**, 91-102 (2006).
121. Crunelli, V. & Leresche, N. Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. *Nat Rev Neurosci* **3**, 371-82 (2002).
122. Chen, Y. *et al.* Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann Neurol* **54**, 239-43 (2003).
123. Liang, J. *et al.* Common polymorphisms in the CACNA1H gene associated with childhood absence epilepsy in Chinese Han population. *Ann Hum Genet* **71**, 325-35 (2007).
124. Everett, K. *et al.* Linkage and mutational analysis of CLCN2 in childhood absence epilepsy. *Epilepsy Res* **75**, 145-53 (2007).
125. Maljevic, S. *et al.* A mutation in the GABA(A) receptor alpha(1)-subunit is associated with absence epilepsy. *Ann Neurol* **59**, 983-7 (2006).
126. Dibbens, L.M. *et al.* GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet* **13**, 1315-9 (2004).
127. Marini, C. *et al.* Childhood absence epilepsy and febrile seizures: a family with a GABA(A) receptor mutation. *Brain* **126**, 230-40 (2003).
128. Tanaka, M. *et al.* Hyperglycosylation and reduced GABA currents of mutated GABRB3 polypeptide in remitting childhood absence epilepsy. *Am J Hum Genet* **82**, 1249-61 (2008).
129. Kinirons, P. *et al.* Phenotypic concordance in 70 families with IGE-implications for genetic studies of epilepsy. *Epilepsy Res* **82**, 21-28 (2008).
130. Kryukov, G.V., Pennacchio, L.A. & Sunyaev, S.R. Most rare missense alleles are deleterious in humans: implications for complex disease and association studies. *Am J Hum Genet* **80**, 727-39 (2007).
131. Reid, C.A. & Kullmann, D.M. GABAA receptor mutations in epilepsy (commentary on Lachance-Touchette *et al.*). *Eur J Neurosci* **34**, 235-6 (2011).
132. McCorry, D. *et al.* An association between type 1 diabetes and idiopathic generalized epilepsy. *Ann Neurol* **59**, 204-6 (2006).
133. Catterall, W.A., Kalume, F. & Oakley, J.C. NaV1.1 channels and epilepsy. *J.Physiol* **588**, 1849-1859 (2010).
134. Hahn, A. & Neubauer, B.A. Sodium and potassium channel dysfunctions in rare and common idiopathic epilepsy syndromes. *Brain Dev.* **31**, 515-520 (2009).
135. Macdonald, R.L., Kang, J.Q. & Gallagher, M.J. Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. *J Physiol* **588**, 1861-9 (2010).
136. Scheffer, I.E. & Berkovic, S.F. The genetics of human epilepsy. *Trends Pharmacol.Sci.* **24**, 428-433 (2003).
137. Zamponi, G.W., Lory, P. & Perez-Reyes, E. Role of voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Pflugers Arch.* **460**, 395-403 (2010).
138. Kullmann, D.M. & Waxman, S.G. Neurological channelopathies: new insights into disease mechanisms and ion channel function. *J.Physiol* **588**, 1823-1827 (2010).

139. Pal, D.K. *et al.* BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for common juvenile myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet* **73**, 261-70 (2003).
140. Galanopoulou, A.S. Mutations affecting GABAergic signaling in seizures and epilepsy. *Pflugers Arch* **460**, 505-23 (2010).
141. Ben-Ari, Y. Seizures beget seizures: the quest for GABA as a key player. *Crit Rev Neurobiol* **18**, 135-44 (2006).
142. Olsen, R.W. & Sieghart, W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol.Rev.* **60**, 243-260 (2008).
143. Chang, Y., Wang, R., Barot, S. & Weiss, D.S. Stoichiometry of a recombinant GABAA receptor. *J.Neurosci.* **16**, 5415-5424 (1996).
144. Sarto-Jackson, I. & Sieghart, W. Assembly of GABA(A) receptors (Review). *Mol.Membr.Biol.* **25**, 302-310 (2008).
145. Audenaert, D. *et al.* A novel GABRG2 mutation associated with febrile seizures. *Neurology* **67**, 687-90 (2006).
146. Harkin, L.A. *et al.* Truncation of the GABA(A)-receptor gamma2 subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet* **70**, 530-6 (2002).
147. Kananura, C. *et al.* A splice-site mutation in GABRG2 associated with childhood absence epilepsy and febrile convulsions. *Arch Neurol* **59**, 1137-41 (2002).
148. Shi, X. *et al.* Mutational analysis of GABRG2 in a Japanese cohort with childhood epilepsies. *J Hum Genet* **55**, 375-8 (2010).
149. Sun, H. *et al.* Gene symbol: GABRG2. Disease: Generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Hum.Genet.* **124**, 298 (2008).
150. Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M.Q. & Krainer, A.R. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3568-3571 (2003).
151. Fairbrother, W.G., Yeh, R.F., Sharp, P.A. & Burge, C.B. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* **297**, 1007-1013 (2002).
152. Krampfl, K. *et al.* Molecular analysis of the A322D mutation in the GABA receptor alpha-subunit causing juvenile myoclonic epilepsy. *Eur J Neurosci* **22**, 10-20 (2005).
153. Bowie, D. External anions and cations distinguish between AMPA and kainate receptor gating mechanisms. *J Physiol* **539**, 725-733 (2002).
154. Keren, H., Lev-Maor, G. & Ast, G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet* **11**, 345-55 (2010).
155. Jones, M.V. & Westbrook, G.L. The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci.* **19**, 96-101 (1996).
156. Boileau, A.J., Li, T., Benkwitz, C., Czajkowski, C. & Pearce, R.A. Effects of gamma2S subunit incorporation on GABAA receptor macroscopic kinetics. *Neuropharmacology* **44**, 1003-12 (2003).
157. Verdoorn, T.A., Draguhn, A., Ymer, S., Seeburg, P.H. & Sakmann, B. Functional properties of recombinant rat GABAA receptors depend upon subunit composition. *Neuron* **4**, 919-928 (1990).

158. Mizielinska, S., Greenwood, S. & Connolly, C.N. The role of GABAA receptor biogenesis, structure and function in epilepsy. *Biochem Soc Trans* **34**, 863-7 (2006).
159. Unwin, N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. *J.Mol.Biol.* **346**, 967-989 (2005).
160. Olsen, R.W. & Sieghart, W. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* **56**, 141-148 (2009).
161. Celentano, J.J. & Wong, R.K. Multiphasic desensitization of the GABAA receptor in outside-out patches. *Biophys.J.* **66**, 1039-1050 (1994).
162. Lema, G.M. & Auerbach, A. Modes and models of GABA(A) receptor gating. *J.Physiol* **572**, 183-200 (2006).
163. Draguhn, A., Verdorn, T.A., Ewert, M., Seeburg, P.H. & Sakmann, B. Functional and molecular distinction between recombinant rat GABAA receptor subtypes by Zn²⁺. *Neuron* **5**, 781-788 (1990).
164. Hosie, A.M., Dunne, E.L., Harvey, R.J. & Smart, T.G. Zinc-mediated inhibition of GABA(A) receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity. *Nat.Neurosci.* **6**, 362-369 (2003).
165. Wimmer, V.C., Reid, C.A., So, E.Y., Berkovic, S.F. & Petrou, S. Axon initial segment dysfunction in epilepsy. *J.Physiol* **588**, 1829-1840 (2010).
166. Kang, J.Q., Shen, W. & Macdonald, R.L. Why does fever trigger febrile seizures? GABAA receptor gamma2 subunit mutations associated with idiopathic generalized epilepsies have temperature-dependent trafficking deficiencies. *J Neurosci* **26**, 2590-7 (2006).
167. Kang, J.Q. & Macdonald, R.L. Making sense of nonsense GABA(A) receptor mutations associated with genetic epilepsies. *Trends Mol Med* **15**, 430-8 (2009).
168. Essrich, C., Lorez, M., Benson, J.A., Fritschy, J.M. & Luscher, B. Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat.Neurosci.* **1**, 563-571 (1998).
169. Boileau, A.J., Kucken, A.M., Evers, A.R. & Czajkowski, C. Molecular dissection of benzodiazepine binding and allosteric coupling using chimeric gamma-aminobutyric acidA receptor subunits. *Mol.Pharmacol.* **53**, 295-303 (1998).
170. Sigel, E. & Buhr, A. The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends Pharmacol.Sci.* **18**, 425-429 (1997).
171. Bowser, D.N. *et al.* Altered kinetics and benzodiazepine sensitivity of a GABAA receptor subunit mutation [gamma 2(R43Q)] found in human epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15170-5 (2002).
172. Goldschen-Ohm, M.P., Wagner, D.A., Petrou, S. & Jones, M.V. An epilepsy-related region in the GABA(A) receptor mediates long-distance effects on GABA and benzodiazepine binding sites. *Mol Pharmacol* **77**, 35-45 (2010).
173. Ogiwara, I. *et al.* Na(v)1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J.Neurosci.* **27**, 5903-5914 (2007).
174. Yu, F.H. *et al.* Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat.Neurosci.* **9**, 1142-1149 (2006).
175. Tan, H.O. *et al.* Reduced cortical inhibition in a mouse model of familial childhood absence epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17536-41 (2007).

176. Chiu, C. *et al.* Developmental impact of a familial GABAA receptor epilepsy mutation. *Ann Neurol* **64**, 284-93 (2008).
177. Stuart, G., Spruston, N., Sakmann, B. & Hausser, M. Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci.* **20**, 125-131 (1997).
178. WHO. Epilepsy. (WHO Fact sheet N°999, 2012).
179. Cossette, P., Lachance-Touchette, P. & Rouleau, G.A. Mutated GABAA receptor subunits in idiopathic generalized epilepsy. in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (eds. Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W. & Delgado-Escueta, A.V.) (Bethesda (MD), 2012).
180. Heron, S.E., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., Dibbens, L.M. & Mulley, J.C. Channelopathies in idiopathic epilepsy. *Neurotherapeutics* **4**, 295-304 (2007).
181. Kalachikov, S. *et al.* Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* **30**, 335-41 (2002).
182. Carvill, G.L. *et al.* GABRA1 and STXBP1: Novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology* **82**, 1245-53 (2014).
183. Lachance-Touchette, P. *et al.* Novel alpha1 and gamma2 GABAA receptor subunit mutations in families with idiopathic generalized epilepsy. *Eur J Neurosci* **34**, 237-49 (2011).
184. Klassen, T. *et al.* Exome sequencing of ion channel genes reveals complex profiles confounding personal risk assessment in epilepsy. *Cell* **145**, 1036-48 (2011).
185. Hancili, S. *et al.* The GABAA receptor gamma2 subunit (R43Q) mutation in febrile seizures. *Pediatr Neurol* **50**, 353-6 (2014).
186. Ishii, A. *et al.* Association of nonsense mutation in GABRG2 with abnormal trafficking of GABAA receptors in severe epilepsy. *Epilepsy Res* **108**, 420-32 (2014).
187. Johnston, A.J. *et al.* A novel GABRG2 mutation, p.R136*, in a family with GEFS+ and extended phenotypes. *Neurobiol Dis* **64**, 131-41 (2014).
188. Tian, M. *et al.* Impaired surface alphabeta gamma GABA(A) receptor expression in familial epilepsy due to a GABRG2 frameshift mutation. *Neurobiol Dis* **50**, 135-41 (2013).
189. Lenzen, K.P., Heils, A., Lorenz, S., Hempelmann, A. & Sander, T. Association analysis of the Arg220His variation of the human gene encoding the GABA delta subunit with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res* **65**, 53-7 (2005).
190. Haines, J.L. The importance of rare DNA variation in neurologic disease: cautionary tale. *Neurology* **80**, 974-5 (2013).
191. ILEA. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* **30**, 389-99 (1989).
192. Wu, M.C. *et al.* Rare-variant association testing for sequencing data with the sequence kernel association test. *Am J Hum Genet* **89**, 82-93 (2011).
193. Petrovski, S., Wang, Q., Heinzen, E.L., Allen, A.S. & Goldstein, D.B. Genic intolerance to functional variation and the interpretation of personal genomes. *PLoS Genet* **9**, e1003709 (2013).
194. Tan, N.C. & Berkovic, S.F. The Epilepsy Genetic Association Database (epiGAD): analysis of 165 genetic association studies, 1996-2008. *Epilepsia* **51**, 686-9 (2010).

195. Adzhubei, I.A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* **7**, 248-9 (2010).
196. Siepel, A. *et al.* Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res* **15**, 1034-50 (2005).
197. Grantham, R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* **185**, 862-4 (1974).
198. Sun, H. *et al.* SCN1A, SCN1B, and GABRG2 gene mutation analysis in Chinese families with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *J Hum Genet* **53**, 769-74 (2008).
199. Arain, F.M., Boyd, K.L. & Gallagher, M.J. Decreased viability and absence-like epilepsy in mice lacking or deficient in the GABAA receptor alpha1 subunit. *Epilepsia* **53**, e161-5 (2012).
200. Gallagher, M.J., Ding, L., Maheshwari, A. & Macdonald, R.L. The GABAA receptor alpha1 subunit epilepsy mutation A322D inhibits transmembrane helix formation and causes proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12999-3004 (2007).
201. Gallagher, M.J., Song, L., Arain, F. & Macdonald, R.L. The juvenile myoclonic epilepsy GABA(A) receptor alpha1 subunit mutation A322D produces asymmetrical, subunit position-dependent reduction of heterozygous receptor currents and alpha1 subunit protein expression. *J Neurosci* **24**, 5570-8 (2004).
202. Ding, L. *et al.* GABA(A) receptor alpha1 subunit mutation A322D associated with autosomal dominant juvenile myoclonic epilepsy reduces the expression and alters the composition of wild type GABA(A) receptors. *J Biol Chem* **285**, 26390-405 (2010).
203. Bernard, C. Alterations in synaptic function in epilepsy. in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (eds. Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W. & Delgado-Escueta, A.V.) (Bethesda (MD), 2012).
204. Kilb, W., Kirischuk, S. & Luhmann, H.J. Role of tonic GABAergic currents during pre- and early postnatal rodent development. *Front Neural Circuits* **7**, 139 (2013).
205. Gaiarsa, J.L. & Porcher, C. Emerging neurotrophic role of GABAB receptors in neuronal circuit development. *Front Cell Neurosci* **7**, 206 (2013).
206. Chattopadhyaya, B. *et al.* GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. *Neuron* **54**, 889-903 (2007).
207. Wu, X. *et al.* GABA signaling promotes synapse elimination and axon pruning in developing cortical inhibitory interneurons. *J Neurosci* **32**, 331-43 (2012).
208. Baho, E. & Di Cristo, G. Neural activity and neurotransmission regulate the maturation of the innervation field of cortical GABAergic interneurons in an age-dependent manner. *J Neurosci* **32**, 911-8 (2012).
209. Hayama, T. *et al.* GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca²⁺ signaling. *Nat Neurosci* **16**, 1409-16 (2013).
210. Macdonald, R.L. & Kang, J.Q. Molecular pathology of genetic epilepsies associated with GABAA receptor subunit mutations. *Epilepsy Curr* **9**, 18-23 (2009).
211. Vicini, S. *et al.* GABA(A) receptor alpha1 subunit deletion prevents developmental changes of inhibitory synaptic currents in cerebellar neurons. *J Neurosci* **21**, 3009-16 (2001).

212. Chattopadhyaya, B. *et al.* Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci* **24**, 9598-611 (2004).
213. Li, M.Z. & Elledge, S.J. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods* **4**, 251-6 (2007).
214. Stoppini, L., Buchs, P.A. & Muller, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* **37**, 173-82 (1991).
215. Chattopadhyaya, B., Baho, E., Huang, Z.J., Schachner, M. & Di Cristo, G. Neural cell adhesion molecule-mediated Fyn activation promotes GABAergic synapse maturation in postnatal mouse cortex. *J Neurosci* **33**, 5957-68 (2013).
216. Rossignol, E. Genetics and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders. *Neural Plast* **2011**, 649325 (2011).
217. Ma, Y., Ramachandran, A., Ford, N., Parada, I. & Prince, D.A. Remodeling of dendrites and spines in the C1q knockout model of genetic epilepsy. *Epilepsia* **54**, 1232-9 (2013).
218. Wong, M. Modulation of dendritic spines in epilepsy: cellular mechanisms and functional implications. *Epilepsy Behav* **7**, 569-77 (2005).
219. Isokawa, M. Remodeling dendritic spines of dentate granule cells in temporal lobe epilepsy patients and the rat pilocarpine model. *Epilepsia* **41 Suppl 6**, S14-7 (2000).
220. Multani, P., Myers, R.H., Blume, H.W., Schomer, D.L. & Sotrel, A. Neocortical dendritic pathology in human partial epilepsy: a quantitative Golgi study. *Epilepsia* **35**, 728-36 (1994).
221. Haider, B. & McCormick, D.A. Rapid neocortical dynamics: cellular and network mechanisms. *Neuron* **62**, 171-89 (2009).
222. Trevelyan, A.J., Baldeweg, T., van Drongelen, W., Yuste, R. & Whittington, M. The source of afterdischarge activity in neocortical tonic-clonic epilepsy. *J Neurosci* **27**, 13513-9 (2007).
223. Di Cristo, G. *et al.* Subcellular domain-restricted GABAergic innervation in primary visual cortex in the absence of sensory and thalamic inputs. *Nat Neurosci* **7**, 1184-6 (2004).
224. Dunaevsky, A., Tashiro, A., Majewska, A., Mason, C. & Yuste, R. Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 13438-43 (1999).
225. Di Cristo, G. *et al.* Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. *Nat Neurosci* **10**, 1569-77 (2007).
226. Lee, K.F., Soares, C. & Beique, J.C. Examining form and function of dendritic spines. *Neural Plast* **2012**, 704103 (2012).
227. Bosman, L.W., Heinen, K., Spijker, S. & Brussaard, A.B. Mice lacking the major adult GABAA receptor subtype have normal number of synapses, but retain juvenile IPSC kinetics until adulthood. *J Neurophysiol* **94**, 338-46 (2005).
228. Zeller, A. *et al.* Inhibitory ligand-gated ion channels as substrates for general anesthetic actions. *Handb Exp Pharmacol*, 31-51 (2008).
229. Kralic, J.E. *et al.* Compensatory alteration of inhibitory synaptic circuits in cerebellum and thalamus of gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha1 subunit knockout mice. *J Comp Neurol* **495**, 408-21 (2006).

230. Fritschy, J.M. & Panzanelli, P. Molecular and synaptic organization of GABAA receptors in the cerebellum: Effects of targeted subunit gene deletions. *Cerebellum* **5**, 275-85 (2006).
231. Queenan, B.N., Lee, K.J. & Pak, D.T. Wherefore art thou, homeo(stasis)? Functional diversity in homeostatic synaptic plasticity. *Neural Plast* **2012**, 718203 (2012).
232. Carlson, G., Wang, Y. & Alger, B.E. Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nat Neurosci* **5**, 723-4 (2002).
233. Liu, Q.S., Pu, L. & Poo, M.M. Repeated cocaine exposure in vivo facilitates LTP induction in midbrain dopamine neurons. *Nature* **437**, 1027-31 (2005).
234. Whissell, P.D. *et al.* Acutely increasing deltaGABA(A) receptor activity impairs memory and inhibits synaptic plasticity in the hippocampus. *Front Neural Circuits* **7**, 146 (2013).
235. Luscher, C., Nicoll, R.A., Malenka, R.C. & Muller, D. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci* **3**, 545-50 (2000).
236. Baker, K.E. & Parker, R. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 293-9 (2004).
237. Bianchi, M.T., Song, L., Zhang, H. & Macdonald, R.L. Two different mechanisms of disinhibition produced by GABAA receptor mutations linked to epilepsy in humans. *J Neurosci* **22**, 5321-7 (2002).
238. Eugene, E. *et al.* GABA(A) receptor gamma 2 subunit mutations linked to human epileptic syndromes differentially affect phasic and tonic inhibition. *J Neurosci* **27**, 14108-16 (2007).
239. Frugier, G. *et al.* A gamma 2(R43Q) mutation, linked to epilepsy in humans, alters GABAA receptor assembly and modifies subunit composition on the cell surface. *J Biol Chem* **282**, 3819-28 (2007).
240. Hales, T.G. *et al.* The epilepsy mutation, gamma2(R43Q) disrupts a highly conserved inter-subunit contact site, perturbing the biogenesis of GABAA receptors. *Mol Cell Neurosci* **29**, 120-7 (2005).
241. Huang, X., Hernandez, C.C., Hu, N. & Macdonald, R.L. Three epilepsy-associated GABRG2 missense mutations at the gamma+/beta- interface disrupt GABA receptor assembly and trafficking by similar mechanisms but to different extents. *Neurobiol Dis* **68C**, 167-179 (2014).
242. Kang, J.Q. & Macdonald, R.L. The GABAA receptor gamma2 subunit R43Q mutation linked to childhood absence epilepsy and febrile seizures causes retention of alpha1beta2gamma2S receptors in the endoplasmic reticulum. *J Neurosci* **24**, 8672-7 (2004).
243. Todd, E., Gurba, K.N., Botzolakis, E.J., Stanic, A.K. & Macdonald, R.L. GABAA receptor biogenesis is impaired by the gamma2 subunit febrile seizure-associated mutation, GABRG2(R177G). *Neurobiol Dis* **69**, 215-24 (2014).
244. Delahanty, R.J. *et al.* Maternal transmission of a rare GABRB3 signal peptide variant is associated with autism. *Mol Psychiatry* **16**, 86-96 (2011).
245. Gurba, K.N., Hernandez, C.C., Hu, N. & Macdonald, R.L. GABRB3 mutation, G32R, associated with childhood absence epilepsy alters alpha1beta3gamma2L gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor expression and channel gating. *J Biol Chem* **287**, 12083-97 (2012).

246. Tanaka, M., DeLorey, T.M., Delgado-Escueta, A. & Olsen, R.W. GABRB3, Epilepsy, and Neurodevelopment. in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (eds. Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W. & Delgado-Escueta, A.V.) (Bethesda (MD), 2012).
247. Kwan, P. & Brodie, M.J. Neuropsychological effects of epilepsy and antiepileptic drugs. *Lancet* **357**, 216-22 (2001).
248. Swinkels, W.A., Kuyk, J., van Dyck, R. & Spinhoven, P. Psychiatric comorbidity in epilepsy. *Epilepsy Behav* **7**, 37-50 (2005).
249. Forsgren, L. Prevalence of epilepsy in adults in northern Sweden. *Epilepsia* **33**, 450-8 (1992).
250. Trostle, J.A., Hauser, W.A. & Sharbrough, F.W. Psychologic and social adjustment to epilepsy in Rochester, Minnesota. *Neurology* **39**, 633-7 (1989).
251. Kleen, J.K., Scott, R.C., Lenck-Santini, P.P. & Holmes, G.L. Cognitive and Behavioral Co-Morbidities of Epilepsy. in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (eds. Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W. & Delgado-Escueta, A.V.) (Bethesda (MD), 2012).
252. Wellcome Trust Case Control, C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447**, 661-78 (2007).
253. Craddock, N. *et al.* Strong genetic evidence for a selective influence of GABAA receptors on a component of the bipolar disorder phenotype. *Mol Psychiatry* **15**, 146-53 (2010).
254. Kang, J.Q. & Barnes, G. A common susceptibility factor of both autism and epilepsy: functional deficiency of GABA A receptors. *J Autism Dev Disord* **43**, 68-79 (2013).
255. Bird, L.M. Angelman syndrome: review of clinical and molecular aspects. *Appl Clin Genet* **7**, 93-104 (2014).
256. Yoo, H.K., Chung, S., Hong, J.P., Kim, B.N. & Cho, S.C. Microsatellite marker in gamma - aminobutyric acid - a receptor beta 3 subunit gene and autism spectrum disorders in Korean trios. *Yonsei Med J* **50**, 304-6 (2009).
257. Collins, A.L. *et al.* Investigation of autism and GABA receptor subunit genes in multiple ethnic groups. *Neurogenetics* **7**, 167-74 (2006).
258. Buxbaum, J.D. *et al.* Association between a GABRB3 polymorphism and autism. *Mol Psychiatry* **7**, 311-6 (2002).
259. Feusner, J. *et al.* GABA(A) receptor beta 3 subunit gene and psychiatric morbidity in a post-traumatic stress disorder population. *Psychiatry Res* **104**, 109-17 (2001).
260. Wang, K.S., Liu, X.F. & Aragam, N. A genome-wide meta-analysis identifies novel loci associated with schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr Res* **124**, 192-9 (2010).
261. Xuei, X. *et al.* GABRR1 and GABRR2, encoding the GABA-A receptor subunits rho1 and rho2, are associated with alcohol dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **153B**, 418-27 (2010).
262. Laurie, D.J., Wisden, W. & Seeburg, P.H. The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci* **12**, 4151-72 (1992).
263. Piton, A. *et al.* Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* **16**, 867-80 (2011).

264. Piton, A. *et al.* Analysis of the effects of rare variants on splicing identifies alterations in GABAA receptor genes in autism spectrum disorder individuals. *Eur J Hum Genet* **21**, 749-56 (2013).
265. Gunther, U. *et al.* Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeted disruption of the gamma 2 subunit gene of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7749-53 (1995).
266. Ferraro, T.N. *et al.* Mouse strain variation in maximal electroshock seizure threshold. *Brain Res* **936**, 82-6 (2002).
267. Hill, E.L. *et al.* Temperature elevation increases GABA(A) -mediated cortical inhibition in a mouse model of genetic epilepsy. *Epilepsia* **52**, 179-84 (2011).
268. Sur, C. *et al.* Loss of the major GABA(A) receptor subtype in the brain is not lethal in mice. *J Neurosci* **21**, 3409-18 (2001).
269. Goldstein, P.A. *et al.* Prolongation of hippocampal miniature inhibitory postsynaptic currents in mice lacking the GABA(A) receptor alpha1 subunit. *J Neurophysiol* **88**, 3208-17 (2002).
270. Kralic, J.E. *et al.* GABA(A) receptor alpha-1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. *Neuropharmacology* **43**, 685-94 (2002).
271. Ortinski, P.I., Lu, C., Takagaki, K., Fu, Z. & Vicini, S. Expression of distinct alpha subunits of GABAA receptor regulates inhibitory synaptic strength. *J Neurophysiol* **92**, 1718-27 (2004).
272. Ponomarev, I. *et al.* Transcriptional signatures of cellular plasticity in mice lacking the alpha1 subunit of GABAA receptors. *J Neurosci* **26**, 5673-83 (2006).
273. Rudolph, U. & Mohler, H. Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 475-98 (2004).
274. Sonner, J.M. *et al.* Alpha 1 subunit-containing GABA type A receptors in forebrain contribute to the effect of inhaled anesthetics on conditioned fear. *Mol Pharmacol* **68**, 61-8 (2005).
275. Kralic, J.E. *et al.* Genetic essential tremor in gamma-aminobutyric acidA receptor alpha1 subunit knockout mice. *J Clin Invest* **115**, 774-9 (2005).
276. Homanics, G.E. *et al.* Mice devoid of gamma-aminobutyrate type A receptor beta3 subunit have epilepsy, cleft palate, and hypersensitive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4143-8 (1997).
277. DeLorey, T.M. *et al.* Mice lacking the beta3 subunit of the GABAA receptor have the epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome. *J Neurosci* **18**, 8505-14 (1998).
278. Vicini, S. & Ortinski, P. Genetic manipulations of GABAA receptor in mice make inhibition exciting. *Pharmacol Ther* **103**, 109-20 (2004).
279. Culiati, C.T., Stubbs, L.J., Montgomery, C.S., Russell, L.B. & Rinchik, E.M. Phenotypic consequences of deletion of the gamma 3, alpha 5, or beta 3 subunit of the type A gamma-aminobutyric acid receptor in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2815-8 (1994).
280. Boehm, S.L., 2nd *et al.* gamma-Aminobutyric acid A receptor subunit mutant mice: new perspectives on alcohol actions. *Biochem Pharmacol* **68**, 1581-602 (2004).

281. Collinson, N. *et al.* Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. *J Neurosci* **22**, 5572-80 (2002).
282. Jones, A. *et al.* Ligand-gated ion channel subunit partnerships: GABAA receptor alpha6 subunit gene inactivation inhibits delta subunit expression. *J Neurosci* **17**, 1350-62 (1997).
283. Mihalek, R.M. *et al.* Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12905-10 (1999).
284. Choi, Y., Sims, G.E., Murphy, S., Miller, J.R. & Chan, A.P. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One* **7**, e46688 (2012).
285. Tavtigian, S.V., Greenblatt, M.S., Lesueur, F., Byrnes, G.B. & Group, I.U.G.V.W. In silico analysis of missense substitutions using sequence-alignment based methods. *Hum Mutat* **29**, 1327-36 (2008).
286. Chan, P.A. *et al.* Interpreting missense variants: comparing computational methods in human disease genes CDKN2A, MLH1, MSH2, MECP2, and tyrosinase (TYR). *Hum Mutat* **28**, 683-93 (2007).
287. Ng, P.C. & Henikoff, S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* **31**, 3812-4 (2003).
288. Davydov, E.V. *et al.* Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS Comput Biol* **6**, e1001025 (2010).
289. Kang, J.Q., Shen, W. & Macdonald, R.L. Two molecular pathways (NMD and ERAD) contribute to a genetic epilepsy associated with the GABA(A) receptor GABRA1 PTC mutation, 975delC, S326fs328X. *J Neurosci* **29**, 2833-44 (2009).
290. Kirkness, E.F. & Fraser, C.M. A strong promoter element is located between alternative exons of a gene encoding the human gamma-aminobutyric acid-type A receptor beta 3 subunit (GABRB3). *J Biol Chem* **268**, 4420-8 (1993).
291. Feng, H.J. *et al.* Delta subunit susceptibility variants E177A and R220H associated with complex epilepsy alter channel gating and surface expression of alpha4beta2delta GABAA receptors. *J Neurosci* **26**, 1499-506 (2006).
292. Kang, J.Q., Shen, W. & Macdonald, R.L. The GABRG2 mutation, Q351X, associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus, has both loss of function and dominant-negative suppression. *J Neurosci* **29**, 2845-56 (2009).
293. Kang, J.Q., Shen, W. & Macdonald, R.L. Trafficking-deficient mutant GABRG2 subunit amount may modify epilepsy phenotype. *Ann Neurol* **74**, 547-59 (2013).
294. Whiting, P.J., McKernan, R.M. & Wafford, K.A. Structure and pharmacology of vertebrate GABAA receptor subtypes. *Int Rev Neurobiol* **38**, 95-138 (1995).
295. Smart, T.G., Hosie, A.M. & Miller, P.S. Zn²⁺ ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *Neuroscientist* **10**, 432-42 (2004).
296. Migita, K. *et al.* Properties of a novel GABAA receptor gamma2 subunit mutation associated with seizures. *J Pharmacol Sci* **121**, 84-7 (2013).
297. de la Prida, L.M., Huberfeld, G., Cohen, I. & Miles, R. Threshold behavior in the initiation of hippocampal population bursts. *Neuron* **49**, 131-42 (2006).
298. McDonald, J.W. *et al.* Altered excitatory and inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* **29**, 529-41 (1991).

299. Arellano, J.I., Munoz, A., Ballesteros-Yanez, I., Sola, R.G. & DeFelipe, J. Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain* **127**, 45-64 (2004).
300. Vadlamudi, L. *et al.* Genetics of epilepsy: The testimony of twins in the molecular era. *Neurology* **83**, 1042-8 (2014).
301. Kjeldsen, M.J., Corey, L.A., Christensen, K. & Friis, M.L. Epileptic seizures and syndromes in twins: the importance of genetic factors. *Epilepsy Res* **55**, 137-46 (2003).
302. Urak, L., Feucht, M., Fathi, N., Hornik, K. & Fuchs, K. A GABRB3 promoter haplotype associated with childhood absence epilepsy impairs transcriptional activity. *Hum Mol Genet* **15**, 2533-41 (2006).
303. Valente, K.D. *et al.* Epilepsy in patients with angelman syndrome caused by deletion of the chromosome 15q11-13. *Arch Neurol* **63**, 122-8 (2006).
304. Wang, P.J., Hou, J.W., Sue, W.C. & Lee, W.T. Electroclinical characteristics of seizures-comparing Prader--Willi syndrome with Angelman syndrome. *Brain Dev* **27**, 101-7 (2005).
305. Hogart, A., Nagarajan, R.P., Patzel, K.A., Yasui, D.H. & Lasalle, J.M. 15q11-13 GABAA receptor genes are normally biallelically expressed in brain yet are subject to epigenetic dysregulation in autism-spectrum disorders. *Hum Mol Genet* **16**, 691-703 (2007).
306. Sutcliffe, J.S., Nurmi, E.L. & Lombroso, P.J. Genetics of childhood disorders: XLVII. Autism, part 6: duplication and inherited susceptibility of chromosome 15q11-q13 genes in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **42**, 253-6 (2003).
307. Jiang, Y.H. *et al.* Altered ultrasonic vocalization and impaired learning and memory in Angelman syndrome mouse model with a large maternal deletion from Ube3a to Gabrb3. *PLoS One* **5**, e12278 (2010).
308. Mefford, H.C. CNVs in Epilepsy. *Curr Genet Med Rep* **2**, 162-167 (2014).
309. Stankiewicz, P. & Lupski, J.R. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* **18**, 74-82 (2002).
310. Poduri, A. *et al.* Somatic activation of AKT3 causes hemispheric developmental brain malformations. *Neuron* **74**, 41-8 (2012).
311. Riviere, J.B. *et al.* De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet* **44**, 934-40 (2012).
312. Lindhurst, M.J. *et al.* A mosaic activating mutation in AKT1 associated with the Proteus syndrome. *N Engl J Med* **365**, 611-9 (2011).
313. Vadlamudi, L. *et al.* Timing of de novo mutagenesis--a twin study of sodium-channel mutations. *N Engl J Med* **363**, 1335-40 (2010).
314. Poduri, A., Evrony, G.D., Cai, X. & Walsh, C.A. Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. *Science* **341**, 1237758 (2013).
315. de Nijs, L. *et al.* Mutations of EFHC1, linked to juvenile myoclonic epilepsy, disrupt radial and tangential migrations during brain development. *Hum Mol Genet* **21**, 5106-17 (2012).
316. Rossignol, E. *et al.* WONOEP appraisal: New genetic approaches to study epilepsy. *Epilepsia* **55**, 1170-86 (2014).

Annexe I : Curriculum vitæ



Formation académique

Ph.D Sciences biomédicales Université de Montréal	2009-2014
M.Sc Sciences biomédicales Université de Montréal	2008-2009
B.Sc Biologie Université du Québec à Rimouski	2004-2007

Expériences

E1. Stage de recherche en neurodéveloppementale, Laboratoire du Dr. Di Cristo Centre de recherche du CHU Ste-Justine	2012-2013
<ul style="list-style-type: none">• Gestion de projet• Mise sur pied d'une collaboration en le CRCHUM et le CHU Ste-Justine• Collaboration avec Dr. Rudolph du <i>Harvard Medical School - Harvard University</i>• Analyses morphométriques de neurones pyramidales - NeuroLucida	
E2. Stage de formation en électrophysiologie, Laboratoire du Dr. Bowie Département de Pharmacologie & Thérapeutiques de l'Université McGill	2009
<ul style="list-style-type: none">• Enregistrement électrophysiologique - <i>Patch-clamp outside-out</i>	
E3. Perfectionnement professionnel en expérimentation animale Centre de recherche du CHUM	2008
<ul style="list-style-type: none">• Mise au point d'un protocole de culture neuronale• Souris, rat et chirurgie aseptique	
E4. Stage de recherche en neurogénétique, Laboratoire du Dr. Cossette Centre de recherche du CHUM	2007
<ul style="list-style-type: none">• Création de protocoles de séquençage et d'analyse génétique• Utilisation et gestion de banques d'ADN de cohortes de patients	
E5. Échange universitaire en France - Master en gestion intégrée du littoral Università di Corsica Pasquale Paoli - Corse	2006

Bourses, Prix et autres distinctions

Bourse de fin d'études doctorales - Faculté des études supérieures, Université de Montréal	01/2014
Bourse de recherche doctorale (3 ans) - FRQS	07/2011
Bourse d'excellence du programme Sc. Biomédicales - Université de Montréal	12/2009
Bourse de stagiaire de recherche - Fondation Savoy	06/2009
Bourse doctorale de passage accéléré - Faculté des études supérieures, Université de Montréal	02/2009
Bourse de stagiaire de recherche - Fondation Savoy	06/2008
Bourse d'excellence du programme Sc. Biomédicales - Université de Montréal	05/2008
Bourse d'excellence du RMGA - Réseau de Médecine Génétique Appliquée	04/2008
Bourse d'études outre-mer du PBCSE - Ministère de l'Éducation du Québec	09/2006

Réalisations

Coordonnatrice du comité des écoles secondaires francophones, Conférencières - Cerveau en tête
Membre du comité régional Ultimate Laval, Capitaine d'équipe d'Ultimate
Activités de mentorat - Projet SEUR de l'université de Montréal
Membre du comité responsable des conférences de l'Axe neuroscience du CRCHUM



Publications

Articles PubMed

P1. Kahle KT, Merner ND, Friedel P, Silayeva L, Liang B, Khanna A, Shang Y, Lachance-Touchette P et al. Genetically encoded impairment of neuronal KCC2 cotransporter function in human idiopathic generalized epilepsy. *EMBO reports*. 2014;15(7):766-74.

P2. Cadieux-Dion M, Andermann E, Lachance-Touchette P, Ansorge O, Meloche C, Barnabe A, et al. Recurrent mutations in DNAJC5 cause autosomal dominant Kufs disease. *Clinical genetics*. 2013; 83(6):571-5.

P3. Lachance-Touchette P*, Brown P*, Meloche C, Kinirons P, Lapointe L, Lacasse H, Carmant L, Bedford F, Bowie D, Cossette P. Novel $\alpha 1$ and $\gamma 2$ GABAA receptor subunit mutations in families with idiopathic generalized epilepsy. *Eur J Neurosci*. 2011 Jul; 34(2):237-49.

P4. Lachance-Touchette P*, Martin C*, Poulin C, Gravel M, Carmant L, Cossette P. A rare polymorphism in GABRB3 segregating with Childhood Absence Epilepsy and Generalized Spike and Waves in a French-Canadian Family. *Epilepsia* 2010; 51(9):1894-1897.

Chapitre de Livre

C1. Cossette P, Lachance-Touchette P, Rouleau GA. Mutated GABAA receptor subunits in idiopathic generalized epilepsy. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 4th edition, Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.

Articles de conférence

R1. A. Stoica, P. Lachance-Touchette, M. Choudhury, G. Di Cristo, P. Cossette. The Role of Mutated GABA(A) Receptor in the Pathogenesis of Idiopathic Generalized Epilepsy. Abstract No 3.279, Annual Meeting of the American Epilepsy Society, Washington, United States of America, December 2013.

R2. P. Lachance-Touchette, et al. Novel Mutations Found by Resequencing Multiple Subunits of GABAA Receptor in Families with Idiopathic Generalized Epilepsy. 3rd Annual Canadian Human Genetics Conference, St-Sauveur, Canada, Avril 2010.

R3. P. Lachance-Touchette, et al. Novel Mutations Found by Resequencing Multiple Subunits of GABAA Receptor in Families with Idiopathic Generalized Epilepsy. (2056/T/Poster Board 605). 59th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Honolulu, Hawaii, October 2009.

R4. P. Lachance-Touchette, et al. Nouvelles mutations découvertes dans les sous-unités alpha 1 et gamma 2 du récepteur GABAA dans des familles associées à l'épilepsie idiopathique généralisée. 7e édition des Journées Génétiques du Réseau de Médecine Génétique Appliquée, Québec, mai 2008.

R5. P. Lachance-Touchette, et al. Novel Mutations Found in Alpha1 and Gamma 2 Subunits of the GABAA Receptor in Families with Idiopathic Generalized Epilepsy. 61th annual meeting of the American Epilepsy Society, Philadelphie, USA, December 2007.

Présentations orales National/International

O1. Lachance Touchette P. Novel mutations found by resequencing multiple subunits of GABAA receptor in families with idiopathic generalized epilepsy. Dans : retraite du Center for Research in Neuroscience de l'Université McGill, Saint-Gabriel, juin 2009.

O2. Lachance Touchette P. Novel mutations found by resequencing multiple subunits of GABAA receptor in families with idiopathic generalized epilepsy. Dans : retraite du Centre d'excellence en neuromique de l'Université de Montréal, Montebello, janvier 2009.

O3. Lachance Touchette P. Nouvelles mutations découvertes dans les sous-unités alpha 1 et gamma 2 du récepteur GABAA dans des familles associées à l'épilepsie généralisée idiopathique. Dans : 76e congrès de l'Association francophone pour le Savoir, Québec, mai 2008.