

Université de Montréal

**Caractérisation physiologique et génétique des épilepsies  
d'origine focale chez l'humain et dans les modèles animaux**

Par Caroline Martin

Programme de neurosciences  
Département de neurosciences  
Faculté de médecine

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

Décembre 2015

© Caroline Martin, 2015

## Résumé

L'épilepsie est une maladie neurologique chronique qui touche jusqu'à 3 % de la population au moins une fois dans leur vie. Bien que les crises puissent généralement être contrôlées par la prise de médicament, il y a environ 30 % de patients pour qui les traitements pharmacologiques sont inefficaces. Les épilepsies pharmacorésistantes (PR) sont associées à un haut taux de comorbidité et de mortalité, causant des coûts humains et monétaires élevés. La mort subite et inexplicée de l'épilepsie (MSIÉ) est la cause de 50 % des décès chez les patients PR. Le plus haut taux de pharmacorésistance est associé aux épilepsies d'origines focales. L'épilepsie du lobe temporal (ÉLT) est la forme la plus fréquente d'épilepsie d'origine focale, et elle est fréquemment associée à de la sclérose de l'hippocampe, une pathologie caractérisée par de la perte neuronale et de la gliose. Cette forme d'épilepsie était initialement considérée comme une forme d'épilepsie symptomatique acquise, mais nous savons aujourd'hui que la génétique joue un rôle important dans le développement de la maladie. Dans ce contexte, il est essentiel pour la compréhension de ces maladies d'étudier les mécanismes moléculaires menant au développement des épilepsies d'origines focales et au développement des pathologies qui y sont associés. L'objectif général de cette thèse est donc d'évaluer les composantes génétiques des épilepsies focales grâce à deux approches différentes : l'étude de la génétique humaine et l'expérimentation animale.

Grâce à l'avènement des nouvelles technologies de séquençage à haut débit, de nouveaux gènes associés à des syndromes épileptiques d'origine focale ont été identifiés. Dans le premier chapitre de cette thèse, il sera question de l'importance des mutations dans le gène *DEPDC5* dans une cohorte Canadienne-Française d'épilepsie familiale à foyers variables et d'épilepsie d'origine focale. Nous avons découvert qu'une nouvelle mutation, de même qu'une mutation récurrente dans la population Canadienne-Française, explique 5 % de nos cas d'épilepsie focale. Le second chapitre abordera les facteurs génétiques associés à la sclérose de l'hippocampe dans les modèles animaux d'épilepsie du lobe temporal. Nous avons en effet démontré que le gène *Galr1* jouait un rôle essentiel dans la susceptibilité à la mort neuronale chez des souches consanguines de rats. La troisième partie de cette thèse portera quant à elle sur la mort subite et inexplicée de l'épilepsie, une complication courante des épilepsies

focales pharmacorésistantes. Un nouveau modèle de MSIÉ sera présenté. En effet, les rats de la souche consanguine SHR sont susceptibles de mourir subitement suite à une crise d'épilepsie prolongée. Ces résultats suggèrent fortement que le substratum génétique des animaux joue un rôle important dans la susceptibilité à la MSIÉ. Une combinaison entre des problèmes cardiaques et respiratoires serait responsable de ces décès.

Nos résultats permettent ainsi de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les épilepsies d'origine focale. De plus, grâce à l'utilisation d'animaux de souches consanguines, nous avons démontré l'importance des facteurs génétiques dans le développement de la sclérose de l'hippocampe et de la MSIÉ. Ces nouveaux modèles animaux consanguins faciliteront la découverte de gènes impliqués dans la susceptibilité à la mort neuronale dans l'hippocampe de même qu'au risque de décès prématuré chez les épileptiques.

**Mots-clés** : Épilepsie focale, épilepsie du lobe temporal, sclérose de l'hippocampe, génétique, modèles animaux, mort subite et inexplicable de l'épilepsie (MSIÉ)

## Abstract

Epilepsy is a chronic neurological disease affecting approximately 3% of individuals at some time in their life. While seizures can generally be controlled with pharmacological treatments, there are 30% of epileptic patients that are not responding to any medication. These pharmaco-resistant epilepsies are associated with high morbidity and mortality resulting in massive human and societal costs. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) is responsible for up to 50% of death in pharmaco-resistant patients. The highest level of pharmaco-resistance is associated with focal epilepsies. Temporal lobe epilepsy (TLE), the most frequent focal epilepsy, is often associated with hippocampal sclerosis (HS), a pathology characterized by neuronal loss and gliosis. Initially considered as a symptomatic and acquired form of epilepsy, we now know that genetic factors play a major role in the development of TLE and HS. In this context, it is of great interest to study the molecular mechanisms underlying focal epilepsies and their associated pathologies in order to better understand the disease. The main goal of this thesis is to assess the genetic components of these epilepsies using two different approaches: the study of human genetic and experimentation using animal models.

Due to the advances of new sequencing technologies, several new genes have been associated with focal epilepsies. In the first chapter of this thesis, we assess the importance of mutations in the *DEPDC5* gene in our French-Canadian cohort of focal epilepsy and familial focal epilepsy with variable foci. We discovered a new mutation as well as a recurrent mutation explaining 5% of our cases with focal epilepsy. The second chapter focus on genetic factors associated with hippocampal sclerosis in animal models of TLE. We demonstrated that the *Galr1* gene plays an important role in the susceptibility to neuronal death in inbred strains of rats. The third part of this thesis aim at describing a new animal model of SUDEP, which is a common complication of pharmaco-resistant focal epilepsies. Indeed, SHR rats, an inbred strain of rats, dies suddenly following prolonged generalized tonico-clonic seizures. We therefore show that genetic background plays an important role in the susceptibility to SUDEP. We suggest that a combination of cardiac and respiratory abnormalities is responsible for the death of the animal.

Our results allow a better understanding of the molecular mechanisms underlying focal epilepsies. Furthermore, using inbred strains of rats, we demonstrated the importance of genetic factors for the development of prolonged seizure-induced cell death and SUDEP. These new inbred animal models will eventually lead to the findings of new genes associated with the susceptibility to neuronal death as well as the risk of premature death in epileptic patients.

**Keywords:** Focal epilepsy, temporal lobe epilepsy, hippocampal sclerosis, genetic, animal models, SUDEP

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles.....	x
Remerciements.....	xiii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Présentation clinique.....	2
1.2 Épilepsie génétique chez l'humain.....	3
1.3 Les épilepsies focales.....	9
1.3.1 Terminologies et concepts.....	9
1.3.2 Épilepsie du lobe temporal.....	9
1.3.3 Pathologie associée : sclérose de l'hippocampe.....	10
1.3.4 Épileptogénèse.....	13
1.4 Modèles animaux de l'épilepsie du lobe temporal.....	17
1.4.1 Utilisation des modèles animaux : rôle et importance.....	17
1.4.2 Modèle «kindling».....	20
1.4.3 Modèle post- <i>status epilepticus</i> (SE).....	22
1.4.4 Hétérogénéité génétique dans les modèles animaux d'épilepsie du lobe temporal.....	25
1.5 Mort subite inattendue et inexplicée en épilepsie (MSIÉ).....	28
1.5.1 Définition et facteurs de risques.....	28
1.5.2 Physiopathologie.....	29
1.5.3 Modèles animaux de MSIÉ- souris DBA/1 et DBA/2.....	32
1.5.4 Implication de la sérotonine dans la MSIÉ.....	33
1.6 Objectifs et plan expérimental.....	34

1.6.1 Approche humaine.....	34
1.6.2 Approche animale.....	35
Chapitre 2 : Reséquencage de DEPDC5 dans la population Canadienne-Française avec épilepsies focales.....	37
2.1 Présentation de l'article.....	37
2.2 Contribution des auteurs.....	37
2.3 A recurrent mutation in DEPDC5 predisposes to focal epilepsies in the French-Canadian population.....	38
2.3.1 Abstract.....	38
2.3.2 Introduction.....	39
2.3.3 Materials and Methods.....	40
2.3.4 Results.....	41
2.3.5 Discussion.....	42
2.3.7 Tableaux et figures.....	45
Chapitre 3 : Description d'un nouveau modèle animal de sensibilité à la mort neuronale suite à un <i>status epilepticus</i> .....	50
3.1 Présentation de l'article.....	50
3.2 Contribution des auteurs.....	51
3.3 <i>Galr1</i> expression level determines differential susceptibility to status epilepticus-induced cell death in Dahl and Lewis rat strains.....	52
3.3.1 Abstract.....	52
3.3.2 Introduction.....	53
3.3.4 Materials and methods.....	55
3.3.5 Results.....	61
3.3.6 Discussion.....	65
3.3.7 Tables and figures.....	70
Chapitre 4. Caractérisation d'un nouveau modèle animal de mort subite et inexplicée de l'épilepsie (MSIÉ).....	78
4.1 Présentation du chapitre.....	78
4.2 Liste et contributions des collaborateurs.....	78

4.3 Contexte et rationnels .....	79
4.4 Hypothèse et objectifs.....	81
4.5 Méthodes.....	82
4.6 Résultats préliminaires.....	86
4.7 Discussion et perspectives .....	88
Chapitre 5 : Discussion et perspectives .....	95
5.1 Retour sur les travaux .....	95
5.2.1 Importance de <i>DEPDC5</i> dans les épilepsies d’origines focales .....	95
5.2.2 <i>Galr1</i> comme gène de susceptibilité à l’excitotoxicité dans un modèle animal d’ÉLTm.....	102
5.2.3 Mort subite et inexplicée en épilepsie chez les rats SHR : description d’un nouveau modèle génétique.....	107
5.2 Conclusion .....	111
Références.....	113
Annexe 1: Screening of GABRB3 in French-Canadian families with idiopathic generalized epilepsy .....	i



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.2.1.</b> Liste des principaux gènes de prédisposition aux épilepsies génétiques chez l'humain. ....	7
<b>Tableau 2.3.7.1</b> Table 1. Clinical manifestations of <i>DEPDC5</i> mutation positive affected individuals.....	45
<b>Tableau 3.3.7.1</b> Table 1. Strain survey for sensitivity to SE following KA injections. ....	70

## Liste des figures

<b>Figure 1.4.1.1.</b> Schéma résumé des modèles animaux en épilepsie.....	19
<b>Figure 2.3.7.2</b> Figure 1. Pedigree of the families.....	46
<b>Figure 2.3.7.3</b> Figure 2. DEPDC5 mutations.....	47
<b>Figure 2.3.7.3</b> eFigure 1. Pedigree of family 1.....	48
<b>Figure 2.3.7.4</b> eFigure 2. Pedigrees of family 2 and 3.....	49
<b>Figure 3.3.7.2</b> Figure 1. Different sensitivity to SE induced cell-death. ....	71
<b>Figure 3.3.7.3</b> Figure 2. Percentage of rats exhibiting severe neuronal cell death.....	72
<b>Figure 3.3.7.4</b> Figure 3. Representative EEG recording.....	73
<b>Figure 3.3.7.5</b> Figure 4. Analysis of recurrent seizures in both Lewis and Dahl rats during the day and night.....	74
<b>Figure 3.3.7.6</b> Figure 5. Results from the continuous intra hippocampal stimulation.....	75
<b>Figure 3.3.7.7</b> Figure 6. Position of the Ch.18b5 segment that contains Galr1 and that is responsible for the protection against SE-induced cell death. ....	76
<b>Figure 3.3.7.8</b> Figure 7. Galr1 expression pattern in hippocampal tissues from Dahl, Lewis and Dahl/lew.Chr18b5.....	77
<b>Figure 4.6.2</b> Figure 2. Histologie du cœur des rats SHR après le décès.....	92
<b>Figure 4.6.3.</b> Figure 3. Pression sanguine et rythme cardiaque de base chez les rats SHR et Dahl.....	93
<b>Figure 4.6.4.</b> Figure 4. Données télémétriques des 20 dernières minutes du SE avant la mort subite ou l'euthanasie.....	94
<b>Figure 5.2.1.1.1</b> Implication de DEPDC5 dans la voie de signalisation mTORC1.....	98

## Liste des sigles

AE : absence épileptique

AEE : absence épileptique de l'enfance

AK : acide kaïnique

AVC : accident vasculaire cardiaque

CF : convulsions fébriles

CIHES : continuous intra-hippocampal electrical stimulation

CNFB : convulsions néonatales familiales bénignes

CNV : copy number variation

DCF : dysplasie corticale focale

EADAA : épilepsie autosomique dominante avec aura auditive

EADCFN : Épilepsie autosomique dominante à crise frontale nocturne

ECG : Électrocardiogramme

EE: encéphalopathie épileptique

EEG : Électroencéphalogramme

EEIP : encéphalopathie épileptique infantile précoce

EF : épilepsie d'origine focale

EFFFV : Épilepsie focale familiale à foyers variables

EFNAD : Épilepsie frontale nocturne autosomique dominante

EGG : épilepsie génétique généralisée

EJM : épilepsie juvénile myoclonique

EMI : encéphalopathie myoclonique infantile

ÉLT : Épilepsie du lobe temporal

ÉLTm : Épilepsie du lobe temporal mésial

EPIB: épilepsie partielle infantile bénigne

GAERS: Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg

GEFS+: Generalized epilepsy with febrile seizure plus

GEPR: genetically epilepsy-prone rat

HS : hippocampal sclerosis

ILAE : Ligue internationale against epilepsy  
ISRS: inhibiteur sélectif de recapture de sérotonine  
KO : knock-out  
MI : microcéphalie  
MSIÉ : Mort subite et inexplicée en épilepsie  
ISRS : inhibiteur sélectif de la recapture de sérotonine  
MES : maximal electroshock seizures  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
PMSE : polyhydramnios, megalencephaly and symptomatic epilepsy  
PR : pharmaco-résistant  
PTV : Potentiel tardif ventriculaire  
PTZ : pentylenetetrazol  
QTL : quantitative trait locus  
SD: syndrome de Dravet  
SE : status epilepticus  
SÉIHC : Stimulation électrique intra hippocampique continue  
SH : sclérose de l'hippocampe  
SLK : syndrome Landau-Keffner  
SO : syndrome Othahara  
SQTL : syndrome du QT long  
SUDEP : sudden unexpected death in epilepsy  
SW: syndrome de West  
TC : tonico-clonique  
TLE : temporal lobe epilepsy  
TSC: sclérose tubéreuse  
WAR : Wistar audiogenic rat

*À ma maman,*

*pour ton amour, ton soutien, tes sacrifices... ta patience*

## Remerciements

Bien que l'écriture d'une thèse soit un exercice plutôt solitaire, elle nous rappelle à chaque instant que plusieurs personnes y ont contribué, de près ou de loin, et que sans eux, un tel travail n'aurait sans doute jamais abouti.

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Patrick Cossette. Merci de m'avoir fait confiance depuis le début, et merci d'avoir si bien su me la redonner lorsque, trop souvent, je doutais de moi. C'est grâce à cela que tout au long de ce doctorat, j'ai pu développer une grande autonomie qui me suivra, et m'aidera dans ma carrière future.

Je ne peux passer sous silence le groupe d'individus qui a été le plus important pour moi durant ces longues années passées au laboratoire : les consanguins! Max, Caro Me et Pam, vous avez été bien plus que des collègues. Vous avez été mon point d'ancrage, et j'espère que cette amitié se poursuivra encore longtemps.

Je tiens également à souligner l'aide, le support et le travail de nombreux collègues. Merci Simon, Marilyse, Sonia, Sylvia et Ana pour tout. Simon, sans tes talents d'informaticien, je serais sûrement encore en train de pleurer, convaincue que j'ai perdu ma thèse...

Un merci spécial aussi aux membres de mon comité de parrainage : Nathalie Arbour et Dr Lionel Carmant. Merci pour vos conseils, votre support et vos encouragements.

Pour terminer, j'aimerais remercier ma famille. Maman, Rock, merci pour tous les sacrifices que vous avez faits pour que je puisse poursuivre mes «trop longues» études. Je vous aime.

Merci aussi à mon papa Jean-Charles et à mon frère Frédéric, que je considère comme mon meilleur ami. Merci aussi à Virginie, Anik, Janis, Gabrielle et Evelyne qui ont toujours été là pour moi. Un merci spécial à Alex qui m'a aidé et supporté durant les derniers milles de cette thèse. Une chance que je vous ai vous autres!

Sincèrement,

*Caroline*

# Chapitre 1 : Introduction

L'épilepsie est une des maladies neurologiques les plus fréquentes. Elle touche jusqu'à 3 % de la population à un moment ou l'autre de leur vie. Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OSM), c'est environ 50 millions de personnes qui en seraient atteintes dans le monde<sup>1</sup>. Au Canada, c'est plus de 300 000 personnes qui en souffriraient<sup>2</sup>. Bien que près de 70 % des épileptiques sont contrôlés par la prise de médicaments anticonvulsifs, il reste une proportion non négligeable de patients pour qui les traitements usuels ne sont pas efficaces<sup>3,4</sup>. Les crises d'origines focales sont celles qui sont les plus difficiles à contrôler<sup>5</sup>. Ces épilepsies pharmacorésistantes sont associées à des coûts monétaires élevés. En effet, 85 % des coûts médicaux engendrés par les patients épileptiques proviennent des patients pharmacorésistants<sup>3,6,7</sup>. Au-delà de ce fardeau monétaire, il y a bien entendu le coût humain. En effet, il est important de noter que la mort subite inexplicée de l'épilepsie est la cause de 15 % des décès chez les patients épileptiques, et que chez les patients qui sont justement pharmacorésistants, cette proportion augmente à 50 %<sup>8,9</sup>. L'épilepsie représente donc un lourd fardeau autant économique que social<sup>10,11</sup>.

Dans ce contexte, il est indispensable d'étudier les mécanismes moléculaires menant au développement des épilepsies d'origines focales afin de comprendre la maladie. Dans cette thèse, il sera donc question d'épilepsies d'origines focales, avec une emphase sur l'épilepsie du lobe temporal, de même que sur les mécanismes responsables de la mort subite et inexplicée de l'épilepsie.



## 1.1 Présentation clinique

La ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE) définit l'épilepsie comme une maladie caractérisée par une prédisposition soutenue à souffrir de crises épileptiques<sup>12</sup>. Depuis 2005, pour être considéré épileptique, un patient doit rencontrer l'un des trois critères suivants :

- 1) avoir souffert d'au moins deux crises non provoquées espacées de plus de 24 heures,
- 2) avoir présenté une crise non provoquée et que la probabilité de souffrir d'une deuxième crise soit considérée aussi élevée qu'après deux crises, basée sur différents critères cliniques et électroencéphalographiques;
- 3) présenter les critères cliniques et électroencéphalographiques pour un syndrome épileptique spécifique<sup>12</sup>.

L'épilepsie n'est pas une condition unique, mais bien un groupe hétérogène de syndromes dont le point commun est la propension à souffrir de crises d'épilepsie. Une crise épileptique est quant à elle définie comme un état transitoire de décharges électriques excessives dans le cerveau (ILAE 2005). Ces décharges sont la conséquence d'un déséquilibre entre l'excitation et l'inhibition neuronale. Les manifestations cliniques de ces crises varient grandement puisque ces dernières peuvent débuter dans différentes parties du cerveau. L'intensité des décharges et le patron de propagation de l'activité électrique détermineront les manifestations cliniques et électroencéphalographiques. Les crises qui n'affectent qu'un ensemble de neurones dans un hémisphère sont dites partielles (ou focales). Ces crises peuvent être, ou non, accompagnées de perte de consciences. Lorsque la crise affecte simultanément les deux

hémisphères cérébraux, la crise est dite généralisée et celle-ci est toujours accompagnée de perte de conscience.

En somme, il faut savoir que l'épilepsie est une maladie caractérisée par une grande hétérogénéité de syndromes. Pour pouvoir développer des traitements efficaces, il est primordial de bien comprendre les mécanismes pathogéniques derrière ces différentes formes d'épilepsie, et plus particulièrement les épilepsies d'origines focales chez qui le taux de pharmacorésistance est le plus élevé. À cette fin, la découverte de gènes prédisposant à ces pathologies est une stratégie qui est robuste. Il sera donc, dans la section suivante, question des principaux facteurs génétiques pouvant mener au développement de ces épilepsies.

## **1.2 Épilepsie génétique chez l'humain**

Le rôle de la génétique dans l'épilepsie n'est plus à prouver. Grâce à de nombreuses études épidémiologiques sur des jumeaux de même que sur de grandes familles d'épileptiques, nous savons maintenant que le risque est de deux à quatre fois supérieur d'être atteint si un membre de la famille, au premier degré, est également épileptique<sup>13-20</sup>. Les épilepsies génétiques peuvent être regroupées en trois grands groupes, soit les épilepsies généralisées génétiques, les encéphalopathies épileptiques et les épilepsies d'origines focales. Depuis une vingtaine d'années, il y a eu de grandes avancées dans la découverte de gènes d'épilepsie mendélienne (Tableau 1.2.1). Dans les années 90, ce sont les études de liaison et de cartographie génique, appliquées à de grandes familles d'épileptiques, qui ont permis la découverte de plusieurs gènes d'épilepsie. C'est en 1995 que le premier gène est découvert. En effet, en 1994 la

première forme familiale d'épilepsie focale est décrite<sup>21</sup>, et l'année suivante, un premier gène, codant pour la sous-unité alpha 4 du récepteur acétylcholinergique nicotinique (*CHRNA4*), est associé à cette forme d'épilepsie focale : l'épilepsie frontale nocturne autosomique dominante (EFNAD)<sup>22</sup>. Par la suite, d'autres mutations dans différents récepteurs acétylcholinergiques nicotiniques sont découvertes chez des familles EFNAD, permettant d'expliquer près de 20 % de ces cas familiaux<sup>23-28</sup>. Peu de temps après, un locus sur le chromosome 20 est associé à des cas familiaux de convulsions néonatales bénignes et en 1998, des mutations dans le gène *KCNQ2* sont rapportées<sup>29,30</sup>. La même approche méthodologique permet notamment, en 2002, la découverte d'un gène majeur d'épilepsie génétique généralisée : la sous-unité  $\alpha 1$  du récepteur à l'acide gamma-aminobutyrique (*GABRA1*)<sup>31</sup>. Les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont des canaux chloriques impliqués dans l'inhibition neuronale. De nombreuses mutations dans les sous-unités  $\gamma 2$  (*GABRG2*)<sup>32-35</sup>,  $\delta$  (*GABRD*)<sup>36</sup> et  $\beta 3$  (*GABRB3*)<sup>37-39</sup> (voir annexe 1) de ce récepteur sont par la suite découvertes. De la même façon, des mutations dans les canaux sodiques et potassiques voltages-dépendant ont été identifiées comme étant responsables de différentes formes familiales d'épilepsies généralisées avec ou sans convulsions fébriles<sup>29,30,40-43</sup>.

Les études de variations structurales, telles que les insertions, délétions et duplications, ont également facilité la découverte des facteurs génétiques impliqués dans les différentes formes d'épilepsie. Cette méthodologie a été particulièrement utile pour l'identification des mutations dans ces cas où des symptômes d'autisme et/ou de déficience intellectuelle sont associés à l'épilepsie, une condition que l'on appelle encéphalopathie épileptique<sup>44-46</sup>. Des cas pathogéniques de variabilité dans le nombre de copies de gènes seraient notamment

responsables de près de 5 % des cas d'encéphalopathie épileptique <sup>46,47</sup>. Des mutations dans les gènes compris dans ces variations structurelles ont par la suite également été identifiées. C'est le cas par exemple des gènes *CHD2*, *SLC6A1* et *PURA*.

Une nouvelle vague de découverte de gènes de prédisposition à l'épilepsie est venue avec l'arrivée des nouvelles technologies de séquençage à haut débit. Un exemple important de l'impact de ces nouvelles technologies est la découverte de mutations dans le gène *DEPDC5* suite au séquençage de l'exome de patients atteints d'épilepsie familiale focale à foyers variables (EFFFV) et d'épilepsies focales <sup>48,49</sup>. Notre laboratoire avait par ailleurs participé à l'identification de ce gène. Ce dernier a par la suite été impliqué dans d'autres phénotypes épileptiques tels que l'épilepsie focale nocturne autosomique dominante <sup>50</sup> et l'épilepsie focale de l'enfance <sup>51</sup>. Dans le chapitre 2 de cette thèse, nous avons vérifié l'importance de ce gène dans une cohorte Canadienne-Française d'EFFFV et d'épilepsie focale, et nous avons trouvé, en plus d'une mutation récurrente, une nouvelle mutation chez des patients atteints d'épilepsie d'origine focale qui expliquent 5 % de nos cas avec épilepsie focale.

Bien que la découverte de ces formes monogéniques d'épilepsie ait permis d'enrichir notre compréhension de la maladie de même que de développer de nouveaux médicaments, il est important de mentionner que les formes familiales d'épilepsie sont rares dans la population. Un même syndrome épileptique peut être dû à des mutations dans différents gènes, comme c'est le cas pour l'épilepsie généralisée avec convulsion fébrile plus., et des mutations différentes dans un même gène peuvent également donner des syndromes épileptiques différents (ex. *DEPDC5*). Une base génétique et une hérédité complexes, de même qu'une

interaction entre l'environnement et des gènes de prédisposition, seraient à l'origine de la majorité des épilepsies. Les nouvelles technologies de séquençage permettront vraisemblablement de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de ces épilepsies avec transmission génétique complexe. Une approche expérimentale complémentaire consiste en l'étude des modèles animaux pour la maladie, qui sera décrite dans les chapitres 3 et 4 de cette thèse.

**Tableau 1.2.1.** Liste des principaux gènes de prédisposition aux épilepsies génétiques chez l'humain.

Gènes	Phénotypes épileptiques	Références
<b>Encéphalopathies épileptiques</b>		
<i>GABRB3</i>	EEIP, SLK	52,53
<i>CDKL5</i>	EE, SLK	54–57
<i>CHD2</i>	EEIP, EE, SLK	53,58–61
<i>GRIN2A</i>	EE, SLK	62–64
<i>KCNA2</i>	EE	65,66
<i>KCNQ2</i>	SO, EE, EEIP	67–70
<i>PCDH19</i>	SD	71–75
<i>PURA</i>	EEIP	76,77
<i>SCL25A22</i>	SO, EMI	78–80
<i>SCL35A2</i>	EEIP	81,82
<i>SCN1A</i>	SD	83–85
<i>SCN2A</i>	SO, SD, EE	86–89
<i>SCN8A</i>	EE, EEIP	90,91
<i>STXBP1</i>	SW, SO, SD	92–95
<i>SYNGAP1</i>	EE	61
<i>TBC1D24</i>	EEIP, EE, SLK	96–98
<i>WWOX</i>	EEIP, MC	99,100
<b>Épilepsies généralisées génétiques</b>		
<i>CACNA1A</i>	AE	101,102
<i>CACNA1H</i>	AEE	103–105
<i>CACNB4</i>	EJM, EGG	106–108
<i>CLCN2</i>	EGG	109–112
<i>EFHC1</i>	EJM	113–115
<i>GABRA1</i>	EJM, AEE, CF	31,33,116–118
<i>GABRB3</i>	AEE avec CF	37,119,120
<i>GABRD</i>	GEFS+	36
<i>GABRG2</i>	GEFS+, AEE avec CF	32–35,121
<i>KCNQ2</i>	CNFB	29,30
<i>SCN1A</i>	GEFS+	40–43
<i>SLC2A1</i>	AEE	122,123

---

## Épilepsies focales

---

<i>CHRNA2</i>	EFNAD	23,24,26,28
<i>CHRNA4</i>	EFNAD	22,124-128
<i>CHRNA2</i>	EFNAD	24,26,28,129
<i>CLCN6</i>	EPIB, CF	130
<i>DEPDC5</i>	EEFFV, EF, EFNAD	48-51,131
<i>GAL</i>	ÉLT	132
<i>GRIN2A</i>	EF	133
<i>KCNT1</i>	EADCFN	25
<i>LGII</i>	ÉLT, EADAA	134-137
<i>MTOR</i>	EF, DCF	138,139
<i>PRRT2</i>	EPIB	140-142
<i>SCN2A</i>	EPIB	143

---

**Abréviations** : AE, absence épileptique; AEE, absence épileptique de l'enfance; ADAA, épilepsie autosomique dominante avec aura auditive; CF, convulsion fébrile; CNFB, convulsions néonatales familiales bénignes; DCF, dysplasie corticale focale; EFNAD, épilepsie frontale nocturne autosomique dominante; EE, encéphalopathie épileptique; EEIP, encéphalopathie épileptique infantile précoce; EF, épilepsie focale; EEFFV, épilepsie focale familiale à foyers variables; EGG, épilepsie génétique généralisée; EJM, épilepsie juvénile myoclonique; ÉLT, épilepsie du lobe temporal; EMI, encéphalopathie myoclonique infantile; EPIB, épilepsie partielle infantile bénigne; GEFS+, épilepsie généralisée avec convulsions fébriles plus; MC, microcéphalie; SD, syndrome de Dravet; SLK, syndrome Landau-Kleffner; SO, syndrome Ohtahara; SW, syndrome de West.

## **1.3 Les épilepsies focales**

### **1.3.1 Terminologies et concepts**

Tel qu'il a été mentionné un peu plus haut, les épilepsies étaient initialement séparées en deux grands groupes : les épilepsies focales (ou partielles) et les épilepsies généralisées <sup>144,145</sup>. Les épilepsies focales regroupent les épilepsies dont les crises prennent origine dans un foyer restreint à un seul hémisphère tandis que les celles qui sont généralisées sont caractérisées par des crises dont les décharges paroxystiques affectent simultanément les deux hémisphères. Depuis 2010, l'ILAE recommande de ne plus utiliser ces termes pour classer les formes d'épilepsies puisque certaines peuvent présenter les deux types de crises, ne permettant pas une dichotomie claire <sup>146</sup>. Toutefois, les termes « focale » et « généralisée » peuvent être utilisés pour décrire la crise épileptique en soit. Il est ainsi plus approprié de parler d'épilepsie dont l'origine des crises est focale. Une des épilepsies d'origine focale les plus fréquentes est l'épilepsie du lobe temporal <sup>147</sup>. Dans les prochaines sections, il sera question de cette forme d'épilepsie, de même que de ses pathologies associées.

### **1.3.2 Épilepsie du lobe temporal**

L'épilepsie du lobe temporal, reconnue depuis 1989 par l'ILAE <sup>144</sup>, regroupe des désordres épileptiques dont les crises surviennent dans le lobe temporal. Ce dernier étant la région la plus épileptogène du cerveau, il n'est pas surprenant que l'épilepsie du lobe temporelle soit la forme la plus commune d'épilepsie d'origine focale. Il est important de noter que 60-75% des patients pharmacorésistants qui sont référés pour une chirurgie de l'épilepsie souffrent d'épilepsie du lobe temporal <sup>148-152</sup>. En effet, il s'agit du syndrome épileptique où l'on



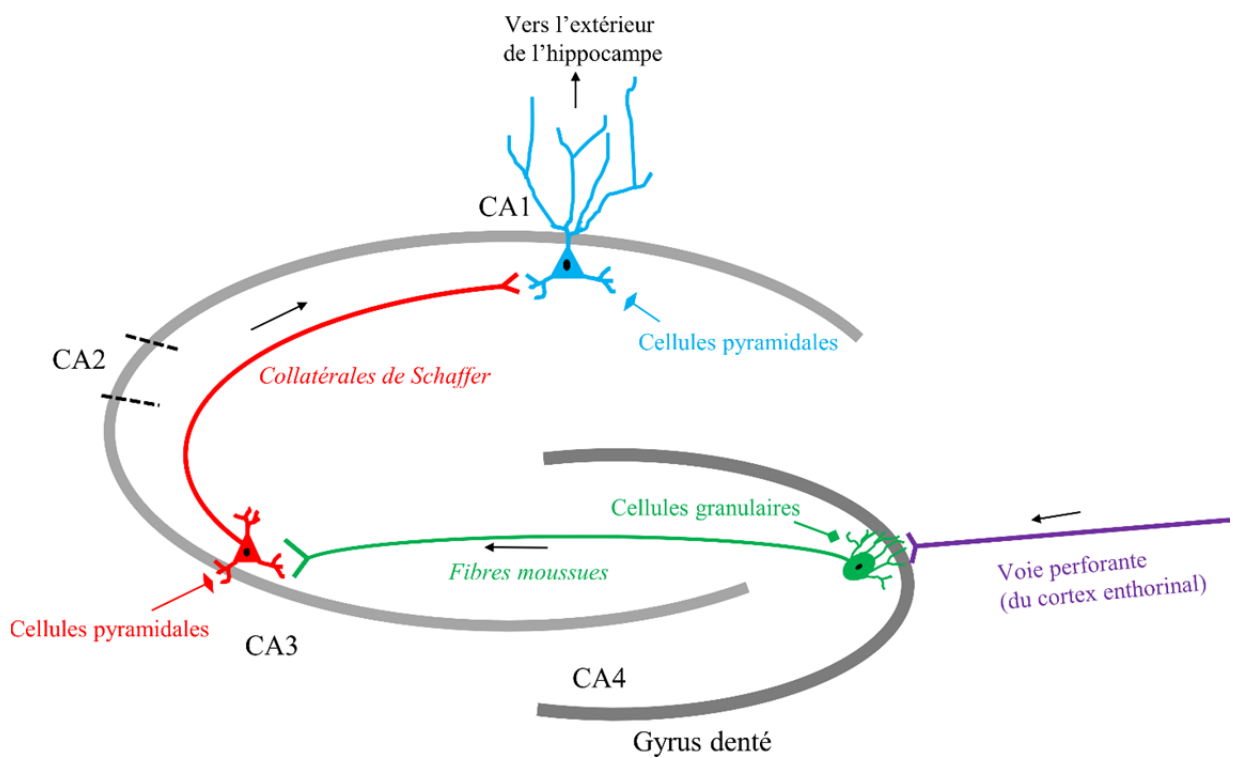
retrouve plus haut taux de pharmacorésistance <sup>153</sup>. Pour ce qui est des crises épileptiques qui en résultent, elles impliquent des régions du lobe temporal telles que l'hippocampe, l'amygdale, et les régions temporaux-latérales du cerveau <sup>144,154</sup>. L'ÉLT est caractérisée par des crises partielles, simples ou complexes, et qui peuvent se généraliser. Les différentes formes d'épilepsie du lobe temporal sont classées selon leur étiologie. L'épilepsie peut donc être d'origine structuro-métabolique, génétique ou de cause inconnue (idiopathique) <sup>155</sup>. Il est important de noter que des lésions ou des troubles métaboliques peuvent également être d'origine génétique <sup>156</sup>. Lorsque l'épilepsie est due à une lésion cérébrale, le syndrome est dit symptomatique <sup>144</sup>. L'épilepsie du lobe temporal mésial (ÉLTm) est la forme d'épilepsie symptomatique la plus courante. La lésion associée à cette forme d'épilepsie est principalement la sclérose de l'hippocampe, mais il peut parfois y avoir une deuxième lésion (double pathologie) telle qu'une dysplasie corticale, un angiome caverneux, une tumeur ou une hétérotopie du lobe temporal <sup>157,158</sup>. En 2010, l'ILAE reconnaît l'ÉLTm avec sclérose de l'hippocampe (SH) comme un syndrome à part entière <sup>146</sup>. Il s'agit également de la forme la plus commune d'épilepsie du lobe temporal <sup>159</sup>.

### **1.3.3 Pathologie associée : sclérose de l'hippocampe**

La sclérose de l'hippocampe est la pathologie la plus fréquente chez les patients atteints d'ÉLT qui sont référés pour des chirurgies de l'épilepsie. On parle alors d'épilepsie du lobe temporal mésial (ÉLTm). Cette pathologie a été décrite pour la première fois en 1825 <sup>160</sup>. Il a toutefois fallu attendre jusqu'en 1935 pour qu'un lien clair entre la sclérose de l'hippocampe et l'épilepsie soit établi (voir review <sup>161</sup>). L'hippocampe, situé dans le système limbique, est composé de trois unités principales, soit le gyrus dentelé, la corne d'Ammon et le subiculum

<sup>162</sup>. La corne d'Ammon est quant à elle divisée en quatre sections distinctes : CA1 au CA4. L'hippocampe est décrit comme ayant un circuit trisynaptique. En premier lieu, les axones provenant du cortex entorhinal entrent en contact avec les cellules granulaires du gyrus denté. On parle ici de la voie perforante. Ensuite, les neurones du gyrus denté vont projeter leurs axones, les fibres moussues, vers les régions CA3 et CA4 où il y aura synapse avec les cellules pyramidales. Les axones de ces cellules pyramidales, que l'on appelle les collatérales de Schaffer, vont projeter vers d'autres cellules pyramidales dans la région CA1. Finalement, ces dernières vont projeter en dehors de l'hippocampe, soit vers le cortex entorhinal, ou indirectement par le subiculum. (Figure 1.3.3.1).

**Figure 1.3.3.1.** Schéma simplifié de l'hippocampe et de la boucle trisynaptique.



La sclérose de l'hippocampe est une lésion caractérisée par une mort neuronale importante ainsi que la présence de gliose. Le CA1 est la région qui est généralement la plus affectée, suivis par le CA3 et le CA4 où la perte neuronale est intermédiaire, et finalement le CA2 qui est la région la plus épargnée par la sclérose <sup>163</sup>. Des patrons différents de perte neuronale peuvent toutefois être observés. Lors de la commission de l'ILAE en 2013, un nouveau système de classification des scléroses de l'hippocampe dans l'ÉLTm a été proposé <sup>164</sup>. Les quatre grandes classes de sclérose de l'hippocampe dans l'ÉLT proposées par l'ILAE sont les suivantes :

- 1- SH ILAE type 1 : Cette classe regroupe le patron de mort neuronale classique ou totale. Il se retrouve dans plus de 60 % des cas de chirurgies de l'épilepsie. Elle est caractérisée par de la mort neuronale sévère dans le CA1 et intermédiaire à sévère dans le CA2, 3 et 4. Les cellules granuleuses du gyrus denté peuvent également être affectées, mais ce, dans des proportions variables. Cette classe inclut également les SH dites totales, où la mort neuronale sévère affecte l'ensemble des régions de l'hippocampe.
- 2- SH ILAE type 2 : Ce type de sclérose hippocampique affecte entre 5 et 10 % des patients qui doivent subir une chirurgie. Il est caractérisé par de la mort neuronale sévère dans l'ensemble du CA1, les autres sections ne montrant qu'une mort neuronale légère (moins de 25 %). De l'astrogliose peut être observée, mais elle n'est pas obligatoire pour faire partie de ce groupe.

- 3- SH ILAE type 3 : Ce type de SH est le moins fréquent, avec une incidence d'environ 5 % chez les patients souffrant d'ÉLTm et qui subissent une chirurgie. Il est caractérisé par de la mort neuronale dans la région CA4 et dans le gyrus denté. Les autres régions étant beaucoup moins affectées.
- 4- Gliose sans SH : Ce dernier type de pathologie a une incidence d'environ 20 % des cas d'ÉLTm. Contrairement aux trois autres classes, il n'y a que peu ou pas de mort neuronale (<10 %). Toutefois, de la gliose est présente dans le foyer épileptique.

Avec les avancées technologiques dans les domaines d'imagerie et d'histologie, le diagnostic de sclérose de l'hippocampe est de plus en plus facile à faire. Par contre, l'étiologie de la cette dernière demeure quant à elle encore controversée. Il y a un débat dans la communauté scientifique et médicale à savoir si cette sclérose est la cause ou plutôt un effet des crises épileptiques. Pour répondre à cette question, il importe de revoir le processus d'épileptogénèse, soit le développement du cerveau sain, en cerveau épileptique.

### **1.3.4 Épileptogénèse**

Tel que mentionné précédemment, les épilepsies peuvent être divisées en trois catégories selon leur étiologie. L'épilepsie peut être génétique, idiopathique ou structuro-métabolique. Cette dernière catégorie comprend les épilepsies dites symptomatiques ou probablement symptomatiques<sup>145</sup>. Elles se réfèrent au fait qu'une lésion, responsable du déclenchement des crises, est visible dans le cerveau du patient. Dans certains cas, les techniques d'imagerie ne permettent pas de voir la lésion, mais elle est fortement soupçonnée, d'où le terme

«probablement symptomatique»<sup>145,165</sup>. La lésion peut elle-même avoir plusieurs origines. Elle peut être causée par une insulte initiale comme un traumatisme crânien, un accident vasculaire cérébral (AVC), une infection, un *status epilepticus*, etc., mais elle peut également être d'origine génétique ou développementale<sup>166</sup>. L'épileptogénèse est un procédé qui est principalement associé à ces épilepsies dites symptomatiques<sup>145</sup>.

L'épileptogénèse est défini comme le processus moléculaire dynamique, qui mènera un cerveau sain à développer des crises épileptiques spontanées<sup>157</sup>. C'est la période, entre l'insulte initiale et l'apparition de crises épileptiques récurrentes, où il y aura des changements moléculaires et structurels dans le cerveau. Les épilepsies symptomatiques se développent généralement en trois phases. Il y a d'abord l'insulte initiale (traumatisme crânien, convulsions fébriles, infection, etc.). Il s'agit de l'élément déclencheur du processus d'épileptogénèse. Par la suite, il y a une période de latence où aucune crise n'est observée. Cette période, où se produisent divers changements dans le cerveau, va mener à la maturation du foyer épileptique et à l'apparition de l'épilepsie caractérisée par des crises spontanées et récurrentes. On parlera alors de la phase chronique de l'épilepsie symptomatique. Les études ont toutefois démontré que les changements moléculaires et cellulaires se poursuivaient même après le début des crises récurrentes. Certains auteurs parleront d'épileptogénèse secondaire<sup>167</sup>, alors que d'autres proposeront plutôt d'étendre le principe d'épileptogénèse à la progression complète de la maladie<sup>168</sup>. Les changements qui se produisent dans le cerveau sont variés et inclus de la neurodégénération, de la gliose, de la neurogénèse et de la croissance axonale, modifiant ainsi l'architecture moléculaire et organisationnelle des cellules neuronales<sup>167</sup>.

#### 1.3.4.1 Neurodégénérescence

La mort neuronale, qui est une des principales caractéristiques de la sclérose hippocampique associée à l'ÉLT, est probablement le changement le plus fréquent et le mieux caractérisé de l'épileptogénèse. Bien qu'elle soit fréquemment observée dans l'hippocampe, de la neurodégénérescence peut également être présente dans l'amygdale, les cortex parahippocampiques, le thalamus et le cervelet <sup>169</sup>. Est-ce que ce sont les crises récurrentes qui causent la neurodégénération? Ou bien est-ce la neurodégénérescence qui est responsable des crises? De l'atrophie de l'hippocampe a déjà été vue par IRM chez des patients avant même le début des crises. Toutefois, plusieurs études, autant chez l'humain que chez les animaux, ont démontré que les crises pouvaient causer la neurodégénération <sup>170</sup>. En particulier, il a été bien démontré que le *status epilepticus* chez les rongeurs mène à la mort neuronale, avant l'apparition de crises récurrentes. Deux hypothèses sont proposées pour expliquer la raison pour laquelle la mort neuronale est nécessaire dans le processus d'épileptogénèse <sup>171</sup>. La première hypothèse suggère que la perte de transmission synaptique causée par la mort des neurones envoie des signaux qui déclencheraient la réorganisation synaptique de même que le bourgeonnement axonal, créant ainsi des circuits aberrants aggravant l'hyperexcitabilité. La deuxième hypothèse suggère quant à elle que l'épileptogénèse n'est pas une conséquence directe de la mort neuronale, mais bien des modifications biochimiques causées par de la neurodégénérescence programmée. À ce jour, aucune des deux hypothèses ne semble faire l'unanimité dans la communauté scientifique, mais une combinaison des deux est envisageable.

#### *1.3.4.2 Gliose*

La formation de gliose est une autre caractéristique de l'épileptogénèse. Les analyses de profil d'expression génique dans les modèles animaux d'épilepsie induite et dans le tissu de patients épileptiques ont révélé une surexpression marquée de gènes codant pour des marqueurs de cellules gliales ainsi qu'une augmentation de protéines produites par ces dernières<sup>172,173</sup>. Les astrocytes et les microglies sont les deux types de cellules gliales les plus étudiées dans les processus épileptogéniques. Les astrocytes, suite à une blessure au niveau du cerveau, vont venir former une barrière autour de la lésion pour permettre une meilleure réparation<sup>174</sup>. Ils sont également impliqués dans la réponse immunitaire suite à une insulte, en produisant des médiateurs inflammatoires dès l'apparition de la blessure<sup>175</sup>. Outre leur rôle protecteur, les astrocytes contribuent également à l'activité épileptique en modulant les niveaux extracellulaires des neurotransmetteurs<sup>176</sup>. Les microglies sont quant à elles activées suite à une insulte. Ces dernières sont déjà visibles de 12 à 24h après l'insulte, et peuvent le demeurer pendant plusieurs semaines<sup>177</sup>. Une fois activées, elles vont sécréter différents facteurs de croissance qui ont un effet neuroprotecteur et qui favorisent la régénération neuronale<sup>178,179</sup>. Toutefois, les microglies activées sécrètent également des composés nocifs pour les neurones tels que des cytokines pro-inflammatoires, des protéases et de l'oxyde nitrique<sup>180,181</sup>. L'effet bénéfique net de l'activation des microglies reste ainsi controversé.

#### *1.3.4.3 Neurogénèse*

Une autre caractéristique de l'épileptogénèse est la présence de neurogénèse. Des cellules précurseuses neuronales ont en effet été isolées à partir de tissus cérébraux obtenus sur des patients atteints d'épilepsie réfractaire du lobe temporal<sup>182</sup>. Chez les modèles animaux, le

*status epilepticus* engendre une augmentation de la neurogénèse. L'activité épileptique aura toutefois un impact négatif sur la croissance et la migration de ces nouveaux neurones, créant ainsi des connexions aberrantes et une augmentation de l'excitabilité <sup>183</sup>.

#### *1.3.4.4 Croissance axonale*

Le bourgeonnement des fibres moussues et des axones des cellules glutaminergiques et GABAergiques est presque toujours observé suite à un *status epilepticus* dans les modèles animaux. Ce phénomène a également été décrit dans les tissus réséqués de patients épileptiques <sup>184,185</sup>. Le rôle fonctionnel de ces bourgeoisements dans le processus épileptogénique n'est à ce jour pas très bien compris. Toutefois, il a été démontré expérimentalement qu'une augmentation de ces croissances axonales pouvait faciliter la récupération suite à une insulte <sup>186</sup>. Rao et al. (2006) <sup>187</sup> ont quant à eux réussi à diminuer la fréquence des crises récurrentes chez leurs rats suite à un SE, en redirigeant les fibres moussues du gyrus dentelé au CA3. Une meilleure compréhension de l'impact de ces bourgeoisements pourrait ainsi ouvrir la porte à de nouveaux traitements antiépileptogéniques.

## **1.4 Modèles animaux de l'épilepsie du lobe temporal**

### **1.4.1 Utilisation des modèles animaux : rôle et importance**

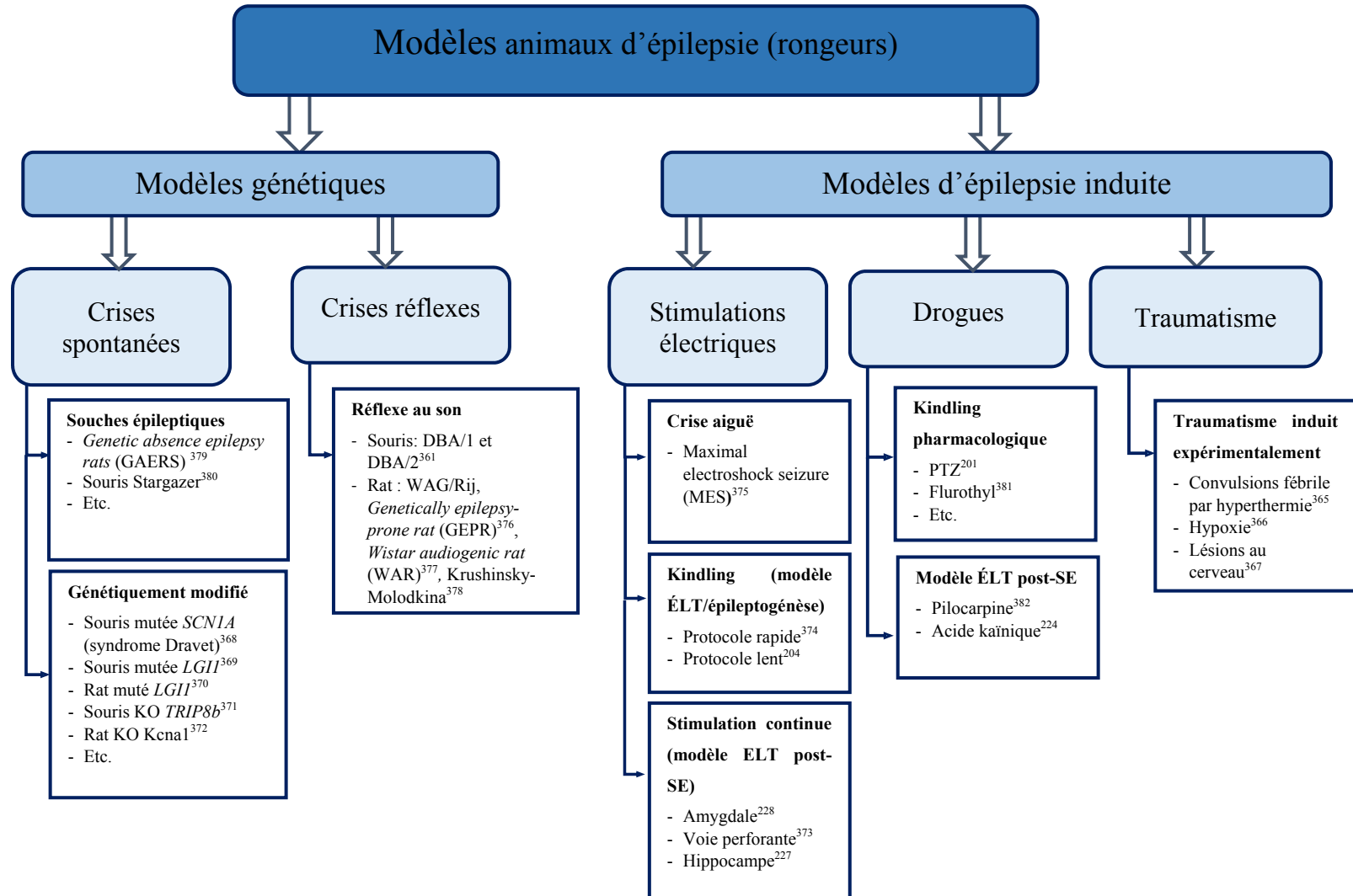
Tel que discuté précédemment, l'épilepsie du lobe temporal est associée à des changements moléculaires et physiologiques importants. Puisque ces changements se font graduellement, la compréhension des mécanismes moléculaires complexes qui sont impliqués ne peut être étudiée simplement chez l'humain dans un contexte de recherches cliniques. L'utilisation de



différents modèles animaux aide, et ce depuis près d'un siècle <sup>188</sup>, les scientifiques à mieux comprendre les modifications anatomiques <sup>189-191</sup>, biochimiques <sup>192-195</sup> et génétiques <sup>196-200</sup> associés à diverses formes d'épilepsie.

Bien que les premières études se faisaient principalement sur des animaux tel que le chien, le chat, le cochon d'Inde ou les primates non-humains, de nos jours, ce sont les rongeurs qui prédominent dans les études <sup>188</sup>. Leur petite taille, leur faible coût et la facilité à les maintenir en laboratoire en ont fait des animaux de prédilection en recherche médicale. Les différents modèles animaux peuvent être classés en différentes catégories (Figure 1.4.1.1). Il peut s'agir d'animaux qui sont épileptiques de manière spontanée, ou d'animaux dont les crises sont induites, soit à l'aide de drogue ou de stimulations électriques. Ensuite, les modèles peuvent présenter des crises uniques, ou des crises récurrentes. Pour l'étude de l'épilepsie du lobe temporal, ce sont les modèles animaux d'épilepsie acquise qui sont les plus communs en recherche expérimentale. Ces modèles permettent de recréer, le plus fidèlement possible, les phases de développement de la maladie. Pour ce faire, l'animal doit subir une insulte initiale, que ce soit par stimulations électriques ou par injection de drogue convulsivante. Il y aura ensuite apparition de crises récurrentes, avec ou sans lésions apparentes. L'avantage de ces modèles est qu'ils reproduisent le phénomène d'épileptogénèse vu chez les patients épileptiques. Ce sont donc des modèles de choix pour l'étude des mécanismes d'épileptogénèse, et également pour tester de nouveaux médicaments antiépileptiques <sup>201-203</sup>. Deux grandes catégories de modèles sont fréquemment utilisées pour étudier l'ÉLT: le modèle «kindling» et les modèles post-*status epilepticus* (post-SE).

**Figure 1.4.1.1.** Schéma résumé des modèles animaux en épilepsie.



### 1.4.2 Modèle «kindling»

La méthode du *kindling*, ou théorie de l'embrassement en français, est le modèle de stimulation électrique le plus fréquemment employé dans l'étude de l'ÉLT<sup>202</sup>. Décrit pour la première fois en 1969 par Goddard, le *kindling* consiste à donner des stimulations électriques sous-convulsives dans la région limbique du cerveau, et ce, de manière répétée<sup>204</sup>. Au départ, ces stimulations sous-convulsives ont peu ou pas d'effet sur le comportement de l'animal. Avec les répétitions, il y aura une augmentation progressive de l'excitabilité neuronale, et de ce fait, apparaîtront des décharges épileptiques localisées, puis des crises épileptiques cliniques de plus en plus fortes et de plus en plus longues, jusqu'à l'atteinte d'un plateau. On dit que l'animal est «kindlé» lorsqu'une seule stimulation est suffisante pour provoquer une crise épileptique de stade 5 selon l'échelle de Racine<sup>205</sup>. Cette échelle originale, qui permet la classification des crises selon la sévérité, soit : stade 1) mouvements faciaux et buccaux, stade 2) hochements de tête brusques, stade 3) clonies des pattes avant, stade 4) clonies et cambrage de l'animal, stade 5) cambrage suivi de la chute de l'animal. Cette sensibilité à développer une crise suite à une stimulation sous-convulsive doit également être permanente pour considérer que l'animal est complètement «kindlé». Comme pour tous les modèles animaux d'épilepsie induite, il est important de noter que la sensibilité au *kindling* varie d'une espèce à l'autre. Des facteurs génétiques et environnementaux peuvent influencer cette sensibilité<sup>206-208</sup>.

L'objectif de ce type d'expérimentation est de pouvoir étudier le développement graduel de la maladie, en commençant par l'absence de crises épileptiques, puis par l'apparition de crises partielles et enfin de formes plus complexes comme celles qui sont secondairement généralisées<sup>209</sup>. Le *kindling* produit, de manière reproductible, une série de changements

moléculaires et cellulaires qui permet d'étudier les mécanismes d'épileptogénèse dans le temps<sup>202</sup>.

Le modèle de *kindling* comporte toutefois certains désavantages. En effet, le protocole standard, qu'il soit rapide (1 stimulation/heure) ou lent (1 stimulation/jour), ne cause pas de crises récurrentes chez l'animal. De plus, il n'y a que peu ou pas de dommage neuronal apparent suite au *kindling* standard. Il ne reproduit ainsi pas tout à fait les caractéristiques types de l'ÉLT avec SH<sup>210</sup>. Il n'est donc pas considéré comme un modèle de choix pour le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour les épilepsies pharmaco-résistantes<sup>211</sup>. Pour causer l'apparition de crises récurrentes dans ce modèle, il faut réaliser un protocole prolongé de *kindling*. Pinel et Rovner (1978) ont ainsi réussi à créer des crises récurrentes chez 16 de leurs 18 rats après près de 300 stimulations de l'amygdale, et ce, sur une période de 132 jours. Brandt et al. (2004)<sup>212</sup> ont quant à eux réussi à en obtenir chez 50 % de leurs rats après plus de 200 stimulations de l'amygdale. De la mort neuronale marquée dans le hile et le CA1 était également observée suite à ce *kindling* prolongé.

La durée de ce protocole, les coûts élevés et l'incertitude face au nombre d'animaux qui développeront des crises récurrentes en font toutefois un modèle difficile à justifier. De plus, il est maintenant possible d'induire des crises récurrentes grâce à un protocole plus léger et moins long de stimulation électrique, soit le modèle de SE induit pas stimulation électrique continue. Dans la prochaine section, nous aborderons le fonctionnement et la pertinence des différents modèles post-SE dans l'étude de l'épilepsie du lobe temporal.

### **1.4.3 Modèle post-*status epilepticus* (SE)**

Plusieurs modèles d'épilepsie se basent ainsi sur le développement de crises spontanées suite à un *status epilepticus* induit soit par stimulation électrique, soit par injection de drogues convulsivantes. Dans les modèles animaux, le *status epilepticus* est atteint lorsque l'animal est en crise convulsive généralisée pendant au moins une heure, de façon constante ou intermittente, mais sans retour de la conscience et avec activité épileptiforme continue visible à l'EEG. Suivant le status, les crises spontanées apparaissent progressivement suite à une période de latence qui varie selon les espèces, et les souches choisies. Bien qu'aucune crise clinique ne soit observée durant cette période, de l'activité épileptiforme peut être visible par enregistrement EEG <sup>213</sup>. Un des avantages de ces modèles est la présence de caractéristiques neuropathologiques similaires à la pathologie observée chez les patients atteints d'épilepsie du lobe temporal mésial. En effet, la perte neuronale et la gliose, caractéristiques de la sclérose hippocampique, sont beaucoup plus prononcées dans les modèles post-SE que dans les modèles standards de *kindling*<sup>209</sup>. Toutefois, ces lésions varient grandement dépendamment de l'espèce animale choisie, de la souche, de la méthode d'induction du SE, et de la sévérité et de la durée de ce dernier <sup>214-218</sup>. Les méthodes d'inductions d'un SE les plus communes sont la stimulation électrique continue, l'injection d'acide kaïnique et l'injection de pilocarpine. Tel que présenté dans le chapitre 3 de cette thèse, nous avons opté pour l'utilisation de deux différents modèles post-SE chez le rat : l'induction par acide kaïnique et l'induction par stimulation intrahippocampique continue. Les prochaines sections seront donc consacrées à en résumer les particularités.

#### 1.4.3.1 SE induit par acide kaïnique

L'acide kaïnique (AK), qui est un analogue du L-glutamate, agit comme agoniste aux récepteurs ionotropes de l'AK<sup>219</sup>. C'est en 1953 que cette drogue est extraite et isolée pour la première fois, à partir de l'algue rouge tropicale, *Digenea simplex*<sup>220</sup>. Cette drogue est initialement produite pour éliminer l'ascaris, un ver intestinal, mais en 1970, son effet excitateur sur les neurones corticaux de rat est démontré par Shinozaki et Konishi<sup>221</sup>. C'est grâce à cette découverte que le modèle d'acide kaïnique a été développé, quelques années plus tard, par Ben-Ari et Lagowska<sup>222</sup>. Ces auteurs ont alors démontré que l'administration d'AK, directement dans l'amygdale des rats, engendrait des crises épileptiques de même que des lésions au niveau du CA3 de l'hippocampe. L'administration systémique d'AK, qui demande moins d'effort et de ressources que l'injection intracérébrale, produit sensiblement le même résultat, soit l'apparition d'une crise prolongée (*status epilepticus*) et la présence de lésions au niveau de l'hippocampe.

Suite à l'injection de l'AK et avant le début du *status*, une suite caractéristique de comportements est observée. La première manifestation épileptique est l'apparition de crises limbiques que l'on appelle «wet-dog shake». Entre ces crises de très courte durée, l'animal ne présente pas de signe clinique apparent. Toutefois, de l'activité épileptiforme, visible uniquement par enregistrement EEG, va débiter dans l'hippocampe<sup>223</sup>. L'activité va ensuite se propager dans les régions corticales du cerveau et l'on va voir apparaître, chez l'animal, des automatismes faciaux, des clonies faciales et des myoclonies au niveau des pattes avant. Par la

suite l'animal souffrira de crises de stade 4 et 5 selon l'échelle de Racine, soit des clonies des pattes antérieures accompagnées de cambrage puis de chute de l'animal <sup>205</sup>. C'est lorsque l'animal présente des crises de ce type, de manière continue pendant au moins une heure, que l'on considère que l'animal est en *status epilepticus*. Le SE induit par injection systémique d'acide kaïnique produit des lésions typiques de la sclérose de l'hippocampe, soit de la perte neuronale au niveau du CA1, CA3 et CA4 et de la gliose <sup>224,225</sup>. Des crises récurrentes apparaissent généralement entre 10 et 30 jours après le SE, chez 60 à 80 % des animaux <sup>224,226</sup>.

Un des désavantages de l'administration systémique de drogue pour induire un SE est qu'il est difficile de contrôler la biodisponibilité de cette dernière dans le cerveau de l'animal. Des doses différentes peuvent ainsi être nécessaires pour induire un SE similaire entre les individus. Tel que présenté dans le chapitre 3 de cette thèse, l'utilisation de souches consanguines de rongeurs est un excellent moyen de diminuer le biais possible lors de la comparaison de résultats obtenus sur différents animaux. Une autre solution pour diminuer le biais causé par l'utilisation de composé pharmacologique est d'utiliser la stimulation électrique pour causer le SE.

#### *1.4.3.2 Stimulation électrique intra hippocampique continue*

La stimulation électrique intra hippocampique continue (SÉIHC) est une méthode d'induction de *status* non-pharmacologique qui a été développée par Lothman à la fin des années 80 <sup>227</sup>. Le modèle consiste à donner une stimulation électrique continue de haute intensité dans l'hippocampe pendant au moins une heure, ou jusqu'à ce que le SE se maintienne par lui-

même malgré l'arrêt de la stimulation. La stimulation peut se faire via le CA3 ou la voie perforante. Plusieurs études obtiennent des résultats similaires en stimulant plutôt l'amygdale<sup>228,229</sup>. L'intensité des crises, le taux d'apparition de crises récurrentes et la durée de la période de latence varient selon la région stimulée et selon les études<sup>209</sup>. Encore une fois, il faut prendre en considération que la souche, l'âge et le sexe de l'animal peuvent influencer grandement ces divers paramètres. Toutefois, tout comme dans le modèle d'acide kaïnique, il y aura, suite au SE, une période de latence suivi de l'apparition de crises récurrentes. Cette période de latence, que l'on retrouve uniquement dans les modèles post-SE d'épilepsie, est un des plus grands avantages de ces derniers. Elle offre en effet une fenêtre temporelle où des traitements ou de la prévention pourraient diminuer les risques d'épileptogénèse<sup>230</sup>.

#### **1.4.4 Hétérogénéité génétique dans les modèles animaux d'épilepsie du lobe temporal.**

Bien que l'on considère que les différents modèles mentionnés plus haut reproduisent assez fidèlement l'épilepsie du lobe temporal mésial(ÉLTm) chez l'humain, il faut garder en tête que les résultats obtenus peuvent grandement différer entre les espèces ou les souches utilisées. En effet, il est connu que le substratum génétique de l'animal peut influencer la sensibilité aux crises épileptiques, le taux de mortalité, et la pathologie associée au modèle. Tout comme chez l'humain, la susceptibilité à développer l'épilepsie du lobe temporal chez les souris ou les rats est fort probablement polygénique. L'utilisation de souches consanguines peut alors servir de point de départ pour la découverte de facteurs génétiques associés à l'ensemble des différents traits de l'ÉLTm.



Plusieurs études ont comparé la sensibilité aux crises induites chez différentes souches de souris consanguines. Les souris DBA/2J par exemple, sont plus sensibles à développer des crises suite à une stimulation électrique ou pharmacologique que les souris C57BL/6J<sup>231</sup>. Des lignées congéniques obtenues par croisement réciproque de ces deux lignées ont permis d'associer différents loci à la susceptibilité aux crises épileptiques<sup>217,232-235</sup>. Des locus de caractère quantitatif (QTL) sur les chromosomes 5 et 15 sont ceux qui auraient l'impact le plus important sur le phénotype des souris<sup>233,234</sup>. Des différences marquées dans la susceptibilité aux crises épileptiques induites ont également été observées dans des lignées consanguines et non consanguines de rats. Les rats Wistar et Fisher 344 répondent en effet plus fortement à l'acide kaïnique que les rats Sprague-Dawley et Long-Evans Hooded<sup>216</sup>. Une autre étude a comparé la sensibilité aux crises suite à l'injection de pilocarpine chez les Wistar au Long-Evans Hooded, deux lignées de rats non consanguins. Aucune différence n'a été observée, ce qui suggère que la celle-ci est drogue dépendante.

Le développement de la sclérose hippocampique dans les modèles animaux est également fortement influencé par le substratum génétique de l'animal. Chez les rats Wistar, une diminution du nombre de neurones dans la région du hilus est observée suite à un *status epilepticus* induit par acide kaïnique. Les rats Long-Evans sont quant à eux résistants à la perte neuronale. De plus, le bourgeonnement des fibres moussues, caractéristique de la SH, est significativement plus élevé dans le gyrus denté et dans le CA3 des Wistar comparativement au Long-Evans<sup>236</sup>. Chez les souris, des différences au niveau de la sensibilité à la mort neuronale ont également été fréquemment observées. Les souris 129/SvEMS, FVB/N et DBA/2J présentent de la mort neuronale sévère dans les régions CA3 et CA1 de

l'hippocampe, tandis que les souris C57BL/6 et BALB/c sont résistantes<sup>217,237,238</sup>. Les souris des souches C57BL/6 et FVB/N, bien qu'ils diffèrent au niveau de la perte neuronale, ont la même susceptibilité aux crises épileptiques comme telle. C'est en créant des lignées congéniques réciproques entre ces deux souches que plusieurs loci ont pu être associés à la sensibilité à mort neuronale chez les souris<sup>239-241</sup>. Par clonage positionnel, il a été démontré que le locus ayant le LOD score le plus élevé se situait dans une région de 5Mb sur le chromosome 18<sup>242</sup>. Le gène *Galr1*, situé à l'intérieur de ce locus, était différentiellement exprimé entre les deux souches. L'étude de souris C57BL/6 chez qui le gène avait été délété a permis de confirmer l'importance de celui-ci dans la susceptibilité à la mort neuronale suite à un SE induit par AK<sup>243</sup>.

L'utilisation de souches de souris consanguines ont permis de proposer une nouvelle hypothèse sur les mécanismes moléculaires responsables de la susceptibilité à la mort neuronale chez les souris. L'utilisation de souches non-congéniques est plus fréquente chez les rats. Cela augmente malheureusement les variations phénotypiques inter-individus, rendant la compréhension des bases moléculaires de l'épilepsie du lobe temporal plus ardue. Dans le chapitre 3 de cette thèse, nous présenterons l'une étude de la sensibilité aux crises induites par un *status epilepticus* et à la susceptibilité à la mort neuronale chez des souches consanguines de rats.

## **1.5 Mort subite inattendue et inexplicée en épilepsie (MSIÉ)**

### **1.5.1 Définition et facteurs de risques**

Les traitements pour l'épilepsie se font de plus en plus nombreux. En effet, 70 % des patients épileptiques voient leur crises être contrôlées facilement par la prise de médicaments antiépileptiques <sup>244</sup>. Dans la population générale, l'épilepsie est donc de moins en moins perçue comme une maladie grave ou incapacitante. Toutefois, il est important de noter que pour les patients pour qui les traitements conventionnels sont inefficaces, il y a un haut niveau de comorbidités <sup>245,246</sup>. Il peut, entre autres, y avoir présence de troubles psychologiques (dépression, anxiété), stigmatisation sociale, maladie cardiaque, diminution de la qualité de vie et également diminution de la durée de vie <sup>246</sup>. Le taux de mortalité chez les patients épileptiques pharmacorésistants est nettement supérieur à la moyenne. La cause de décès la plus fréquente chez les patients épileptiques chez qui les crises ne sont pas bien contrôlées, est la mort subite inattendue et inexplicée en épilepsie (MSIÉ) <sup>247-249</sup>. La MSIÉ est défini comme une mort soudaine et inexplicée chez un patient épileptique qui semblait pourtant en santé <sup>250</sup>. Le décès se produit généralement sans surveillance, la nuit, et aucune cause apparente n'est observée lors de l'autopsie. Bien que cette morte subite puisse être observée chez l'ensemble des patients épileptiques, certains facteurs de risques peuvent favoriser ce type de décès <sup>249,251,252</sup>. Les hommes âgés entre 20 et 40 ans seraient ainsi plus sujet à la mort subite en épilepsie. Un mauvais contrôle des crises, plus spécifiquement les crises d'épilepsie généralisées de type tonico-clonique, serait également un facteur de risque important. La position alitée et la présence d'une crise avant le décès sont d'autres facteurs majeurs reconnus. Il n'est toutefois pas possible, à ce jour, de diagnostiquer ou de prévoir la MSIÉ

puisque les mécanismes physiopathologiques ne sont pas encore bien compris. Au cours des dernières années, la communauté scientifique et médicale a consacré davantage d'efforts pour comprendre les causes de ces morts inexplicables afin d'aider les médecins à mieux superviser les patients à risques et éventuellement prévenir ces décès.

### **1.5.2 Physiopathologie**

La mort subite et inexplicable de l'épilepsie n'est pas une condition unique, mais bien une catégorie de décès dont les mécanismes sous-jacents peuvent varier. Il y a trois hypothèses principales qui pourraient expliquer ces cas de décès : un problème cardiaque, respiratoire ou une combinaison des deux<sup>253,254</sup>. Celles-ci sont entre autres issues de données cardiorespiratoires péri-ictales, de même que de quelques rares cas de MSIÉ qui se sont produits devant témoins dans les unités cliniques de monitoring vidéo-eeg. L'étude de certains modèles de souris transgéniques ont par ailleurs permis de soutenir certaines de ces hypothèses.

#### *1.5.2.1 Hypothèse cardiaque*

L'hypothèse voulant que la mort subite et inexplicable de l'épilepsie soit causée par un problème cardiaque vient du fait qu'il est fréquent d'observer différentes anomalies cardiaques tel que de l'arythmie, de la bradycardie et de la tachycardie durant une crise d'épilepsie<sup>255-258</sup>. Chez près du tiers des patients épileptiques, une plus grande dispersion du QT, qui reflète un problème de repolarisation cardiaque, est observée<sup>259-261</sup>. De plus, une étude réalisée en 2011 a démontré que chez la moitié des patients épileptiques, il y avait présence de potentiels tardifs ventriculaires (PTV)<sup>262</sup>. Ces PTV sont entre autres associés à un plus grand risque de tachyarythmie. Pourquoi les patients épileptiques présentent-ils autant d'anomalies

cardiaques? À ce jour, la question demeure sans réponse, mais une prédisposition génétique est fortement soupçonnée.

Le syndrome du QT long (SQTL) est une anomalie du cœur qui est associée à un haut risque de syncope, de tachycardie, et de mort subite<sup>263</sup>. Un historique de crises épileptiques est également présent chez près de 30 % des patients<sup>264</sup>. Le SQTL est généralement transmis de manière autosomique dominante, mais peut également, dans 5 à 10 % des cas, être causé par des mutations *de novo*<sup>265</sup>. Dans plus de 75 % des cas, des mutations dans les gènes *KCNQ1*, *KCNH2* et *SCN5A*, codant pour des canaux ioniques, sont responsables de la maladie<sup>266–268</sup>. Ces gènes sont exprimés à la fois dans les cellules cardiaques et dans les neurones, ce qui suggèrent un lien probable entre les crises épileptiques et les arythmies cardiaques<sup>264</sup>. Une étude génétique réalisée en 2011 sur des tissus post-mortem de patients australiens décédés de MSIÉ, a d'ailleurs montré que des mutations dans ces trois importants gènes étaient présents dans 13 % des cas<sup>269</sup>. Par ailleurs, des souris portant des mutations dans *KCNQ1*, reproduisent le phénotype d'anomalies cardiaques et de mort subite, et présentent également de l'activité épileptiforme avec crises épileptiques partielles et généralisées<sup>270,271</sup>. Chez les souris «knock-out» pour *KCNQ1*, les crises sont beaucoup plus sévères et le taux de mort subite, plus élevé<sup>272</sup>.

Un autre indice suggérant le lien possible entre la MSIÉ et un problème cardiaque est la présence de mort subite chez les patients atteints du syndrome de Dravet. Ce syndrome d'encéphalopathie épileptique, aussi appelé épilepsie myoclonique sévère du nourrisson, est un des types d'épilepsie génétique le plus sévère de l'enfant. Il est caractérisé par des crises

réfractaires prolongées qui peuvent mener à diverses comorbidités comme de l'ataxie, des troubles du sommeil, des comportements autistiques et est généralement associé à un retard psychomoteur et de langage <sup>273,274</sup>. Les patients atteints du syndrome de Dravet présentent également des anomalies cardiaques au niveau de la dispersion des QT et de la variabilité du rythme cardiaque <sup>275,276</sup>. Près de 80 % des patients atteints sont porteurs de mutations dans le gène *SCN1A*, qui code pour la sous-unité alpha-1 du canal sodium <sup>83,84,86,277,278</sup>. Ce canal neuronal est également exprimé dans les cellules cardiaques, ce qui suggère que les mutations pourraient être responsables, et des crises épileptiques, et de l'arythmie cardiaque pouvant causer la mort subite. Les modèles de souris Dravet, chez qui des mutations tronquantes dans *SCN1A* ont été introduites, reproduisent le phénotype humain. Les souris décèdent généralement de bradycardie suite à une crise tonico-clonique généralisée prolongée<sup>279</sup>. Bien que ces résultats suggèrent un lien fort entre la MSIÉ et les problèmes cardiaques, elles ne permettent pas d'exclure une dysfonction respiratoire concomitante, que ce soit dans les modèles animaux ou chez l'humain.

#### *1.5.2.2 Hypothèse respiratoire*

La deuxième grande hypothèse pour expliquer la mort subite en épilepsie est le trouble respiratoire. De l'hypoxémie est fréquemment observée chez les patients en crises <sup>280,281</sup>. Chez des patients qui étaient suivi en vidéo-EEG-*monitoring* avec enregistrement de la respiration, de l'apnée centrale était observée chez près de 60 % des patients et ce, pour 42 % des crises <sup>255</sup>. Un cas a d'ailleurs déjà été rapporté où un patient monitoré et ayant souffert d'apnée durant une crise, est décédé plus tard, à la maison, de mort subite et inexplicable <sup>282</sup>. Dans d'autres cas de MSIÉ devant témoin, de l'apnée, de l'obstruction des voies respiratoires et/ou de l'œdème pulmonaire ont été rapportés <sup>283-286</sup>. Autre fait intéressant, Bateman *et al.* ont

montré, après avoir analysé des données de saturations de plus de 300 crises épileptiques chez 56 patients, que la désaturation en oxygène durant la crise se poursuivait malgré une augmentation du rythme respiratoire <sup>287</sup>. Ces résultats suggèrent que l'hypoxémie durant une crise épileptique chez ces patients est sans doute dû à une dysfonction pulmonaire primaire plutôt qu'à de l'hypoventilation. Dans deux autres cas de MSIÉ qui se sont produits devant témoin, une combinaison entre une dysfonction cardiaque et un problème respiratoire a été observée. Dans les deux cas, les patients souffraient d'hypoventilation et montraient des anomalies au niveau de l'électrocardiogramme tel qu'une élévation du segment ST, une onde T ample et une diminution du rythme cardiaque jusqu'à l'arrêt cardiaque complet <sup>288</sup>.

### **1.5.3 Modèles animaux de MSIÉ- souris DBA/1 et DBA/2**

Les cas de mort subite inattendu et inexplicée ne sont que très rarement observés. Comme vu précédemment, les hypothèses proposées pour expliquer ces décès se basent principalement sur quelques cas isolés de MSIÉ qui se sont produits devant témoin, et sur les connaissances générales des effets des crises épileptiques sur le système respiratoire et cardiaque. L'utilisation de modèles animaux est donc essentielle pour mieux comprendre la physiopathologie et pour développer de nouveaux moyens de préventions. Tel que discuté précédemment, les modèles de souris transgéniques épileptiques ont fourni beaucoup d'informations sur les mécanismes moléculaires sous-tendant certains cas particuliers de MSIÉ. Toutefois, les modèles les plus répandus dans l'étude de la MSIÉ sont les souris DBA/1 et DBA/2. Ces souris consanguines sont susceptibles de développer, suite à un stimulus auditif, des crises épileptiques généralisées qui mènent, dans 75 à 100 % des cas, au décès <sup>289-292</sup>. Il a été établi que décès de ces souris était dû à un arrêt respiratoire, menant à de

l'arythmie, puis à l'arrêt cardiaque. Si un support respiratoire est fourni durant l'évènement, les décès sont évités, ce qui suggère que le problème respiratoire est la cause primaire du décès soudain chez les souris DBA/1 et DBA/2 <sup>289,292</sup>. Les études subséquentes suggèrent que les arrêts respiratoires sont causés par un dysfonctionnement du système sérotoninergique <sup>292,293</sup>. En effet, lorsque les souris reçoivent une injection de fluoxetine, un inhibiteur sélectif de la recapture de sérotonine (ISRS), avant la crise, le décès est prévenu. Une sous-expression de certaines sous-unités des récepteurs à la sérotonine dans le tronc cérébral expliquerait ce phénotype chez les souris DBA/1 et DBA/2 <sup>291,294</sup>. Ces résultats sont compatibles avec les observations qui suggèrent que le système sérotoninergique joue un rôle important dans le contrôle central de la respiration, mais également dans la propension aux crises épileptiques.

#### **1.5.4 Implication de la sérotonine dans la MSIÉ**

En effet, c'est dans le tronc cérébral que se situe le siège du contrôle de la respiration. Plusieurs neurotransmetteurs sont impliqués dans le processus, mais la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est le plus important. En effet, le 5-HT agit en stimulant la respiration en réponse à une diminution de CO<sub>2</sub> <sup>295-297</sup>. La sérotonine joue également un rôle dans les crises épileptiques elles-mêmes. Une augmentation du niveau de 5-HT extracellulaire permettrait d'inhiber différents types de crises épileptiques <sup>298,299</sup>. Plusieurs médicaments antiépileptiques, comme l'acide valproïque, la lamotrigine, la carbamazépine et la phénytoïne, stimulent la production et la libération de 5-HT dans le cerveau <sup>300-302</sup>. Par ailleurs, une étude a démontré qu'il y avait une diminution de la sévérité de l'hypoxémie durant les crises épileptiques chez les patients prenant des ISRS <sup>303</sup>. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc



que le lien entre l'épilepsie et la mort subite causée par déficience respiratoire pourrait être, dans certain cas, lié à un dysfonctionnement du système sérotoninergique.

## **1.6 Objectifs et plan expérimental**

Les épilepsies d'origine focales sont un groupe de syndromes épileptiques hétérogènes où l'on retrouve le plus haut taux de pharmacorésistance. Les études sur les jumeaux et les grandes familles de patients ont montré que des facteurs génétiques pouvaient jouer un rôle important dans ces épilepsies. Il est donc primordial, dans cette optique, de découvrir ces facteurs géniques afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires derrière le développement, la progression et les conséquences de la maladie. Deux approches différentes ont fait leurs preuves dans la découverte de ces facteurs : l'approche par la génétique humaine et l'approche expérimentales à l'aide de modèles animaux.

### **1.6.1 Approche humaine**

Comme nous l'avons vu à la section 1.2, les études de liaisons sur de grandes familles d'épileptiques, les études de variations structurelles, le séquençage de gènes candidats et plus récemment, le séquençage à haut débit ont permis la découverte de plusieurs gènes d'épilepsie. Plus récemment, le séquençage de l'exome entier de patients atteints d'épilepsie focale familiale à foyers variables et d'épilepsie focale a démontré que des mutations dans le gène *DEPDC5* étaient à l'origine de ces épilepsies. Notre premier objectif était donc de vérifier la contribution de ce gène dans notre cohorte Canadienne-Française de patients atteints

d'épilepsie focale et d'épilepsie familiale focale à foyers variables. Les résultats de cette approche expérimentale sont présentés dans le chapitre 2 de cette thèse.

### **1.6.2 Approche animale**

Les facteurs génétiques jouent donc un rôle important dans les différentes formes d'épilepsie. Bien que l'identification de gènes dans des grandes familles d'épileptique ait fait ses preuves, le succès de ces études est limité à quelques rares cas d'épilepsies monogéniques. Tel que mentionné plus tôt, l'épilepsie du lobe temporal associée à la sclérose hippocampique, une des épilepsies les plus fréquentes et les plus difficiles à traiter, est influencée par une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. L'étude de la génétique humaine ne permet actuellement pas d'explorer cette interaction gène-environnement de façon précise. Pour permettre de distinguer la contribution génétique de la contribution environnementale dans le développement de l'épilepsie du lobe temporal mésial, l'utilisation de modèles animaux consanguins est une méthode expérimentale robuste. Elle permet, grâce à des techniques de substitution chromosomique (création de souches congéniques), d'élucider cette relation complexe entre des gènes spécifiques, et l'environnement. Comparativement à la génétique humaine, cette méthode permet une évaluation objective et quantitative des différents phénotypes associés aux maladies à traits complexes. Il est alors possible, par clonage positionnel et par la suite, par création de souches congéniques, d'isoler les gènes impliqués dans les différents phénotypes de la maladie. C'est dans cette optique que nous avons voulu vérifier si la sclérose hippocampique est effectivement un trait génétiquement déterminé chez

différentes souches de rats consanguins, afin d'en déterminer les bases moléculaires. Les résultats de cette approche expérimentale sont présentés dans le chapitre 3 de cette thèse.

Lors de la réalisation de l'étude sur la susceptibilité à la mort neuronale chez des souches consanguines de rats, nous avons découvert que les rats SHR mouraient systématiquement suite à une crise généralisée induite par l'acide kaïnique. Nous avons alors émis l'hypothèse que la mort subite et inexplicée de l'épilepsie pouvait également être un trait génétiquement déterminé. Notre objectif était donc, en premier lieu, de déterminer les mécanismes physiologiques menant au décès chez ces rats afin d'éventuellement orienter les recherches les mécanismes moléculaires sous-jacents. Les résultats préliminaires de cette dernière étude sont présentés dans le chapitre 4 de cette thèse.

## **Chapitre 2 : Reséquençage de DEPDC5 dans la population Canadienne-Française avec épilepsies focales.**

### **2.1 Présentation de l'article**

C'est à la fin des années 90 que l'épilepsie focale familiale à foyers variables (EFFFV) a d'abord été décrite<sup>304</sup>. Il s'agit d'une épilepsie autosomique dominante qui se distingue par le fait que les crises focales émanent de différentes régions du cerveau selon l'individu atteint. Dans une même famille, certains individus présenteront des crises focales temporales, pariétales ou même occipitales.

L'article présenté ici fait suite à la publication de deux études, publiées dans *Nature Genetics* en 2013, dans lesquelles de nouvelles mutations par perte de fonction dans *DEPDC5* étaient décrites chez des familles atteintes d'EFFFV et d'épilepsie focale<sup>48,49</sup>. De ces familles, trois étaient d'origines Canadienne-Française<sup>49</sup>. Nous avons donc entrepris de cribler notre cohorte de patients atteints d'épilepsie familiale à foyers variables et d'épilepsie focale pour le gène *DEPDC5*.

### **2.2 Contribution des auteurs**

Planification de l'étude: C.Ma., C.Me. et P.C.

Collecte de patients, information cliniques et données : C.Ma., C.Me., E.A., L.C., D.K.N. et M.G.

Analyse et interprétation des résultats : C.Ma., C.Me. et P.C.

Écriture du manuscrit : C.Ma., C.Me. et P.C.

Support matériel, technique et administratif : M.G, E.A. et P.C.

## 2.3 A recurrent mutation in *DEPDC5* predisposes to focal epilepsies in the French-Canadian population

\*Caroline Martin<sup>a</sup>, BSc; \*Caroline Meloche<sup>a</sup>, MSc; Marie-France Rioux<sup>b</sup>, MD; Dang Khoa Nguyen<sup>a</sup>, MD; Lionel Carmant<sup>c</sup>, MD; Eva Andermann<sup>d</sup>, MD, PhD; Micheline Gravel<sup>a</sup>, BSc; and Patrick Cossette<sup>a</sup>, MD, PhD.

<sup>a</sup>CHUM Research Center, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>b</sup>Centre Hospitalier de l'Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

<sup>c</sup>CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada.

<sup>d</sup>Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

*Article publié dans Clinical genetics, décembre 2014, volume 86(6), pages 570-574*  
*Identifiant PubMed : 24283814*

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

### 2.3.1 Abstract

Familial focal epilepsy with variable foci (FFEVF) is a heterogeneous epilepsy syndrome originally described in the French-Canadian (FC) population. Mutations in *DEPDC5* have recently been identified in multiple cases of FFEVF as well as in a wide spectrum of other familial focal epilepsies. In this study, we aimed to determine the frequency of mutation of this gene in our large cohort of FC individuals with FFEVF, as well as familial and sporadic cases with focal epilepsy. We report a recurrent p.R843X protein-truncating mutation segregating in one large FFEVF and two small focal epilepsy FC families. Fine genotyping suggests an ancestral allele. A new p.T864M variant, predicted to be disease-causing, was also identified in a small FC family. Overall, we identified *DEPDC5* mutations in 5% of our familial and sporadic focal epilepsy cases (4/79). Our results support the view that mutations

in the *DEPDC5* gene are an important cause of autosomal dominant focal epilepsies in the FC population, including a founder mutation that is specific to this population. These findings may facilitate molecular diagnosis in clinical practice.

### **2.3.2 Introduction**

Epilepsy is a common and disabling neurological disorder affecting approximately 3% of individuals at some time in their life. The disease is characterized by recurrent episodes of neurological dysfunction caused by excessive electrical discharges in the brain. In a significant proportion of common epilepsy syndromes there is no lesion detectable by magnetic resonance imaging (MRI) and inherited factors appear to be most important. Several non-lesional focal epilepsies have been described: autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE; MIM 600513), familial temporal lobe epilepsy (FTLE; MIM 600512), autosomal dominant epilepsy with auditory features (ADEAF; MIM 604619), and familial focal epilepsy with variable foci (FFEVF; MIM 604364). Mutations identified in the *CHRNA4*, *CHRNA2*, *CHRNA2* and *KCNT1* genes were found to cause ADNFLE<sup>25,305</sup> and mutations in *LGI1* have been found in ADEAF patients<sup>134</sup>.

FFEVF is an autosomal dominant form of epilepsy with incomplete penetrance. This syndrome, originally described in the French-Canadian (FC) population, is characterized by a marked intrafamilial variation. The seizures may arise from the frontal, temporal, fronto-temporal, parietal and occipital cortical regions. The seizure onset varies from infancy to adult life. Affected individuals have no structural brain lesions and they usually have normal intellect, although a few exhibit intellectual disability or autism spectrum disorder. A locus for

FFEVF has previously been linked to chromosome 22q12<sup>306–308</sup>. Recently, two groups<sup>48,49</sup> have found mutations in the DEPDC5 gene encoding the poorly characterized DEP domain-containing 5 protein, in FFEVF families as well as in other individuals with inherited focal epilepsies. Dibbens et al.<sup>49</sup> identified three mutations in five FC families with FFEVF. In this study, we undertook the screening of the DEPDC5 gene in our large cohort of FC epilepsy patients, including FFEVF families as well as other individuals with focal epilepsy.

### **2.3.3 Materials and Methods**

#### *Subjects*

We screened the complete open reading frame of DEPDC5 in 79 unrelated individuals with focal epilepsy. Of these, 76 had a familial history of focal epilepsy without any detectable structural etiology and 65 were of FC origin. An informed consent was obtained from each individual before blood samples were collected and genomic DNA was extracted according to standard protocols.

#### *Sequencing and genotyping*

Of the five isoforms of DEPDC5 reported in the RefSeq collection, we screened isoform 4 (reference transcript, NM\_001242896.1; reference protein, NP\_001229825.1) by amplifying by polymerase chain reaction (PCR) 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 and splice sites. Primer sequences and PCR conditions are available upon request. The amplified fragments were sequenced on an ABI3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems,

Burlington, ON, Canada). All variants were confirmed by resequencing and the segregation with the phenotype within the families was tested when possible.

The microsatellite markers used to determine the haplotype encompassing the DEPDC5 locus were genotyped by PCR incorporating primers with fluorescently labeled M13mp18 sequence tails (primers and PCR details available upon request), as described elsewhere<sup>309</sup>.

### **2.3.4 Results**

We found a heterozygous nonsense mutation in the DEPDC5 gene (c.2527C>T, p.R843X) in three affected individuals from three different families. Additional family members were available to test the cosegregation of the mutation with the phenotype (Fig. 1). In family 1, we found this mutation in 11 additional individuals: 5 were affected, 1 had febrile seizures and 5 were asymptomatic. The FFEVF syndrome was diagnosed in this family. Affected members had seizures arising from different brain cortical regions with an average age of onset of 18.75 years (5.5–32 years, Table 1). In family 2, the mutation was found in one affected individual as well as in his asymptomatic father. This family is too small to clinically diagnose FFEVF. In family 3, we found the same mutation in two affected and one asymptomatic individual. Individual IV.9 had seizures originating from different foci whereas individual IV.12 had partial seizures with secondary generalized seizures. Interestingly, these three families originated from the same region (Granby) in Quebec, Canada. To determine whether the families share the mutation because of a genetic link, we performed haplotype analysis around the DEPDC5 locus. The haplotype analysis indicates that all three families share a chromosomal segment of at least 5.5 Mb suggesting identity by descent (Fig. S1 and S2).



Another variant (c.2591C>T; p.T864M) was found in one affected individual with left centro-temporal complex partial seizures with secondary generalized seizures. We only had the unaffected father's DNA and he did not have the variant. This missense was not present in dbSNP137, the 1000 Genome Project database or the EVS database. This variant was found in exon 28 like the previous mutation but was not in a domain of known function. A multiple-protein alignment shows that the threonine residue at position 864 is well-conserved across species, from *Xenopus tropicalis* to *Homo sapiens*. The threonine-to-methionine alteration was predicted to be probably damaging with a score of 0.996, possibly damaging at 0.742, disease-causing, and not tolerated, using the different prediction tools polyphen 2 humdiv, polyphen 2 huvar, mutationtaster and sift, respectively. Mutations in the DEPDC5 gene were therefore found in 5% of our focal epilepsy cohort (4/79).

### **2.3.5 Discussion**

Recently, mutations in DEPDC5 have been found to be a major cause of familial focal epilepsy. Dibbens et al.<sup>49</sup> identified mutations in seven of eight families diagnosed with FFEVF and linked to 22q. They also sequenced 82 probands from smaller families of focal epilepsies, and 12% had mutations in DEPDC5. Ishida et al.<sup>48</sup> found DEPDC5 mutations in three of their five FFEVF families. They also sequenced 11 smaller families with different focal epilepsies and found new mutations in three of them (27%).

In this study, we report a recurrent p.R843X mutation in DEPDC5 segregating with the focal epilepsy phenotypes in three FC families. Fine genotyping of the three families revealed that the mutation occurred on the same haplotype suggesting a common ancestor. The

identification of recurrent mutations in specific population may facilitate molecular diagnosis in clinical practice. Indeed, the same mutation was found by Dibbens et al.<sup>49</sup> and seems to be specific to the FC population. As in their study, our families had variable foci, mostly nocturnal frontal and temporal epilepsy. They also found a deletion mutation p.F164del in three families sharing ancestors from Saint-Raymond (Quebec, Canada), although this later mutation was not found in our study. Many founder mutations have been previously identified in the FC population, even though they are mostly associated with recessive diseases. Other examples of autosomal dominant diseases have been described in this population, such as Clouston's hidrotic ectodermal dysplasia<sup>310</sup>.

Another new variant p.T864M, predicted to be damaging, was identified in an additional FC family. Other potentially damaging variants in DEPDC5 have been reported in the Exome Variant Server although they could be false positive. However, there are no reliable phenotypic characterizations available with respect to epilepsy that can help to understand the significance of these findings. As in the previous studies<sup>48,49</sup>, our results suggest that mutations in DEPDC5 are not only common in FFEVF cases but also in a wide spectrum of familial focal epilepsies. FFEVF is characterized by various epileptic foci within the same family. Because of the specific clinical features that define this syndrome, more specifically its interfamilial phenotypic and genetic heterogeneity, FFEVF prevalence might be underestimated, especially in small families<sup>304,307</sup>. It is therefore impossible to rule out the diagnosis of FFEVF in the three small focal epilepsy families with DEPDC5 mutations described here. Finally, based on the families we studied here the penetrance of the DEPDC5 mutations appears to be very low, ranging from 45% to 67%.

The DEPDC5 gene encodes a 1603 amino acid protein of unknown function that is expressed in neurons throughout brain development. The protein has a DEP domain (Disheveled, Egl-10 and Pleckstrin domain) which is a globular protein domain of about 80 amino acids that is found in over 50 proteins involved in G-protein signaling pathways, as well as a DUF3608 domain. The function of the protein remains largely unknown, but recently Bar-Peled et al.<sup>311</sup> suggest that the protein could interact with the mTOR pathway, which plays a major role in cell growth. Further research is needed to see if a dysregulation in the mTOR pathway could be a pathogenic mechanism in focal epilepsies. In this study we identified a p.R843X protein-truncating mutation as well as a p.T864M missense mutation predicted to be damaging, in four families with partial epilepsy. Our results therefore support previously published studies suggesting that disruption of DEPDC5 function is implicated in the development of dominant focal epilepsies. Understanding the molecular mechanism by which mutated DEPDC5 leads to the pathogenesis of focal epilepsy constitutes an essential step toward improved diagnosis and prognosis of the disease, as well as a new therapeutic avenue targeting DEPDC5 or its related signaling pathways.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** P. C. and C. Ma. are supported by the Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQS) and the Savoy Foundation. This project is funded by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Genome Canada. We thank the patients and their relatives for participating in the study, and Ronald G. Lafrenière for editorial assistance with the manuscript. P. C. had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis

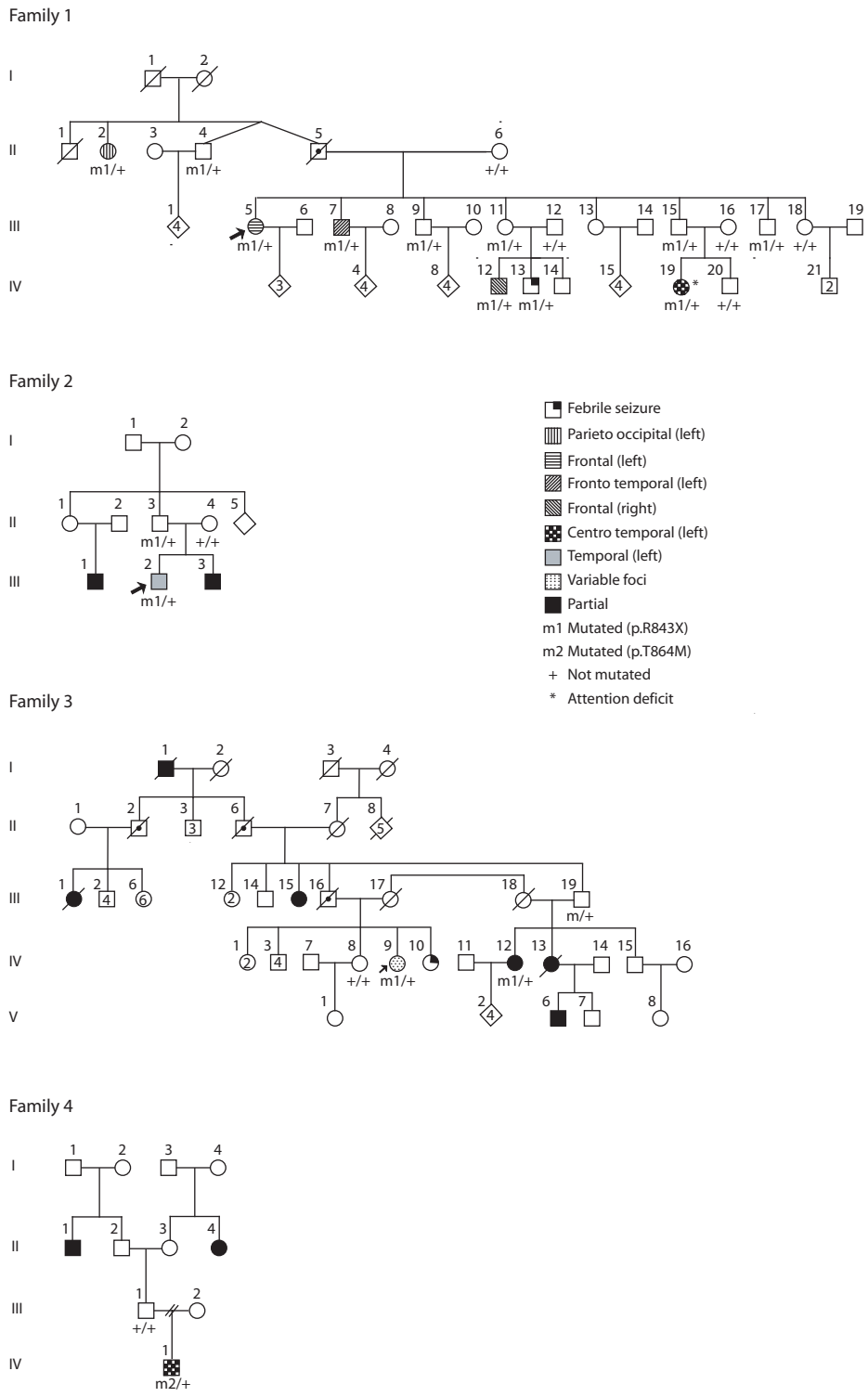
## 2.3.7 Tableaux et figures

**Tableau 2.3.7.1** Table 1. Clinical manifestations of *DEPDC5* mutation positive affected individuals

Family	ID	Age of onset	Mutation	Focus	Simple or Complex	Secondary generalized	Diurnal or nocturnal
1	II.2 (21274)	12	R843X	Left parieto-occipital	c	yes	n
1	III.5 (21047)	15	R843X	Left frontal	c	yes	n
1	III.7 (21036)	32	R843X	Left fronto-temporal	c	yes	n
1	IV.12 (21043)	10	R843X	Right frontal	c	yes	n
1	IV.19 (21039)*	5.5	R843X	Left centro-tempo	s	yes	d, n
2	III.2 (24798)	1.5	R843X	Left temporal	c	no	d, n
3	IV.9 (23636)	2	R843X	Variable foci	c	yes	d, n
3	IV.12 (24096)	8	R843X	n/a	c	yes	d, n
4	IV.1 (12507)	n/a	T864M	n/a	c	yes	n/a

\*attention deficit, c: complex, s: simple, n: nocturnal, d: diurnal, n/a: not available

**Figure 2.3.7.2 Figure 1. Pedigree of the families**



*Figure 1.* Pedigree of the families. Pedigree of families 1, 2 and 3: samples with the arrow were used for sequencing. The mutation p.R843X is carried by all affected individuals for whom DNA samples were available. Pedigree of family 4. The mutation is p.T864M.

**Figure 2.3.7.3** Figure 2. DEPDC5 mutations

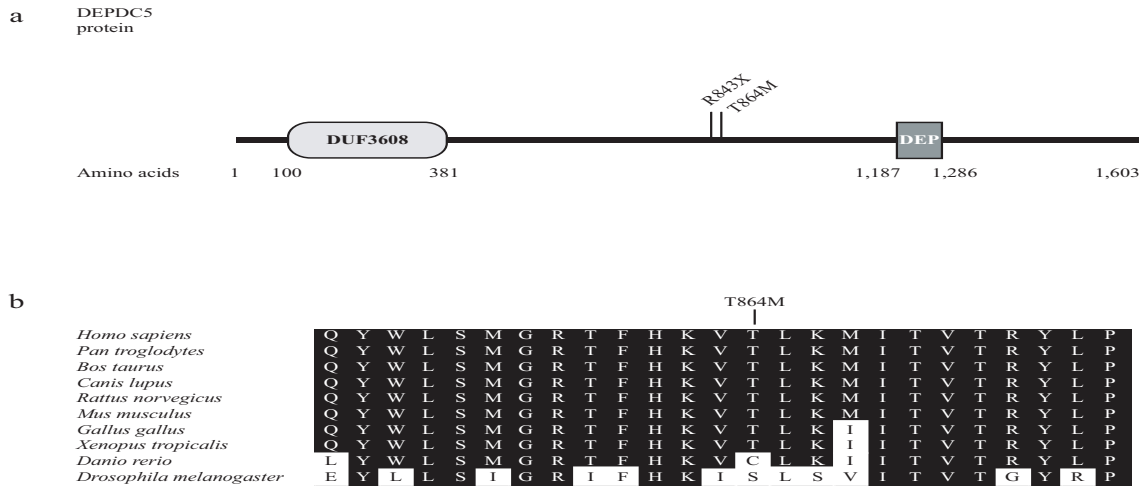
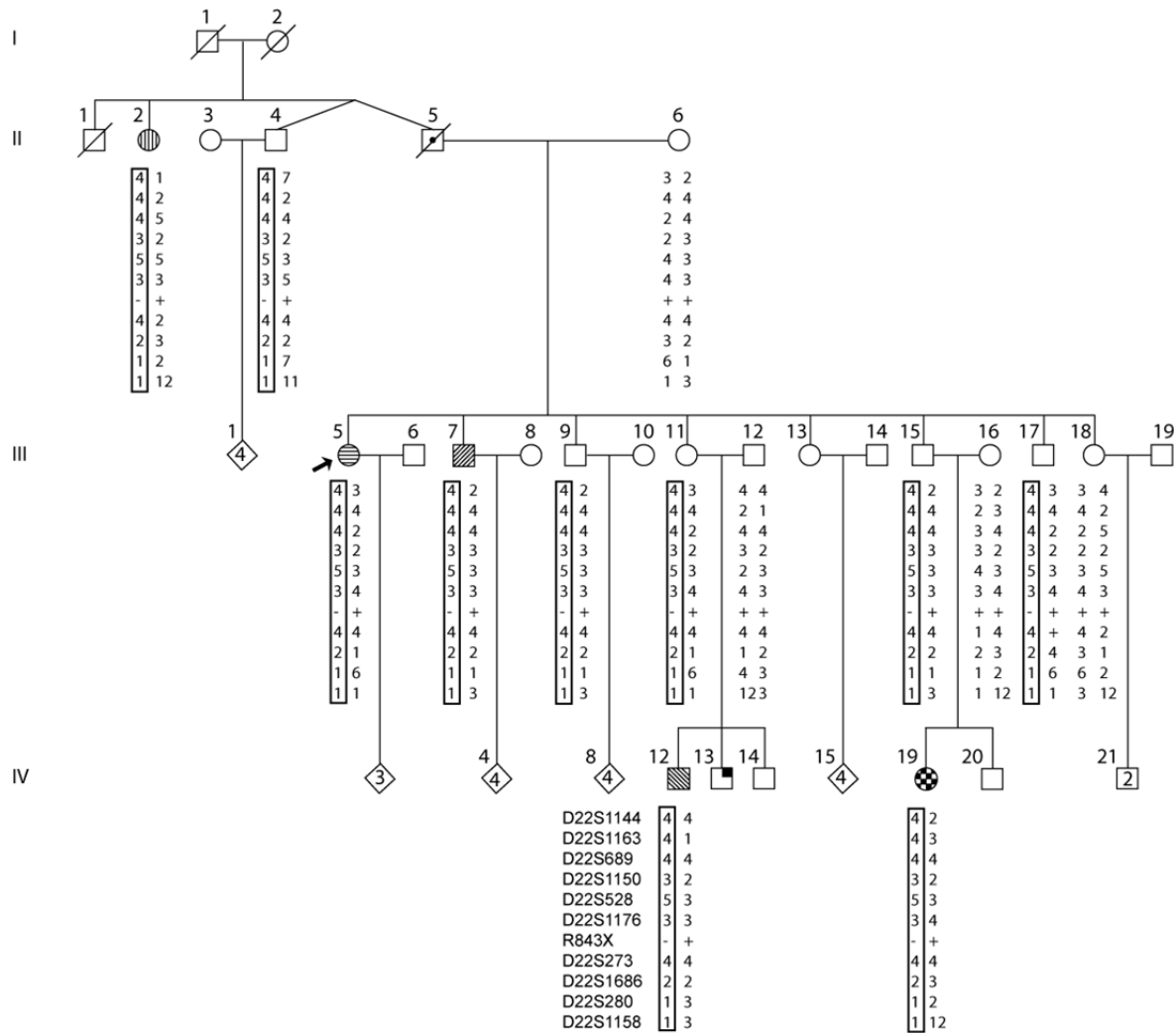


Figure 2. DEPDC5 mutations. (a) DEPDC5 protein with the positions of alterations indicated (NP\_001229825.1). (b) Multiple-protein alignment of DEPDC5 orthologs showing conservation of residues near threonine 864 in different species.

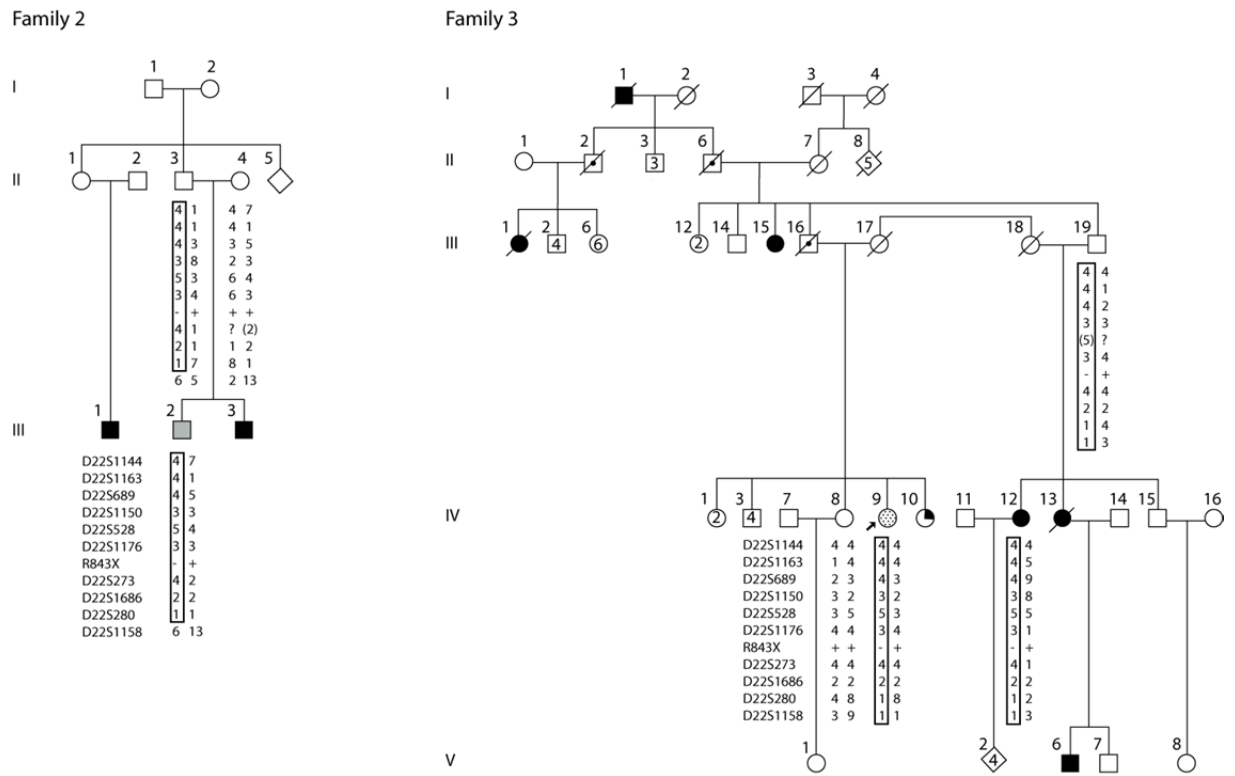
Figure 2.3.7.3 eFigure 1. Pedigree of family 1

Family 1



eFigure 1. Pedigree of family 1 with haplotypes on chromosome 22q11-q12. The disease-associated haplotype is boxed. The arrow indicates the proband. Inferred haplotypes are in parentheses.

**Figure 2.3.7.4 eFigure 2. Pedigrees of family 2 and 3**



eFigure 2. Pedigrees of family 2 and 3 with haplotypes on chromosome 22q11-q12. The disease-associated haplotype is boxed. The arrow indicates the proband. Inferred haplotypes are in parentheses.



## **Chapitre 3 : Description d'un nouveau modèle animal de sensibilité à la mort neuronale suite à un *status epilepticus*.**

### **3.1 Présentation de l'article**

L'épilepsie du lobe temporal avec sclérose de l'hippocampe (ÉLT-SH) est la forme d'épilepsie la plus commune et est associée à un haut niveau de pharmacorésistance. Il y a un grand intérêt dans la communauté scientifique et médicale pour comprendre les mécanismes moléculaires et physiologiques qui sous-tendent l'ÉLT-SH. Pourquoi certains individus développent-ils cette forme d'épilepsie suite à une insulte initiale? Quels sont les mécanismes moléculaires responsables de ce processus d'épileptogénèse? Ultimement, y aurait-il moyen d'empêcher ou de freiner l'évolution de cette maladie? Les modèles animaux, comme le rat, sont l'un des moyens les plus efficaces pour étudier ce phénomène et tenter de répondre à ces questions. Toutefois, les études précédentes ont démontré que les phénotypes variaient énormément selon les souches utilisées. De plus, jusqu'à ce jour, la majorité des souches de rats utilisés dans les différents modèles d'ÉLT-SH sont des rats non consanguins. Une approche expérimentale robuste dans l'étude de maladies complexes est l'utilisation de souches consanguines de rongeurs. En effet, ceux-ci, de par leur homogénéité génétique, facilitent la détection de locus et de gènes responsables des différents phénotypes observés. Ces animaux consanguins deviennent ainsi d'excellents outils pour la compréhension des mécanismes moléculaires responsables des différents traits génétiques et permettent également d'évaluer la composante environnementale associée à ces maladies.

Notre hypothèse de travail est que certaines souches de rats sont prédisposées à développer l'épilepsie du lobe temporal avec sclérose de l'hippocampe suite à une insulte initiale, tandis que d'autres pouvaient être résistantes et que cette susceptibilité est en grande partie d'origine génétique. Nous avons donc testé différentes souches de rats consanguins afin de vérifier leur sensibilité à développer l'ÉLT-SH suite à un *status epilepticus*.

### **3.2 Contribution des auteurs**

Planification de l'étude : C.Ma., M.P., L.C., et P.C.

Expérimentation animale : C.Ma., M.P., C.Me. et M.C.D.

Volet moléculaire et histologique: C.Ma., M.P. et C.Me.

Analyse et interprétation des résultats : C.Ma.

Écriture du manuscrit : C.Ma. et P.C.

### **3.3 *Galr1* expression level determines differential susceptibility to status epilepticus-induced cell death in Dahl and Lewis rat strains.**

Caroline Martin<sup>a</sup>, BSc; Marilyse Piché, MSc; Caroline Melochea, Maxime Cadieux-Dion, BSc; Lionel Carmant<sup>b</sup>, MD and Patrick Cossette<sup>a</sup>, MD, PhD.

<sup>a</sup>CHUM Research Center, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>b</sup>CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada.

*Article prêt à la soumission*

#### **3.3.1 Abstract**

Rodents are excellent models for studying temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis (TLE-HS) as they can mimic the evolution of the disease following an induced *status epilepticus* (SE). The clinical and pathophysiological manifestations differ between different strains of rats or mice, making it a challenge to pinpoint the molecular mechanism responsible for TLE-HS. In this study, we aimed at screening different strains of inbred rats to see if they differ in their susceptibility to induce *status epilepticus* cell death, as inbred rats are useful tools in the molecular studies of complex diseases. Dahl rats showed severe neuronal loss following SE induced by kainate acid, or continuous intra hippocampal electrical stimulation (CIHES). Lewis rats, on the other hand, were resistant to neuronal loss induced by SE. A congenic strain of rats (Dahl/Lew.Chr18b5) were also resistant to SE-induced cell death, demonstrating that a 20 Mb locus on chromosome 18, containing the *Galr1* gene, was

sufficient to protect against cell death. Decreased expression of *Galr1* suggests that this receptor is important in the susceptibility to seizure-induced cell death.

### **3.3.2 Introduction**

Temporal lobe epilepsy is the most common epilepsy syndrome affecting approximately 25% of all epileptic individual <sup>312</sup>. TLE is characterized by partial seizures with secondary generalizations. Seizures arise from the medial temporal lobe structures: the hippocampus, the amygdala or the parahippocampal gyrus. Pharmaco-resistance is observed in more than 25% of all TLE patients <sup>313</sup>. In these cases, neurosurgery is the treatment of choice in order to control the seizures. Although efficient, it is nonetheless an invasive treatment.

Hippocampal sclerosis (HS) is one of the major pathogenic features of drug-resistant temporal lobe epilepsy. HS is characterized by 1) pyramidal neuronal loss and degeneration in the CA1 and the CA3 of the hippocampus, CA2 usually being spared, 2) increase glial reaction or gliosis, and 3) reorganization of neuronal networks (sprouting) <sup>157,163,314</sup>. The use of animal models for studying temporal lobe epilepsy with HS is critical for the understanding of TLE as the mechanisms underlying epileptogenesis and HS cannot be fully investigated by clinical studies. Using electrical stimulations or chemoconvulsants like kainic acid (KA) or pilocarpine, rodents can mimic TLE <sup>202,224,225</sup>. After the initial insult, or SE, a latent period is observed, followed by recurrent spontaneous seizures. Most importantly, histopathological features observed in these models correlate well with hippocampal sclerosis found in human surgical specimen <sup>202</sup>.

From the previous humans and animal studies, it remains undetermined whether hippocampal cell death is caused by seizures or if it is the cell loss that participates in the development and recurrence of seizures<sup>314</sup>. The use of inbred or transgenic rodent strains is useful not only to pinpoint the molecular processes of epileptogenesis, but also to demonstrate the genetic contribution underlying the development of HS. It is known that inbred mouse strains differ in their sensitivity to cell death induced by SE<sup>217,237</sup>. Using cross-breeding between a resistant (C57BL/6) and a sensitive (FVB/N) strains of mice, different loci were determined for the sensitivity to SE induced cell death<sup>240,241</sup>. Galanin receptor 1 gene (*GalR1*), found on the chromosome 18 locus, was differentially expressed between those two murine strains and is believed to underlie this genetic predisposition since galanin is a neuropeptide known to have a protective effect on excitotoxic induced cell-death<sup>242,315</sup>.

So far, no systematic screening of inbred rat strains had been done to determine their sensitivity to the development of HS in the TLE model. The rat is larger, well characterized, and closer to humans physiologically<sup>316</sup>. For those reasons, rats are largely used as models of epilepsy and development of new antiepileptic drugs<sup>201</sup>. Therefore, discovering new inbred rats model for the study of TLE and HS is of great interest.

In this study, we examined the sensitivity to cell death in four inbred strains (Dahl, Lewis, Brown-Norway and SHR) of inbred rats following KA-induced SE. This strain revealed that Dahl was sensitive to cell death while Lewis was resistant even though there was no difference in the number of recurrent seizures. These observations were confirmed by using SE induced by continuous intra-hippocampal electrical stimulation (CIHES). Using a congenic strain of rats (Dahl/Lew.Chr18b5), we confirmed that the gene locus on chromosome 18 and decreased

expression of *GalRI* correlated with the sensitivity to excitotoxic cell death in the Dahl strain. Overall, these results suggest that decreased expression *GalRI* is an important contributor to the genetic susceptibility of neuronal death following SE in rats, which is a main component of hippocampal sclerosis.

### **3.3.4 Materials and methods**

#### *Animals:*

Spontaneous hypertensive rats (SHR), Brown-Norway (BN), Dahl and Lewis male rats were purchased from Charles Rivers Laboratory at 60 days old. Rats were housed in standard animal cages with littermates in a 12h light/dark cycle for 48h prior to experiment. Food and water were provided *ad libitum*. Dahl/Lew.Chr18b5 rats were kindly gifted by Dr. Allen Deng from the Centre de recherche du CHUM, Montréal, Canada, and afterwards bred by our team at the same facility. This congenic strain comes from the introgression of a 20 Mb region of the chromosome 18 of the Lewis strain into the Dahl background.

During EEG recording and CIHES, rats were transferred to custom Plexiglas cages that allowed them to move freely yet connected via wires to the EEG system. All animals involving procedures were approved and performed in accordance with the Canadian Council of Animal Care (CCAC).

*KA protocol:*

KA was dissolved in PBS 1X buffer and administered intraperitoneally. Animals were weighed and injected twice with doses ranging between 5.0 and 8.0 mg/kg at 60-minute intervals. This dose-response study aimed to define the seizure threshold, time of onset, and duration of the SE as well as the mortality rate for each strain (Dahl, Lewis, BN, and SHR). *Status epilepticus* was defined as continuous stage 4 or 5 seizures that lasted for at least 1 hour. Seizures were scored according to a modified version of the Racine's scale. The stages are as follows: 1) "wet-dog shakes" or isolated jerks, 2) staring and immobility, or electrical seizures in EEG recordings, 3) forelimb clonus, 4) rearing, 5) rearing and falling, and 6) intense and uncontrollable bouncing (popcorn). All animals were monitored for up to 8 hours after the onset of the seizures. Animals that went to stage 6 seizures were euthanized for ethical reasons. To ensure that the animals were protected from self-harm during seizures, cages were padded with cotton towels during the experiment.

To see if there was a difference in the dose to achieve SE and in the latency to SE, one-way ANOVA followed by a post-hoc test was conducted. Difference in the mortality rate between the four strains was tested by an exact Fisher's test. As Dahl and Lewis had the same seizure threshold, latency to seizure and mortality rates, further experiments were conducted only in those strains. A dose of 2 X 8 mg/kg was selected as the optimal dose. If the status lasted for more than 3 hours, seizures were stopped with a 2% isoflurane induction for 10-15 minutes to ease recovery. Fluids, treats, and diet gel were given to the animal twice daily to ensure recovery from the procedure. Rats were euthanized 24 hours, 7 days, or 30 days after SE to look at the evolution of neuronal loss. To test the implication of chromosome 18 in the

susceptibility to SE induced cell death, another set of KA experiment was conducted on the congenic strain Dahl/Lew.Chr18b5 using the same KA dose and protocol (n=6). Rats were sacrificed 30 days after SE to ensure neuronal loss was visible if present.

*EEG-video recording of spontaneous recurrent seizures:*

In order to assess the severity and frequency of recurrent seizures in both Dahl and Lewis rats KA-induced SE, another group of animals was EEG-video monitored for 30 days after SE. Rats from both strains (n=6) were implanted with bipolar stainless EEG electrodes (Plastics-1 Inc., Roanoke, VA, USA) in the right hippocampus and in the overlying cortex. Animals (P50) were anesthetized with isoflurane and placed on a stereotaxic table. One contact of the electrode was shortened at 1 mm so it could remain in the cortex. Stereotaxic coordinates with reference to Bregma were: AP=-3.7, ML=+2.4 and DV=-3.5. A second electrode, used as a ground, was wrapped around a screw and secured in the cranial bone over the cerebellum. Additional screws were placed on the cranial bones and dental cement was used to make sure that both electrodes were fixed. After a recovery period of 7 to 10 days, animals were connected to a 32-channel video-EEG recording system (Stellate Systems). Recording started 2 hours prior to KA injection for baseline. Rats were monitored for the whole SE and then, twice per day, for 4-hour sessions (day and night) during 30 days. EEG recordings were analyzed by a blind observer. All spontaneous recurrent seizures were noted and rated according to our modified version of the Racine's scale. The average number of seizures and their durations were extrapolated from the 4-hour session to 12 hours duration (day and night).

*CIHES protocol:*



To confirm our results obtained from KA-induced SE, we sought to use a non-pharmacological method of SE induction. For this purpose, a continuous intra-hippocampal electrical stimulation (CIHES) protocol adapted for Lothman *et al.*<sup>227</sup> was used. Animals from both strains (n=5-8) were anesthetized with isoflurane and placed on a stereotaxic table. Polyamide covered stainless steel bipolar electrodes (Plastics 1) were inserted in both ventral hippocampi at the following stereotaxic coordinates with reference to bregma: AP= -5.3; ML=  $\pm 4.9$ ; DV= -5.0. As previously described, a ground electrode was wrapped around a screw secured in the cranial bone. Animals were left to recover for a period of 7 to 10 days before experiments.

To ensure that the electrodes were inserted in the hippocampus, after discharge (AD) was induced using a 50 Hz biphasic square-wave pulse for 2 seconds. Stimulation began at 25 $\mu$ A and was increased every ten minutes by 25 $\mu$ A until an AD of at least 8 seconds was observed. If no response was measured at 200 $\mu$ A, the electrode was excluded for the continuous stimulation. The after discharge threshold (ADT) was defined as the amperage necessary to induce an AD of at least 10 seconds. Results are shown as mean  $\pm$  SEM. Twenty-four hours later the animal received a 90 minutes CIHES to induced SE. Only one electrode was used for stimulation, but both were used to monitor EEG afterwards. The stimulation consisted of a biphasic 50 Hz, 1ms pulse width at 400 $\mu$ A. If an animal was not in continuous stage 4 or 5 after the first 15 minutes stimulation, amperage was increased in the following order: 400, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 10000 $\mu$ A. An unpaired t-test was conducted on the average amperage to achieve SE. Animals that did not achieve SE were excluded from the analysis. As in the KA model, SE was stopped by isoflurane if it lasted more than 3 hours.

### *Tissue preparation and histological staining:*

At 24 hours, 7 days, and 30 days after the KA injection, rats from the Dahl and the Lewis strain were sacrificed by decapitation (n=4/strain/time-point). Dahl/Lew.Ch18b5 (n=6) were also killed by decapitation 30 days after the SE. Brains were quickly removed on ice by dissection and were immediately post-fixed overnight in 4% paraformaldehyde. Brains were then transferred in PBS 1X until histological processing. The same procedures were carried out on control rats (n=4/strain). Thirty days after CIHES induced SE, rats from each strain (n=4-6) were anesthetized with isoflurane and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde 0.1M phosphate buffer and transferred in PBS 1X buffer until histological processing. Brains were sliced on a VT 1200S vibratome (Leica) at 40 $\mu$ m. Every sixth section was mounted on Superfrost Plus microscope slides (Fisher Scientific) and stained with cresyl violet to assess neuronal loss.

### *Neuronal loss assessment*

The extent of neuronal loss in the hippocampus was visually estimated by a blind observer. Damage score was assigned as follows: grade 0, no cell death; grade 1, <25% cell death; grade 2, 25% to 50% cell death; grade 3, 50% to 75% cell death; grade 4, 75% to 100% cell death. The five main regions of the hippocampus that were scored are the CA1, CA2, CA3, CA4 and dentate gyrus. More specifically, every sixth sections from the dorsal, medial and frontal regions of the brain were analyzed and averaged. To estimate the percentage of neuronal loss, sections were compared to a control section of the same rat strain. Neurons density in each regions of the hippocampus was assessed using a total magnification of 200x. In both the KA

model and the CIHES model, there was no significant difference between the two hemispheres, therefore, results were combined and averaged. The results are shown as % of rats exhibiting severe neuronal loss (grade 3 or 4), only for each affected regions of the hippocampus (CA1, CA3 and CA4).

*mRNA expression level:*

For these expression experiments, basal mRNA levels were measured in control rats for Dahl (n=8) and Lewis strains (n=8). RNA was extracted from the hippocampus using Trizol reagent following manufacturer's instruction. Total RNA was then purified with Qiagen RNeasy MiniKit (Qiagen, USA). Quality and quantity were assessed by electrophoresis and spectrophotometry (Ultrospec Plus spectrophotometer, Pharmacia). First-strand cDNA was synthesized from 500 ng hippocampal RNA using random decamers with Thermoscript III (Invitrogen, Life technologies). The expression level for *GalR1* was measured by qRT-PCR using pre-designed Taqman Assays (Rn02132426\_s1; Applied Biosystems). The abundantly expressed endogenous gene, *Beta-2 microglobulin* (Rn00560865\_m1; Applied Biosystem), was used for normalization. qRT-PCRs were carried out in triplicate on the Applied Biosystem 7900 HT Real-time PCR system according to the manufacturer's instructions. Relative mRNA expression levels, as compared with the Lewis rats, were calculated using the comparative Ct method ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Statistical significance was determined using a T-test from a linear model. A P-value <0.05 was used as the threshold for statistical significance.

### *GalR1 genomic sequencing:*

The complete open reading frame of *GalR1* as well as the 3000 bp promoter region was sequenced in Dahl and Lewis rats. DNA was extracted from whole blood using 5 Prime kit following the manufacturer's protocol (Gaithersburg, USA). Primers were designed at least 50 bp from the exon-intron boundaries. Primers for the promoter regions overlapped to ensure complete sequencing (primer sequences upon request). PCR primers were designed using Exon primer software using the NM\_012958.2 sequence. The amplicons were run on the ABI3730 automatic sequencer (Applied Biosystems) and analyzed by Mutation Surveyor software version 3.0.

### **3.3.5 Results**

#### *Strain survey KA:*

After systemic injection of KA, rats were monitored for optimal dose to induce SE, latency to SE, as well as survival rates (Table 1). Dahl and Lewis rats exhibited SE with the same and constant dose of 16 mg/kg  $\pm$  0. This dose was significantly higher than the dose to achieve SE in Brown-Norway ( $12 \pm 3.46$ ) and SHR ( $15 \pm 5.50$ ) ( $p < 0.001$ ). Only 3 Brown-Norway achieved SE. Therefore, limited data were collected for that strain. There was no significant difference in the latency to SE between all strains ( $p = 0.7629$ ). As for survival, both Dahl and Lewis exhibit high survival rates. One rat from each strain did not survive because of severe SE (stage 6) and were humanely euthanized. Therefore, no significant difference was observed in the mortality between these two strains ( $p = 0.5761$ ). All 3 Brown-Norway rats also survived. As for SHR, 11/12 rats died shortly after beginning SE. Because SE was hard to achieve with

Brown Norway, and as the majority of SHR did not survive the SE, the following experiments were not conducted on those two strains.

*Neuronal cell death in the KA model:*

Neuronal cell death was assessed in Dahl and Lewis as they both had similar SE with the same KA dose. Nissl stained sections showed that 100% of Dahl rats exhibited severe excitotoxic cell loss (grade 3 or 4) in either the CA3 or the CA4, at each time point post-SE (Fig. 1A and 2A-C)., A third of Dahl rats exhibited severe neuronal loss in the CA1 region at 7 days post-SE (fig. 2b). In contrast, only half of the Lewis rats showed severe neuronal loss in the CA4, at 7 days post-SE. CA2 and dentate gyrus remained intact in both Lewis and Dahl.

*Recurrent seizures:*

Recurrent seizures are characteristic of the TLE model. To determine if there was a difference in the number and intensity of recurrent seizures in both Dahl and Lewis strains. Video-EEG monitoring was recorded for up to 30 days following KA injections. Only stages 1 to 2 seizures were seen in both strains. Video-EEG recording allowed a more precise evaluation and count of the seizures. Electrical seizures, which were often accompanied by starring behavior, were more easily detected (Fig. 3). No difference was observed in the amount of stage 1 seizures and in the minutes a day spent in stage 2 seizures between the two strains either in the daytime or the nighttimes (Fig. 4 A-B).

### *CIHES:*

In order to confirm the new model of genetic sensitivity to neuronal death in the Dahl strain, a second method of SE induction was tested. This aimed to exclude that the results were only caused by a pharmacological effect to kainate acid rather than SE itself. Previous to the SE induction, ADT was tested. Dahl had a consistent average ADT of  $25 \pm 0$  while Lewis had an ADT of  $35.71 \pm 10.71$  (fig. 5a) which was not significantly different from each other ( $p=0.33$ ). To achieve SE, Dahl rats were stimulated at consistent amperage of  $400\mu\text{A}$  while Lewis rats needed an average of  $2671.43 \pm 1378.18\mu\text{A}$  continuous electrical stimulation (fig. 5b). Even though Lewis seemed to need a higher amperage to induce SE, variability within the strain did not result in a statistical difference ( $p=0.1$ ). Once in SE, no difference was observed in the intensity of the seizures.

### *Neuronal cell death in the CIHES model:*

Rats from both strains were kept for 30 days following SE induced by CIHES and later assessed for neuronal cell death. The pattern of the lesion was different from the KA model as CA1 was also highly affected with neuronal loss. 42.8% of the Dahl rats exhibited severe neuronal loss in the CA1. CA3 and 4 remained highly affected with respectively 28.6 and 57.1% of Dahl showing severe neuronal cell death. In comparison to the KA model, neuronal loss has not been observed in all Dahl rats. Nonetheless, it remained significantly higher than in the Lewis strain, as no Lewis rats showed severe neuronal loss in any region of the hippocampus (Fig. 1B)

*Dahl/Lew.Chr18b5 congenic strain:*

It is known that mice differ in their sensitivity to SE-induced cell death, and that a quantitative trait locus (QTL) has been mapped to chromosome 18<sup>237,240</sup>. In order to test the hypothesis that a homologous region on chromosome 18 in our rats was also implicated in the phenotype, a congenic strain was tested. Dahl/Lew.Chr18b5 has a Dahl background with the introgression of a 20 MB chromosome 18 region of the Lewis strain. This 18b5 region encompasses 25 genes, including *GalR1* (figure 6), the gene that is suspected to mediate the protection from seizures induced neuronal death in the mice. Neuronal loss assessment following SE in this congenic strain confirms the implication of the 18b5 locus in the susceptibility to seizure-induced cell death in our model. Indeed, there was none or only mild neuronal loss (grade 0 or 1) in the congenic rats at 30 days following SE (Fig. 1C). Hippocampal injury of the Dahl/Lew.Chr18b5 was thus not significantly different from the Lewis strain suggesting that the Chr18b5 locus encompasses the susceptibility gene for SE-induced HS..

*GalR1 expression:*

*GalR1* has been reported to confer protective effect from seizure-induced cell death in the mice model. As the gene is in the 18b5 locus, we hypothesized that variation in the *GalR1* expression might also determine susceptibility to KA-induced cell death in the rats. We used quantitative real-time PCR (qRT-PCR) to measure the basal hippocampal transcript abundances of *GalR1*. We found that the gene was significantly less expressed in the Dahl compared to the Lewis strain (Fig. 7). Consistent with this observation, we found no significant difference in the level of expression of the gene between the Lewis and the

Dahl/Lew.Ch18b5 suggesting that decreased *Galr1* expression is indeed associated with the phenotype.

*GalR1 sequencing:*

As decreased *GalR1* expression was found to be associated with the susceptibility to KA induced cell death, we sequenced the gene in Dahl and Lewis to search for genetic variations. No variation was found in the coding region of the gene nor in the promoter region. Variation in the *GalR1* expression is therefore not a consequence of a genetic mutation within the gene.

### **3.3.6 Discussion**

This study shows that SE-induced cell death differs significantly in common inbred strains of rats. BN rats showed inconsistency in their reaction to KA, whereas SH showed high mortality rates following KA induced SE. Therefore, we could not assess the neuronal death in these strains. SHR rats have been previously used by other research groups with the KA model<sup>317,318</sup>. Surprisingly, no groups reported high mortality rates following SE induction. This difference may be because animals come from different breeders. Dahl rats showed severe neuronal loss in the hippocampus, while Lewis rats were practically invulnerable to KA induced cell death. This all or none phenomenon suggest that the difference SE-induced neuronal death is entirely due to the genetic background. More detailed characterization of this new HS model provides a unique opportunity to investigate the molecular basis underlying neuronal cell death and hippocampal sclerosis.



TLE with HS, in humans, is associated with intractable recurrent seizures. It is unknown what role the pathology plays in the recurrence of seizures. In order to test if an increase neuronal loss was associated with increase occurrence of spontaneous recurrent seizures, EEG-video recording was performed for 30 days after SE. There was no difference in the recurrence of seizures between the two strains. The seizures were also of mild intensity. In fact, only stages 1 and 2 seizures were observed. This result could mean two things: 1) our new model is specific to seizure induced cell death sensitivity, or 2) the development of more severe recurrent seizures could occur after a longer latent period. In fact, some researchers have shown that recurrent seizures can occur in the first month, but sometimes up to 10 months after the initial insult<sup>319–321</sup>. Therefore, longer periods of analysis could eventually help to address this question.

A second method of SE induction was carried out in order to see if the differential sensitivity to seizure induced cell death was a consequence of the SE itself, or rather a pharmacological sensitivity to KA. Sensitivity to the electrical stimulation was not significantly different between the two strains. Lewis rats needed higher amperage to induce *status epilepticus* than Dahl rats, but the difference was not statistically different due to high variation within the strains. Nonetheless, once the seizures had started, there was no behavioral difference between the two strains. The severity of the seizure-related pathology was similar to that observed in the KA model. Even though the affected subfields were different from the KA model, Dahl rats remain sensitive to seizure induced cell death and Lewis rats remains resistant. In

conclusion, this striking difference in SE-induced neuronal death between Dahl and Lewis rats makes an excellent model to study the molecular basis underlying excitotoxic cell death.

The results from this study are consistent with previous investigations showing that susceptibility to seizure induced cell death was genetically determined in the murine model<sup>217,237,322,323</sup>. Schauwecker et al. (1997) showed that C57BL/6 were resistant to neuronal loss as compared to the FVB/N mice. Using congenic strains of mice, they showed that a locus on chromosome 18 was associated with the differential sensitivity to excitotoxic cell death<sup>240</sup>. They investigated the genes located on the locus and showed that *GalR1* was differentially expressed between their two strains<sup>242</sup>. They later confirmed its role in the pathogenesis using transgenic mice that exhibited lower *GalR1* expression (Schauwecker, 2010). Surprisingly, we were able to determine that the homologous region on chromosome 18 containing *GalR1* was also a significant factor in the sensitivity to excitotoxic cell death in the Dahl strain. Using a congenic strain of rats (Dahl/lew.Chr18b5) that contained the same homologous region as the murine locus, we confirmed the importance of chromosome 18 in the sensitivity to seizure induced cell death.

In order to better understand the underlying mechanism responsible for the different sensitivity in our model, the implication of *GalR1* was also tested. Our results were consistent with those of Schauwecker, therefore highly suggesting the importance of the galaninergic system in the susceptibility to excitotoxic cell death. Basal mRNA levels of *Galr1* were close to 4 times the expression in the Lewis strain as compared to the Dahl. Many studies have shown that galanin

is a neuropeptide that has both neuroprotective and anticonvulsant effects, mainly by inhibiting the release of glutamate at the presynaptic terminals<sup>315,324–327</sup>. A de novo mutation in *GalR1* has recently been found in one pair of twins with temporal lobe epilepsy, confirming the importance of the galaninergic system in the disease<sup>132</sup>. The sequences of the exons, the UTR regions as well as the promoter of *GalR1* were analyzed, but there was no genetic variation in either strain. The genetic cause underlying the downregulation of *Galr1* in the Dahl strain is yet to be determined: *GalR1* gene could be regulated by a second gene within the locus, a variation in non-coding regions or an upstream mechanism influenced by the Chr18b5 locus. As the introgression of the latter locus from the resistant strain into the susceptible strain is sufficient to reverse both the neuronal death and the level of expression of *GalR1* phenotypes, we can hypothesize that the genetic mechanisms will likely be discovered within this locus. Further genetic analysis will be necessary to pinpoint the exact mechanism responsible for the differential expression of *GalR1*.

In the past several decades, there has been a great interest in the conception and testing of different pharmacological compound that target the galaninergic system. Agonists of the galanin receptor were first tested in the mid 2000's and showed promising results in the rat and mice model<sup>324,325,328</sup>. Unfortunately, as galanin is implicated in a wide variety of physiological processes, too many side effects were expected in humans. Synthetic agonists of galanin with optimized bioavailability or with the use of allosteric modulators were tested in animal models<sup>329–331</sup>. Results were promising, but unfortunately to this date, these findings have yet to be proven as efficient in human<sup>332</sup>. However, the identification of *GalR1* as an

important mechanism in both murine and rat models of HS, as well as the discovery of pathogenic mutations in human TLE reinforces the importance of galaninergic system in the pathophysiology of the disease<sup>132</sup>.

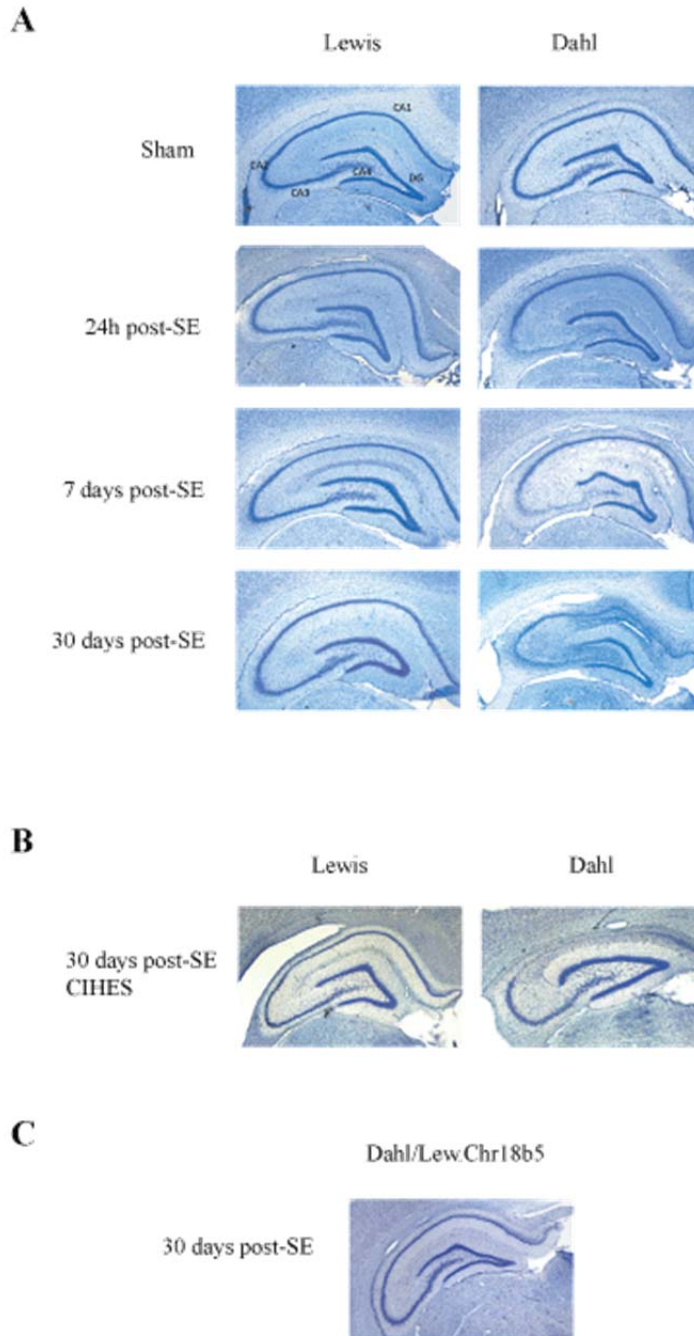
In summary, the present study showed that the Dahl strain of rats is more sensitive to seizure induced cell death as compared to the Lewis strain, whether the seizures are induced by KA administration, or IHES. Our results also suggest, similarly to mice, that this difference is due to a decreased expression of *Galr1*. We believe that the use of the Dahl and Lewis inbred strains in future studies will help to decipher the molecular pathway responsible for the sensitivity of excitotoxic cell-death and seizure susceptibility.

### 3.3.7 Tables and figures

**Tableau 3.3.7.1** Table 1. Strain survey for sensitivity to SE following KA injections.

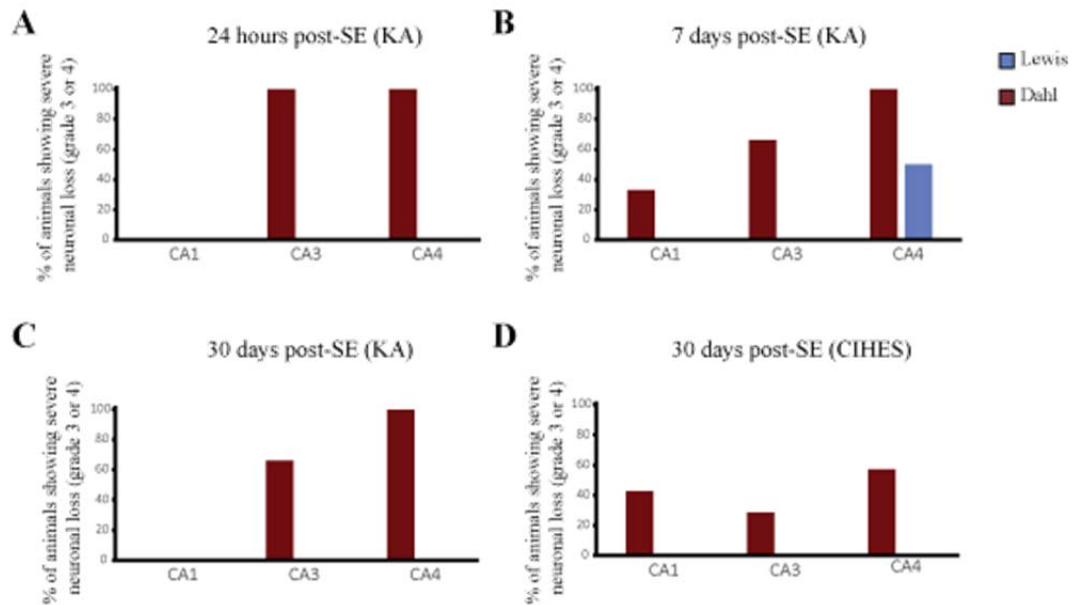
Strain	Minimal dose to SE (mg/kg)	Latency to SE (min)	Mortality rate following SE (%)
<b>BN (n=3)</b>	12.00 ± 3.46	107.33 ± 30.99	0
<b>SHR (n=12)</b>	13.50 ± 2.714	113 ± 40.63	91.6
<b>Lewis (n=11)</b>	16.00 ± 0	125.45 ± 22.57	18.2
<b>Dahl (n=13)</b>	16.00 ± 0	112.31 ± 40.64	7.9

**Figure 3.3.7.2** Figure 1. Different sensitivity to SE induced cell-death.



*Figure 1.* Different sensitivity to SE induced cell death. **A)** Cresyl-violet staining of horizontal sections of Lewis and Dahl rats at 24 hours, 7 days, and 30 days after KA-induced SE. Lesions occurred as soon as 24 hours after the insult, and is present mainly in the CA1, CA3, and CA4 regions. **B)** Cresyl-violet stained sections from Lewis and Dahl rats 30 days after CIHES-induced SE. **C)** Cresyl-violet stained section from the congenic strain Dahl/Lew.Chr18b5 30 days after KA-induced SE showed no lesion.

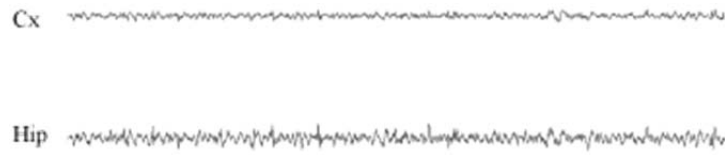
**Figure 3.3.7.3** Figure 2. Percentage of rats exhibiting severe neuronal cell death



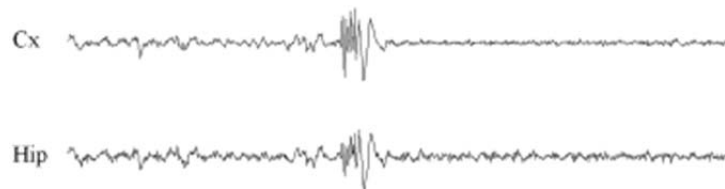
*Figure 2.* Percentage of rats exhibiting severe neuronal cell death in the CA1, CA3, and CA4 hippocampal brain regions. **A)** Results for rats 24 hours after KA induced SE. **B)** Results for rats 7 days after KA induced SE. **C)** Results for rats 30 days after KA induced SE. **D)** Results for rats 30 days after CIHES induced SE. Results from the Dahl/Lew.Ch18b5 rats are not shown as no individual showed any severe neuronal loss. Difference between the two strains is statistically different ( $p < 0.0001$ ) for all regions at every time point (T-test).

**Figure 3.3.7.4** Figure 3. Representative EEG recording

**A. Baseline**



**B. Wet-Dog Shake (stage 1)**



**C. Electrical seizure (stage 2)**



**D. Status epilepticus (stage 4)**

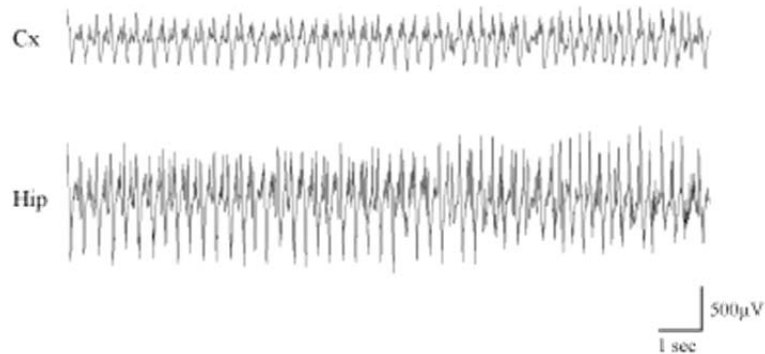
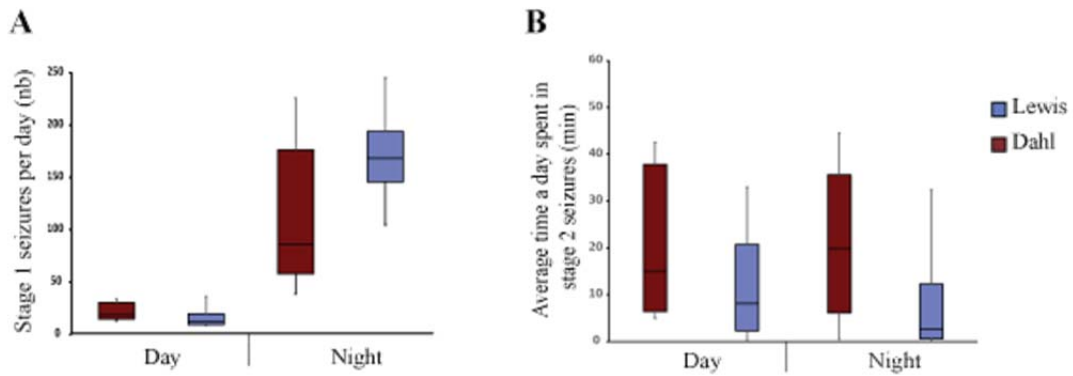


Figure 3. Representative EEG recording for **A)** baseline, **B)** typical WDS seizure, **C)** electrical seizure, **D)** continuous *status epilepticus*.



**Figure 3.3.7.5** Figure 4. Analysis of recurrent seizures in both Lewis and Dahl rats during the day and night.



*Figure 4.* Analysis of the recurrent seizures in both Lewis and Dahl rats during the day and night. A) Average number of stage 1 seizures. B) Average time a day spent in stage 2 seizures (min). Unpaired *T*-test analysis revealed no statistical difference in the amount and duration of recurrent seizures between Dahl and Lewis rats.

**Figure 3.3.7.6** Figure 5. Results from the continuous intra hippocampal stimulation.

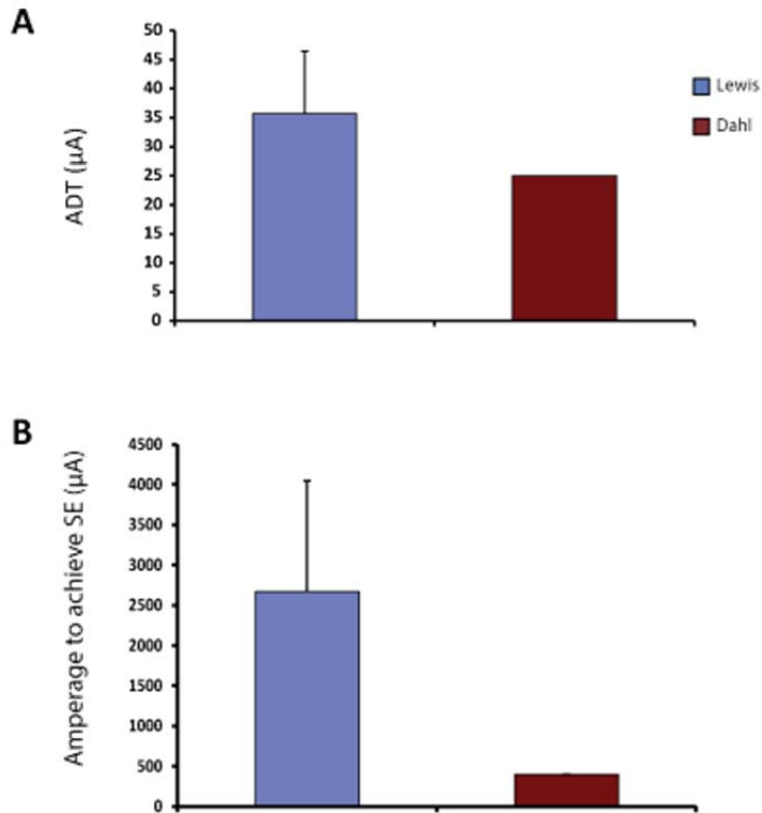
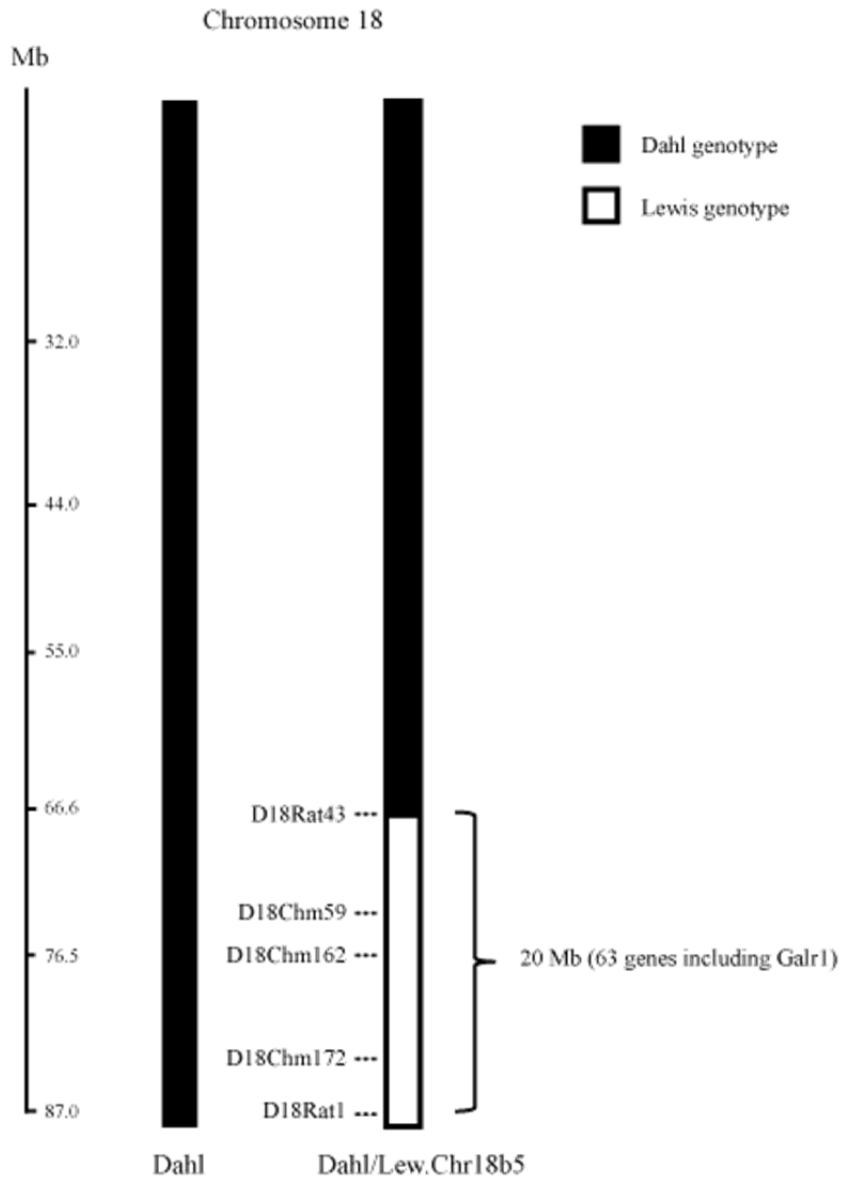


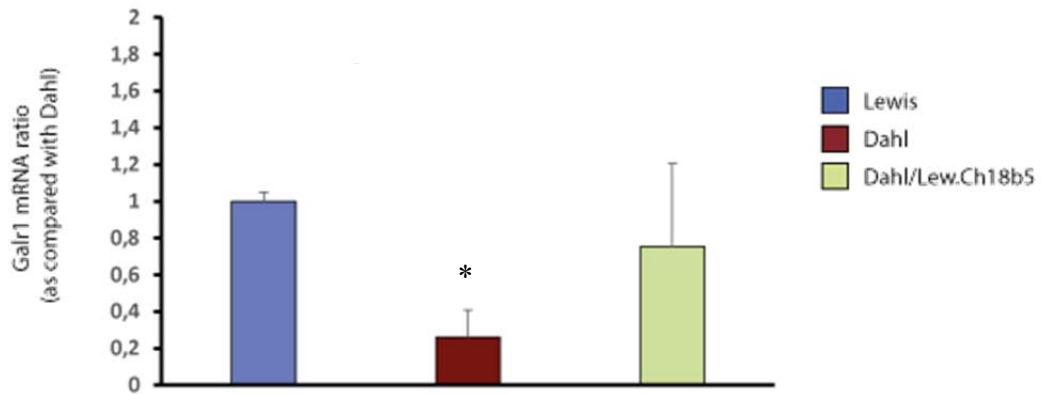
Figure 5. Results from the continuous intra hippocampal stimulation. **A)** After-discharge threshold presented as mean  $\pm$  SEM showed no significant difference ( $p=0.33$ ). **B)** Average amperage ( $\mu\text{A}$ ) needed to achieve SE showed as mean  $\pm$  SEM showed no significant difference (Unpaired  $T$ -test;  $p=0.1$ ).

**Figure 3.3.7.7** Figure 6. Position of the Ch.18b5 segment that contains Galr1 and that is responsible for the protection against SE-induced cell death.



*Figure 6.* Position of the Ch.18b5 segment that contains Galr1 and that is responsible for the protection against SE-induced cell death.

**Figure 3.3.7.8** Figure 7. *Galr1* expression pattern in hippocampal tissues from Dahl, Lewis and Dahl/lew.Chr18b5.



*Figure 7.* Basal *Galr1* expression pattern in hippocampal tissues from Dahl, Lewis and Dalh/Lew.Chr18b5 rats (n=8). The expression levels were normalized to beta-2 microglobulin transcripts levels (Ct methods followed by T-test from linear model; \* p<0.05).

## **Chapitre 4. Caractérisation d'un nouveau modèle animal de mort subite et inexplicée de l'épilepsie (MSIÉ).**

### **4.1 Présentation du chapitre**

Dans le cadre de notre précédente étude sur la sensibilité à la mort neuronale chez des souches de rats consanguins, nous avons fait la découverte fortuite que les rats SHR avaient un taux de décès très élevé dès le début des crises induites par l'injection d'acide kaïnique. La mort subite et inexplicée de l'épilepsie est une problématique importante dans la communauté médicale et scientifique et nous avons entrepris de pousser plus loin notre investigation afin de déterminer si le rat SHR serait un bon modèle animal de MSIÉ. Bien que les résultats présentés dans ce chapitre soient préliminaires, ils suggèrent que le SHR est effectivement un excellent modèle animal consanguin de MSIÉ, et qu'une combinaison entre une dysfonction cardiaque et respiratoire serait en cause dans le décès induit par les crises prolongées.

### **4.2 Liste et contributions des collaborateurs**

Caroline Martin, B.Sc., Marilyse Piché, M.Sc., Florence Martin, Sonia Kajla, Sylvain Trahan, MD, Patrick Cossette, MD. PhD.

Planification de l'étude : C.Ma., M.P., et P.C.

Expérimentation animale : C.Ma., M.P., S.K. et F.M.

Analyse histologique: S.T.

Analyse et interprétation des résultats : C.Ma. et S.T.

### 4.3 Contexte et rationnels

L'épilepsie est l'une des maladies neurologiques les plus fréquentes. En raison de l'offre grandissante de traitements pharmacologiques, l'épilepsie est maintenant perçue comme une maladie bénigne. En effet, plusieurs formes d'épilepsie se contrôlent de nos jours assez efficacement grâce à la prise de médicaments. Toutefois, il est important de se rappeler que le taux de mortalité chez les patients épileptiques est de deux à trois fois plus élevé que dans la population générale<sup>333-335</sup>. Une des causes de ces décès est la mort subite et inexpliquée de l'épilepsie (MSIÉ). La MSIÉ est un terme utilisé lorsqu'un patient épileptique meurt soudainement de cause inconnue. Ce phénomène est responsable de 15 % des décès chez tous les patients épileptiques, et ce taux augmente à 50 % chez ceux qui sont pharmacorésistants<sup>8,9</sup>.

Plusieurs facteurs de risques sont associés à la MSIÉ. En effet, les hommes, âgés entre 20 et 40 ans qui souffrent de crises généralisées tonico-cloniques sont plus à risque. Un début précoce de l'apparition des crises, une prise irrégulière de la médication, la pharmacorésistance, de même que la prise d'alcool ou de drogues sont également des facteurs de risque connus<sup>257,312</sup>. De par sa gravité, la MSIÉ pose un défi clinique de taille. Il y a donc un intérêt grandissant dans la communauté scientifique sur le sujet. Les plus grands obstacles à l'étude de ce phénomène viennent du fait que la MSIÉ se produit rarement devant témoin, et qu'en plus, il n'y a pas de pathologie structurale visible à l'autopsie. Les quelques cas de MSIÉ devant témoin de même que les cas de quasi-MSIÉ suggèrent qu'un problème respiratoire, cardiaque ou bien une combinaison des deux serait responsable du décès<sup>253</sup>. Cependant, les mécanismes précis et la pathogenèse responsables de la MSIÉ ne sont pas

encore bien connus, ce qui rend difficile la mise en place de stratégies de prévention pour en réduire l'incidence.

Les modèles animaux sont des outils indispensables, tant pour la compréhension des mécanismes qui sous-tendent la MSIÉ, que pour le développement de stratégies de prévention. Plusieurs pistes d'hypothèse proviennent d'ailleurs de l'étude de souris transgéniques porteuses de mutations associées à des syndromes particuliers<sup>253,257</sup>. L'hypothèse cardiaque est entre autres supportée par l'étude des souris porteuses de mutations tronquantes dans le gène *SCN1A*. Ces dernières reproduisent le phénotype du syndrome de Dravet, une forme sévère d'encéphalopathie épileptique, et leur décès est causé par une bradycardie suite à une crise TC<sup>279</sup>. Ces observations ne permettent toutefois pas d'exclure la contribution d'une dysfonction respiratoire dans la mort subite, que ce soit dans les divers modèles animaux, ou chez l'humain.

Par ailleurs, d'autres modèles animaux suggèrent un lien entre la MSIÉ et un problème respiratoire. C'est le cas des souris DBA/1 et DBA/2 qui, suite à un stimulus auditif, développent des crises épileptiques généralisées. Dans 75 à 100 % des cas, ces crises mènent au décès<sup>289-292</sup>. Un arrêt respiratoire menant à de l'arythmie, puis à un arrêt cardiaque serait la cause de ces décès. Un support respiratoire permettrait toutefois d'éviter le décès, ce qui suggère que l'arrêt respiratoire est la cause principale des décès subits chez les souris DBA/1 et DBA/2.

Tout comme dans les modèles animaux, il est fort probable que la MSIÉ puisse être causée par une dysfonction cardiaque dans certains cas, un problème pulmonaire dans d'autres, ou même une combinaison des deux, dépendamment du syndrome épileptique. Le développement de nouveaux modèles animaux est donc essentiel afin de disséquer les diverses causes de la MSIÉ, de même que les mécanismes moléculaires les sous-tendant.

#### **4.4 Hypothèse et objectifs**

Dans une étude précédente (voir chapitre 3), nous avons observé un taux élevé de décès chez les rats consanguins de souche SHR, peu de temps après le début des crises tonico-cloniques (TC) induite par acide kaïnique. Puisque la MSIÉ se produit souvent suite à une crise généralisée TC, nous avons émis l'hypothèse que les rats SHR seraient de bons modèles de MSIÉ. Une nécropsie réalisée sur ces animaux ayant révélé la présence d'œdème pulmonaire important, nous avons voulu vérifier si une défaillance respiratoire était bel et bien à l'origine du décès. Nous avons donc entrepris d'investiguer plus en profondeur la cause du décès des rats SHR. Nous avons notamment procédé à un monitoring cardiaque chez ces animaux, grâce à des implants radio-télémetriques, chez les rats SHR, de même que chez des rats contrôles (Dahl).



## 4.5 Méthodes

### *Animaux*

Les rats de souche SHR (n=7) et Dahl (n=2) ont été achetés au laboratoire Charles Rivers alors qu'ils étaient âgés de 60 jours. Les animaux ont été gardés dans des cages standards, avec de la nourriture *ad libitum*, et avec une alternance de luminosité/noirceur de 12 heures. Afin de leur permettre de s'acclimater à leur nouvel environnement, les animaux n'ont subi aucune manipulation pendant les 3 jours suivant leur arrivée. Suite à leurs chirurgies, les animaux ont été transférés dans des cages de Plexiglas de fabrication maison qui permettent aux rats de bouger librement, et ce, malgré les câbles qui les relient au système d'EEG. L'ensemble des procédures ont été approuvées et ont été réalisées en conformité avec le Conseil canadien de protection des animaux en science (CCPA).

### *Protocole d'injection d'acide kaïnique (AK)*

L'acide kaïnique a été préalablement dissous dans du tampon PBS 1X à une concentration de 8mg/ml. Les animaux étaient ensuite pesés avant de recevoir une première dose de 8mg/kg. Si le *status epilepticus* n'était pas entamé 60 minutes après la première injection, une seconde dose était administrée. Le début du *status epilepticus* était considéré lorsque l'animal était en crise épileptique de stade 4 ou 5, et ce, de manière continue. Les crises étaient donc notées selon une modification de l'échelle de Racine. Les stades sont les suivants : 1) «*wet-dog shakes*» et/ou clonies isolées, 2) immobilité et fixation accompagnées d'activité électrique épileptique, 3) clonies des membres antérieurs, 4) cambrage, 5) cambrage et chute, 6) sauts et rebonds incontrôlés (popcorn). Si après 3 heures de SE l'animal était toujours vivant, la crise

était arrêtée en anesthésiant l'animal par administration d'isoflurane à 4 %. L'animal était ensuite euthanasié en perçant le diaphragme lors de la nécropsie. Si l'animal décédait durant la crise épileptique, ce dernier était rapidement retiré de la cage et la nécropsie avait lieu. Au total, 2 rats Dahl et 7 rats SHR ont été étudiés.

### *Électroencéphalogramme (EEG)*

Afin de mieux caractériser les crises et de s'assurer de l'atteinte du *status epilepticus* chez les patients, ces derniers ont été suivis grâce à un monitoring par vidéo-EEG tel que décrit dans le chapitre 2 de cette thèse. En résumé, les rats de chaque souche (n=2 Dahl et n=7 SHR) ont été implantés avec des électrodes bipolaires pour EEG (Plastics-1 Inc., Roanoke, VA, USA) dans l'hippocampe droit de même que dans le cortex le recouvrant. Les coordonnées stéréotaxiques, en référence avec le Bregma sont : AP=-3.7, ML=+2.4 and DV=-3.5. Une deuxième électrode, servant de base électrique, a été enroulée autour d'une vis puis ancrée dans l'os crânien, au-dessus du cervelet. Des vis additionnelles ont également été placées dans l'os du crâne puis recouvertes de ciment dentaire afin d'assurer une bonne fixation des électrodes. Les animaux ont ensuite bénéficié d'une période de récupération de 7 à 10 jours avant la seconde chirurgie pour recevoir leur implant télémétrique pour le suivi de la pression sanguine et/ou des données ECG. Deux heures avant l'injection d'AK, les animaux étaient connectés à un système d'enregistrement EEG-vidéo de 32 canaux de la marque Stellate. L'enregistrement a été effectué pour toute la durée du SE, pour un maximum de 3 heures, ou jusqu'au décès de l'animal.

### *Implantation des transmetteurs radio-téléométriques*

Suite à l'implantation d'électrodes pour les EEG, les animaux ont bénéficié d'une période de récupération de 7 à 10 jours. En premier lieu, nous avons réalisé un projet pilote avec un premier groupe de 5 rats SHR. Ceux-ci ont reçu un implant radio-téléométrique (PA-C40, Data Science International) permettant un suivi de la fréquence cardiaque et de la pression sanguine. Par la suite, afin d'obtenir de plus amples informations sur les fonctions cardiaques des animaux durant le SE, un deuxième groupe, soit 3 SHR et 2 Dahl ont reçu l'implant radio-téléométrique (HD-S11, Data Science international) qui permet, outre le suivi de la fréquence cardiaque et de la pression sanguine, la transmission des données ECG de l'animal. En résumé, l'animal était anesthésié sous isoflurane. Une incision de 2 cm était faite sur l'abdomen. Le transmetteur de l'implant était placé dans la cavité abdominale et fixé avec des points de suture dans les muscles abdominaux. Une seconde incision était performée sur la cuisse gauche de l'animal, dans le but d'en exposer l'artère fémorale. Le capteur, qui consiste en un cathéter rempli de gel, était ensuite inséré dans la l'artère fémorale qui avait été préalablement suturée. Les animaux étaient ensuite retournés dans des cages individuelles pour une période de récupération minimale de 9 jours.

### *Pathologie*

Immédiatement après la mort subite ou l'euthanasie de l'animal, les implants ont été retirés. Pour les 2 rats Dahl et les 3 rats SHR, les poumons et les cœurs ont été prélevés. Les poumons ont d'abord été pesés, puis les tissus ont été immergés et fixés dans du PFA 4 %. Les tissus ont ensuite été traités pour l'histopathologie de manière standard. En résumé, les tissus ont été placés dans un bloc de paraffine puis tranchés à une épaisseur de 5µm sur un microtome de

marque Leica. Une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine a été conduite selon un protocole standard. Les lames d'histologie ainsi produites ont été examinées sous microscope, puis numérisées. Les lames de poumons ont toutes été examinées par Dre. Dominique Trudel, pathologiste à l'hôpital St-Luc du centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Les lames de cœurs ont quant à elle été examinées par Dr Sylvain Trahan, anatomopathologiste à l'institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (Hôpital Laval). L'interprétation des coupes histologiques s'est faite à l'aveugle. Un rapport détaillé des anomalies trouvées dans chacun des échantillons nous a ensuite directement été transmis.

#### *Analyses des données de télémétrie*

La rats SHR sont connus pour souffrir, de manière spontanée, d'hypertension. Afin de vérifier si cette tension artérielle élevée pouvait contribuer au décès des animaux, nous avons comparé la tension artérielle entre les rats SHR et les témoins, les rats Dahl. Pour chaque animal, la moyenne a été calculée à partir des résultats obtenus pour une période de 12 heures (midi à minuit), et ce avant le traitement à l'AK. Un test de T a été réalisé sur les résultats pour vérifier si la différence était statistiquement significative. Le seuil a été déterminé à une valeur de P de  $<0.05$ . Afin de vérifier si une anomalie cardiaque pouvait également être à l'origine de la mort subite chez nos rats, les fréquences cardiaques basales des deux souches ont également été comparées. Le traitement de ces données s'est fait de la même manière que pour la pression sanguine. Par la suite, une comparaison des fréquences cardiaques et de la pression sanguine entre les deux souches a été réalisée durant la crise épileptique, jusqu'au décès des animaux. Pour chacun des deux paramètres, la moyenne des données a été calculée pour chaque souche, et ce, pour les 20 dernières minutes de la crise.

## 4.6 Résultats préliminaires

### *Fréquence de décès*

Dans une étude précédente (voir chapitre 3), nous avons démontré que le taux de décès chez les rats SHR était de 91,7 % suite au début des crises de stades 4 ou 5. Dans la présente étude, 8 rats SHR ont à nouveau reçu une injection d'acide kaïnique afin de déclencher les crises épileptiques. Un seul rat a survécu au *SE*, ce qui donne un taux de mortalité de 85,7 %. Tous les rats Dahl ont quant à eux survécu au *SE*.

### *Pathologie des poumons*

À la nécropsie, la différence de taille entre les poumons des rats qui étaient décédés de mort subite versus les rats contrôles, était frappante (fig. 1A). À l'observation visuelle macroscopique, de l'écume blanchâtre s'écoulait des poumons des rats SHR. Le poids moyen des poumons des rats SHR était de 4,32g ( $\pm 0,48$ ) tandis que celui des rats Dahl était de 1,36g ( $\pm 0,02$ ). Les poumons étaient significativement plus gros chez les rats SHR ( $p=0,003$ ) (fig. 1B). Le rapport de la pathologiste a révélé que pour les 2 rats Dahl, aucune anomalie histologique significative n'était visible. Pour les rats SHR, le poids élevé des poumons (3/3), la présence de sérosités alvéolaires (3/3) et la présence de congestion vasculaire (1/3), sont compatibles avec un diagnostic d'œdème pulmonaire (fig. 1C).

### *Pathologie des cœurs*

L'examen macroscopique des cœurs n'a révélé aucune anomalie évidente. L'analyse microscopique des cœurs en histopathologie a quant à elle révélé la présence de plusieurs

foyers de nécrose transmuraux dans les ventricules gauches (3/3) et dans le ventricule droit (1/3). Les 3 rats SHR présentent donc des signes d'ischémie précoce. Aucune anomalie n'a été observée dans les cœurs des rats Dahl.

#### *Pression sanguine basale*

Tel qu'attendu, les données de pression sanguine obtenues grâce aux implants radio-téléométriques ont démontré que les rats SHR avaient une pression sanguine significativement plus élevée que les rats Dahl ( $p=0.0002$ ). La pression sanguine moyenne chez les SHR s'élève à  $157,8 \text{ mmHg} \pm 8,24$  tandis que chez les rats Dahl, elle est de  $120 \text{ mmHg} \pm 17,78$  (Fig. 3a).

#### *Fréquence cardiaque basale*

Pour ce qui est de la fréquence cardiaque basale, les données révèlent que les rats Dahl sont ceux chez qui elle est significativement plus élevée ( $p=0,0016$ ). En effet, la fréquence cardiaque moyenne des Dahl s'élève à  $403 \text{ battements/minute} \pm 39$ , versus  $329 \text{ battements/minute} \pm 23$  chez les rats SHR (Fig. 3b).

#### *Paramètres cardiaques précédant le décès*

La comparaison entre les fréquences cardiaques (FC) et les pressions sanguines (PS) durant la crise et avant le décès, montrent que la chute de ces derniers débute, dans les deux cas, entre 6 et 7 minutes avant le décès (Fig. 4a et b). Durant la crise, la tendance suggère que la PS est plus élevé chez les rats SHR que chez les rats Dahl. Contrairement aux données basales, la fréquence cardiaque est plus élevée chez les rats SHR durant la crise que chez les rats Dahl.

## 4.7 Discussion et perspectives

La présente étude suggère que les rats SHR pourraient être de bons modèles de susceptibilité génétique à la mort subite en épilepsie. En effet, un taux de mortalité élevé chez les SHR a été observé dans une étude précédente suite à l'induction de crises épileptiques par injection d'acide kaïnique (chapitre 3). Le fait que le modèle d'AK chez des SHR ait déjà été utilisé par d'autres groupes de recherche <sup>317,318</sup> sans évidence de MSIÉ suggère que la provenance (élevage) des animaux pourrait être un facteur important dans cette sensibilité. La dérive génétique est un phénomène commun dans les élevages d'animaux de laboratoire, et il sera essentiel de considérer ce point lors de la planification d'expériences futures.

Chez l'humain, bien que par définition, la cause de décès soit inconnue dans la MSIÉ, l'examen post-mortem des tissus a révélé la présence d'œdème pulmonaire dans plus de la moitié des cas <sup>336-338</sup>. L'observation macroscopique et microscopique des poumons des rats SHR ayant succombé aux crises épileptiques a également révélé la présence d'œdème pulmonaire chez tous les cas étudiés. Bien que l'hypothèse initiale soit qu'une dysfonction respiratoire était à l'origine du décès des animaux, l'étude histologique des cœurs a révélé la présence de foyers de nécroses au niveau des ventricules. Également, la chute de la tension artérielle dans les minutes précédant le décès suggère une défaillance cardiaque. L'ensemble de nos résultats suggèrent qu'une ischémie cardiaque avec défaillance serait à l'origine de l'œdème pulmonaire chez les SHR. Les rats SHR, ou *spontaneous hypertensive rats*, sont largement utilisés dans les études sur l'hypertension. En effet, ils reproduisent plusieurs des caractéristiques phénotypiques retrouvées dans l'hypertension humaine comme une pression

sanguine élevée et une hypertrophie ventriculaire <sup>339,340</sup>. Une conséquence de cette hypertension pathologique chez ces animaux est le décès, vers l'âge de deux ans, d'un arrêt cardiaque <sup>341,342</sup>. Il est intéressant de noter que, dans les cas de MSIÉ chez l'humain, les analyses histologiques des tissus cardiaques révélaient également des changements pathologiques, et ce, dans 33 % des cas <sup>337</sup>. Ainsi, les résultats préliminaires obtenus dans le cadre de cette recherche suggèrent que la mort subite durant une crise tonico-clonique prolongée chez les rats SHR serait principalement causée par une dysfonction cardiaque.

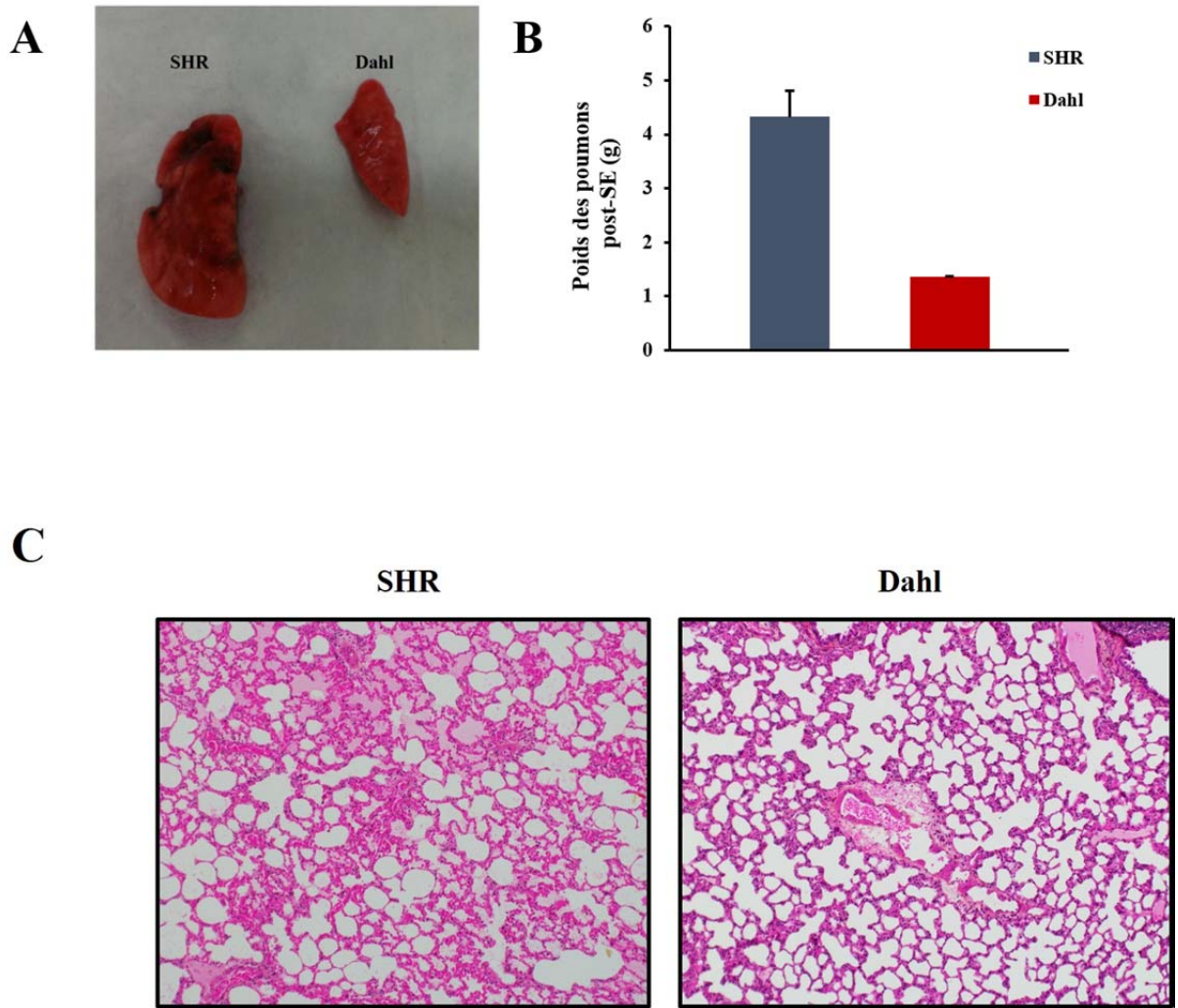
À ce jour, les modèles animaux les plus utilisés dans l'étude de la MSIÉ sont la souris DBA/1 et DBA/2. Contrairement à ces dernières, dont le décès est causé par un arrêt respiratoire, le modèle SHR que nous présentons ici serait plus représentatif de la mort subite induite par une défaillance cardiaque chez l'humain. La mort subite suite à une crise épileptique prolongée serait donc un trait génétiquement déterminé chez les rats SHR. D'autres facteurs génétiques indépendants de l'hypertension artérielle pourraient également être en cause.

L'objectif de ce présent travail était de déterminer si les rats SHR, en déterminant la cause de décès suite à l'induction d'une crise épileptique prolongée, étaient de bons modèles de MSIÉ. Les résultats préliminaires montrent qu'en effet, les rats SHR sont plus susceptibles de mourir subitement suite à une crise épileptique en raison d'une défaillance cardiaque. L'analyse détaillée des tracées d'ECG permettra de mieux caractériser la pathophysiologie associée à ces décès et ainsi, s'assurer que la mort subite chez cette souche de rat est comparable au MSIÉ observé chez les patients épileptiques. L'utilisation des rats SHR est fréquente dans les études génétiques d'hypertension. Si les études futures réalisées sur les rats SHR confirme la



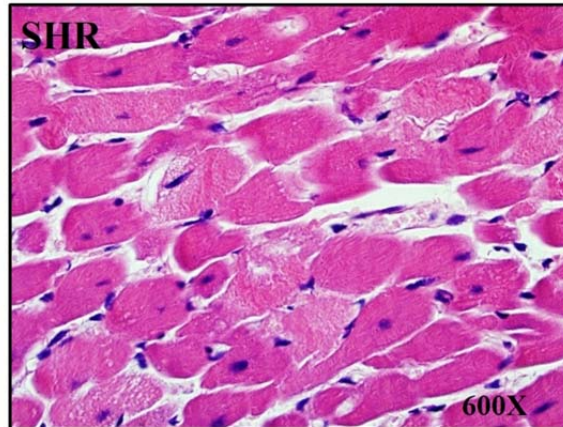
ressemblance avec le MSIÉ humain, l'utilisation de cette même souche dans un modèle de MSIÉ permettrait de découvrir les mécanismes moléculaires responsables de cette conséquence grave et relativement fréquente de l'épilepsie.

**Figure 4.6.1.** Figure 1. Observation macroscopique et analyse histologique des poumons post-SE.



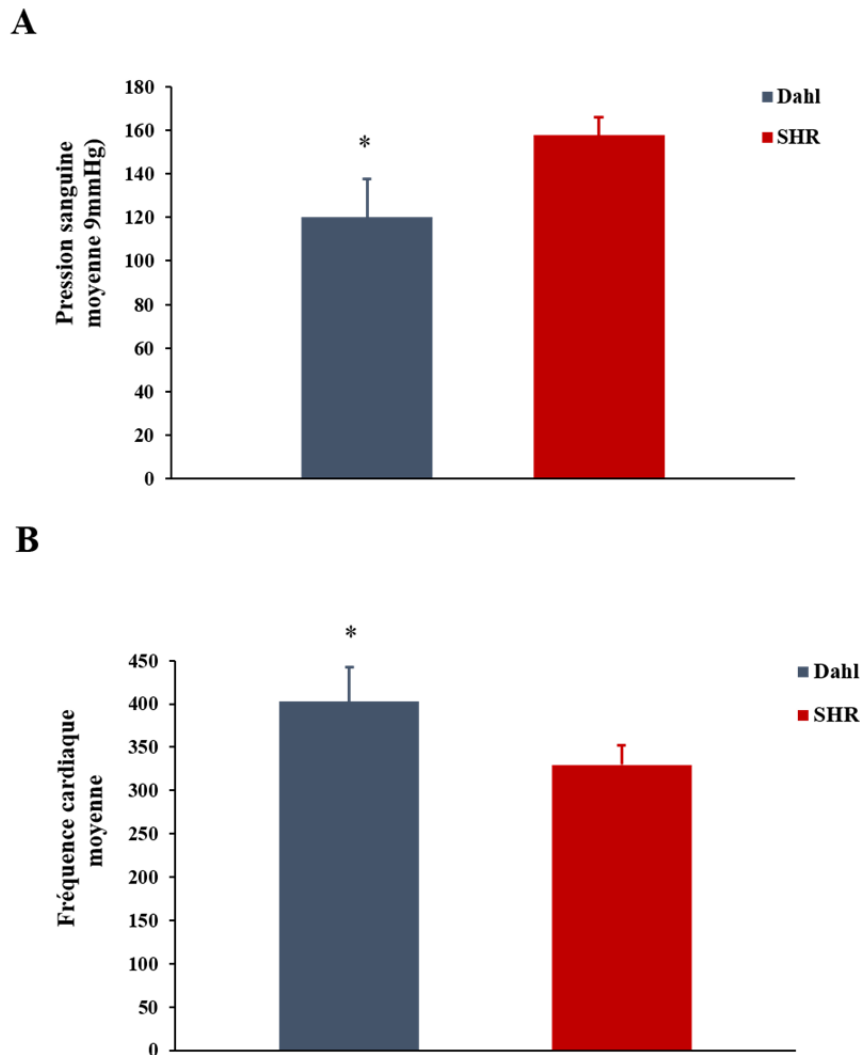
*Figure 1.* Observation macroscopique et analyse histologique des poumons post-SE **A.** Exemple de poumon pour un rat SHR (n=3) après la mort subite, et pour un rat Dahl (n=2) après le SE. **B.** Le poids moyen ( $\pm$ SEM) des poumons à la nécropsie est significativement plus élevé chez les SHR (*T*-test non apparié;  $p=0.003$ ). **C.** Exemple de coupes histologiques pour les rats SHR et Dahl. La présence de sérosités alvéolaires et de congestion vasculaire suggère un diagnostic d'œdème pulmonaire chez les rats SHR. Aucune anomalie n'est observée chez les rats Dahl.

**Figure 4.6.2** Figure 2. Histologie du cœur des rats SHR après le décès.



*Figure 2.* Exemple de coupe histologique d'un cœur de rat SHR après le décès. La présence de plusieurs foyers de nécroses (bandes de contraction) transmurales au niveau des ventricules suggère une ischémie précoce. Aucune anomalie n'a été observée chez les rats contrôles (Dahl).

**Figure 4.6.3.** Figure 3. Pression sanguine et rythme cardiaque de base chez les rats SHR et Dahl.



*Figure 3.* Pression sanguine et rythme cardiaque chez les rats SHR (n=9) et Dahl (n=2). Moyenne obtenue pour une période de 12 heures d'enregistrement télémétrique (midi à minuit) avant le début des expériences. Résultats présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. \*  $p < 0.05$  (*T*-test non apparié)

**Figure 4.6.4.** Figure 4. Données télémétriques des 20 dernières minutes du SE avant la mort subite ou l'euthanasie.

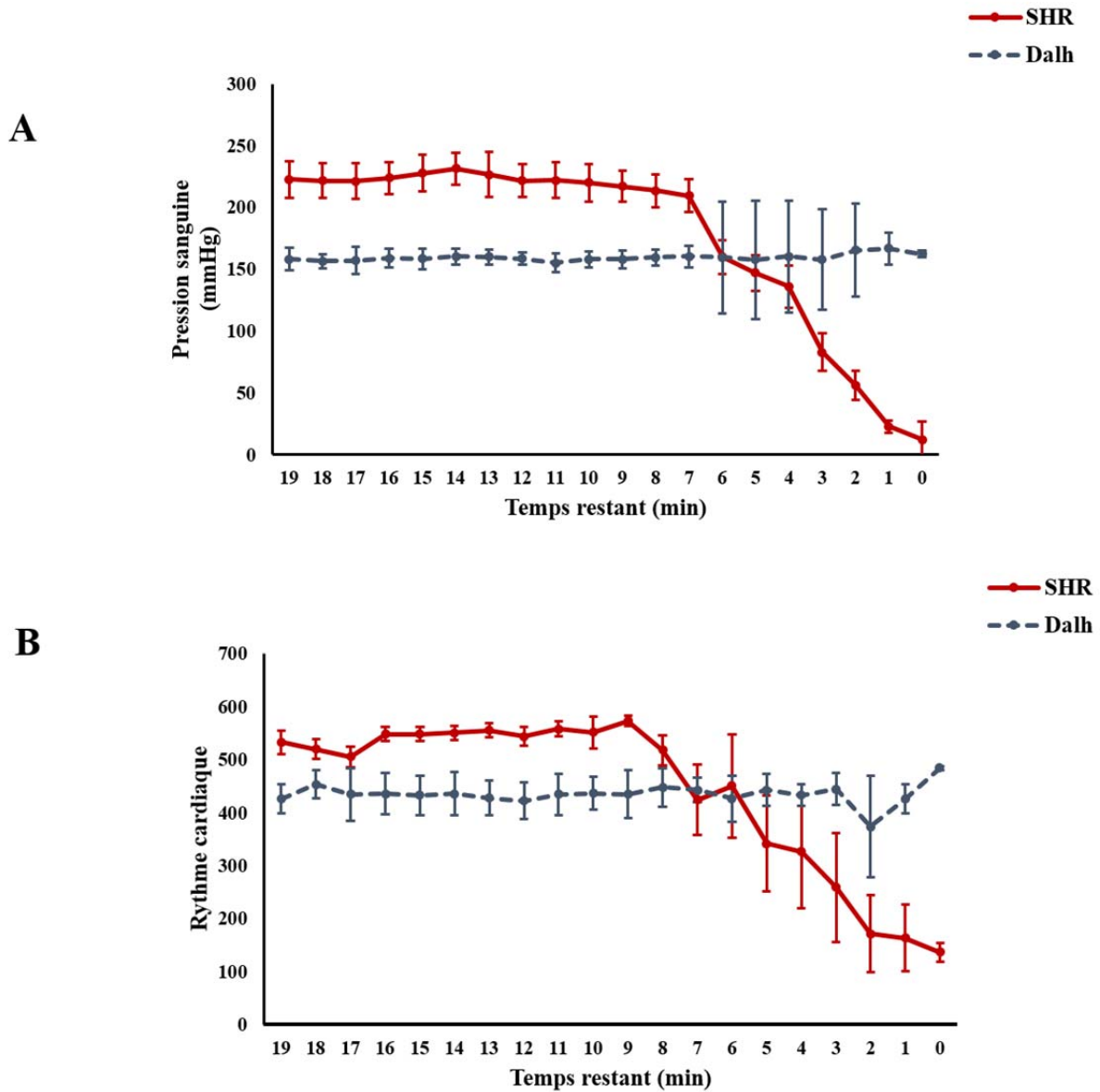


Figure 4. Données télémétriques pour les 20 dernières minutes du SE avant la mort subite chez les SHR (n=7) et l'euthanasie chez les Dahl (n=2). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type.

## Chapitre 5 : Discussion et perspectives

### 5.1 Retour sur les travaux

#### 5.2.1 Importance de *DEPDC5* dans les épilepsies d'origines focales

L'épilepsie familiale focale à foyers variables (EFFFV), un syndrome épileptique autosomique dominant, a été décrite pour la première fois en 1998 par Scheffer *et al*<sup>304</sup>. Ce syndrome est caractérisé par le fait que les différents membres de la famille présentent des crises d'origines focales émanant de différentes régions corticales. Puisque ce syndrome ne peut être identifié que dans de grandes familles d'épilepsie d'origine focale, la prévalence exacte n'est pas connue, et elle pourrait être largement sous-évaluée. À ce jour, une dizaine de familles ont été décrites. Des études de liaison ont précédemment permis de lier l'EFFFV à une région de 5.3 Mb sur la région chromosomique 22q12<sup>306-308</sup>, mais ce n'est que récemment, grâce aux nouvelles technologies de séquençage (exome) que le gène causatif a pu être identifié. En effet, deux études indépendantes, publiées en 2013 dans la revue *Nature Genetics*, ont rapporté des mutations hétérozygotes dans le gène *DEPDC5* chez de grandes familles EFFFV, de même que chez plusieurs petites familles d'épilepsie d'origine focale<sup>48,49</sup>. Des mutations causatives dans ce gène expliquent 12 % des cas d'épilepsie focale familiale pour Dibbens *et al*, et 37 % des cas pour Ishida *et al*. Fait intéressant, dans celle de Dibbens *et al*<sup>49</sup> à laquelle a participé notre laboratoire, une mutation récurrente (c.488\_delTGT; p.Phe164del) a été trouvée dans 3 familles Canadienne-Française d'EFFFV.

C'est à la lumière de ces résultats que nous avons décidé de réaliser le criblage du gène *DEPDC5* dans notre cohorte d'EFFFV et d'EF. Ce gène, qui code pour une protéine de 1604 acides aminés possédant un domaine DEP (disheveled, Egl-10, pleckstrin domain containing 5), a d'abord été séquencé chez 79 probants avec épilepsie d'origine focale. De ce nombre, 76 avait une histoire familiale. Une mutation récurrente, c.2527C>T, p.R843X, a été trouvée dans trois différentes familles, soit une famille EFFFV et 2 autres avec EF. Une nouvelle mutation, c.2591C>T; p.T864M, a également été trouvée chez un individu atteint d'épilepsie partielle complexe du lobe temporal. L'étude des haplotypes de nos trois familles porteuses de la mutation R843X a également démontré qu'ils possédaient un ancêtre commun. Nous avons ainsi été les premiers à répliquer cette étude et à confirmer l'importance majeure de cette découverte pour la compréhension des mécanismes moléculaires responsable de certaines formes d'épilepsies d'origine focale.

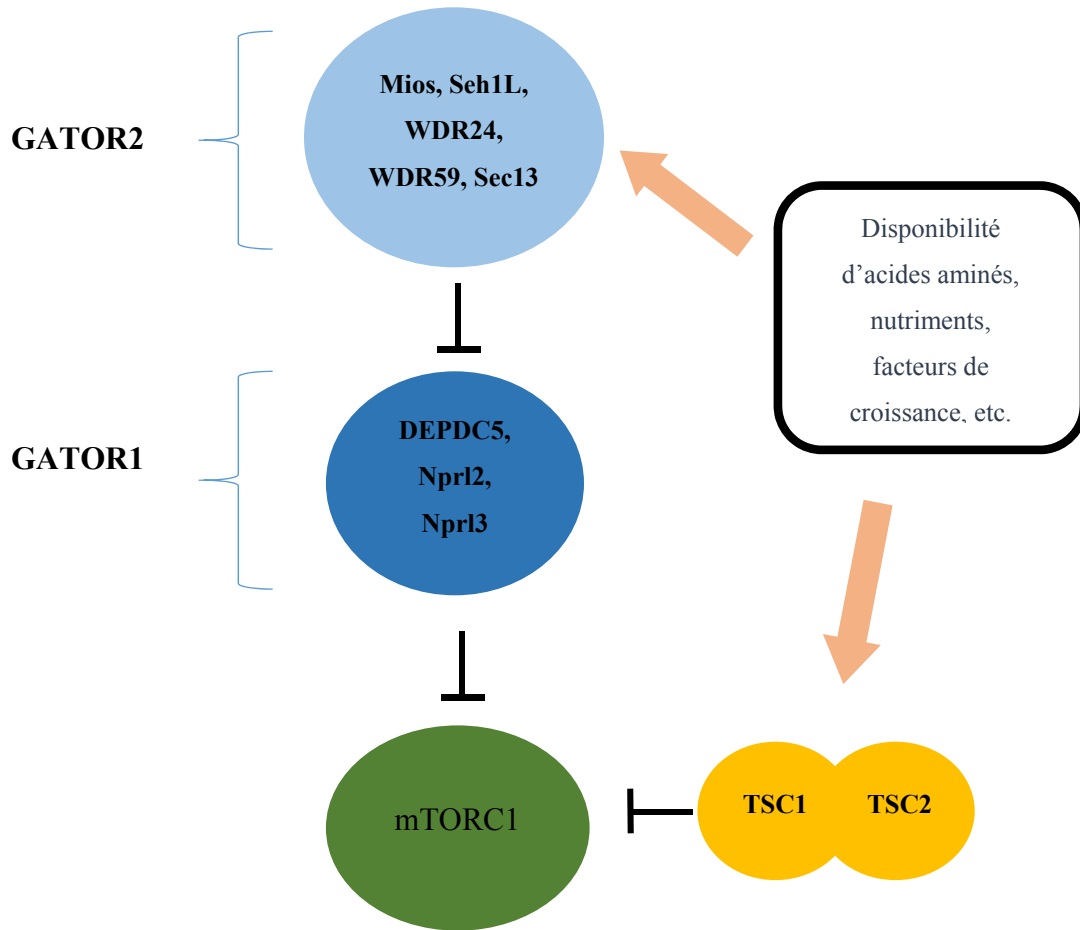
#### *5.2.1.1 Rôle de DEPDC5 dans la voie de signalisation mTORC1*

Au moment où nous avons réalisé ce travail, la fonction de la protéine que code *DEPDC5* n'était toujours pas bien connue. Toutefois, peu de temps après la publication des deux articles dans *Nature Genetics*, une étude de Bar-Peled et al<sup>311</sup> a démontré que la protéine jouait un rôle important dans la régulation de la voie de signalisation du complexe 1 de mTOR (*mammalian target of rapamycin*). mTORC1, est un complexe sérine-thréonine kinase qui régule divers procédés cellulaires et physiologiques tels que l'autophagie, la synthèse de protéines, la prolifération et surtout, la croissance cellulaire<sup>343</sup>. Le mTORC1, une fois activé en réponse à une augmentation de la disponibilité de nutriments tels que des acides aminés, migrera vers la paroi des lysosomes ou il promouvra la croissance cellulaire. La déprivation en

acide aminé enverra au contraire un signal pour inhiber la voie mTORC1. Bar-Peled *et al* ont démontré l'existence et le rôle de deux nouveaux complexes dans cette boucle rétroactive négative de mTORC1, soit GATOR1 et GATOR2 (Fig. 5.2.1.1). Le premier est composé de trois sous-unités (Npr12, Npr13 et DEPDC5) et le deuxième, de 5 sous-unités (Mios, WDR24, WDR59, Seh1L et Sec13). Or, si un des composants de ces complexes, comme par exemple DEPDC5 est manquant ou inactivé, mTORC1 résistera à une privation d'acides aminés, et la croissance cellulaire se poursuivra malgré tout.



**Figure 5.2.1.1.1** Implication de DEPDC5 dans la voie de signalisation mTORC1.



*Figure 5.2.1.1.1.* Implication de DEPDC5 dans la voie de signalisation mTORC1. DEPDC5 est une des sous-unités du complexe GATOR1. Les complexes GATOR1, -2 font partie de la boucle de rétroaction négative suite à une diminution de la disponibilité en acides aminés.

### 5.2.1.3 Implication de mTOR dans les malformations corticales

Bien que la découverte du rôle de DEPDC5 dans la voie mTORC1 fût nouvelle, l'implication de mTOR dans certaines maladies neurologiques et dans l'épilepsie était déjà bien connue. En effet, une hyperactivation de cette voie est impliquée dans diverses conditions neurologiques associées à des malformations corticales causant de l'épilepsie réfractaire. L'expression «mTORopathies» est d'ailleurs utilisée pour décrire ces conditions. L'identification de *TSC1* et *TSC2*, deux gènes causatifs de la sclérose tubéreuse (TSC), a été le point de pivot dans l'établissement d'un lien entre la voie mTOR et l'épilepsie<sup>344</sup>. En effet, *TSC1* et *TSC2* codent respectivement pour l'hamartine et la tubérine. Ces deux protéines forment ensemble un complexe qui, tout comme GATOR1 et GATOR2, sont des inhibiteurs de l'activité de mTORC1 (Fig. 5.2.1.1.1). Il a été démontré que ces maladies sont associées à une incapacité à inhiber cette voie, causant une croissance cellulaire aberrante, et l'apparition de tumeurs non malignes dans différentes parties du corps, et des tubers dans le cerveau. Les tubers sont des lésions hautement épileptogènes. De ce fait, 80 % des patients atteints de sclérose tubéreuse souffrent également de crises épileptiques. La TSC est d'ailleurs la cause principale du syndrome de West. Un autre exemple important de l'implication de la voie mTOR en épilepsie est la présence d'une délétion homozygote dans le gène *STRADA* chez les patients atteints de PMSE (*polyhydramnios, megalencephaly and symptomatic epilepsy*)<sup>345</sup>. La protéine STRADa est une pseudokinase qui se lie et augmente l'activité de LKB1, une kinase régulatrice de l'activité de mTOR<sup>346</sup>.

La relation entre mTOR et la tumérogénèse est donc relativement claire. Bien que l'épilepsie puisse être causée par la présence de ces tumeurs ou de ces tubers anormaux, mTOR aurait

également un effet épiléptogène, indépendamment de ces pathologies. La voie mTOR est impliquée dans un large éventail de fonctions physiologiques. La voie mTOR joue en effet un rôle important dans le développement du système nerveux central. En plus d'être impliquée dans la neurogenèse, le développement dendritique, la croissance axonale et la modulation de l'activité gliale, la voie mTOR joue un rôle central dans le développement du cerveau en contrôlant l'expression de diverses protéines impliquées dans la différenciation neuronale, la synaptogénèse et l'excitabilité neuronale<sup>343</sup>. En effet, l'activation de la voie de signalisation Ras-PI3K-Akt-mTOR promouvoit la croissance dendritique et les ramifications dans des neurones hippocampiques en culture<sup>383</sup>. L'inhibition de cette voie amène une réduction marquée de la taille des somas et des dendrites, de même qu'une diminution de la complexité dendritique<sup>384</sup>. De ce fait, il est attendu que ces changements morphologiques puissent jouer un rôle important dans l'activité neuronale et ainsi, être impliqués dans l'épilepsie. Plusieurs laboratoires ont d'ailleurs testé cette hypothèse et ont démontré qu'une hyperactivation de la voie mTOR dans les modèles animaux engendrait l'apparition de crises épileptiques spontanées<sup>193,347-349</sup>.

#### *5.2.1.2 Implication de DEPDC5 dans les malformations corticales*

En 2013, lors de la publication de nos résultats, des mutations dans le gène *DEPDC5* n'avaient été identifiées que dans des cas d'épilepsie d'origine focale non lésionnelle. En raison du rôle de la voie mTOR dans les malformations corticales, certains groupes de recherche ont émis l'hypothèse que d'autres mutations dans ce gène pouvaient également causer des syndromes épileptiques associés à des malformations corticales. Scheffer *et al.*<sup>350</sup> ont été les premiers à démontrer que des mutations dans *DEPDC5* causaient des épilepsies focales avec dysplasie

corticale (DC). Dans une même famille de 6 individus atteints d'épilepsie focale, 2 présentaient également de la dysplasie corticale. L'idée qu'une seule mutation dans un gène puisse causer, et les crises d'épilepsie d'origine focale, et la malformation corticale était plutôt inhabituelle. La présence de malformations plus subtiles, et non visibles par les techniques d'imagerie standard a été proposée pour expliquer ce phénomène. Toutefois, une étude de Baulac *et al* publiée en 2015, et pour laquelle notre laboratoire a contribué, a remis en question cette hypothèse<sup>351</sup>. Le criblage du gène *DEPDC5* chez 4 familles atteintes d'épilepsie focale avec DC a été réalisé. Les résultats ont confirmé que tous étaient porteurs de mutations tronquantes dans le gène *DEPDC5*. Fait intéressant, un des patients asymptomatiques était également porteur de la mutation, mais celle-ci présentait un patron en mosaïsme. Finalement, chez un des patients, une mutation somatique *de novo* a également été trouvée dans le cerveau. Ces résultats suggèrent donc que le modèle génétique du double hit pourrait expliquer la présence de dysplasie corticale seulement dans une sous-population des patients porteurs de mutations dans *DEPDC5*.

### 5.2.1.3 Perspectives

Au moment où nous avons réalisé notre étude, peu d'information était disponible sur le rôle de *DEPDC5* et son implication dans l'épilepsie. Depuis, tel que discuté précédemment, des avancées scientifiques considérables ont été réalisées. La voie mTOR, initialement impliquée dans des syndromes épileptiques avec malformations corticales, est maintenant associée à des épilepsies focales non lésionnelles. D'ailleurs, une étude récente rapporte des mutations dans les gènes *NPRL2* et *NPRL3*, faisant tous deux partie du complexe *GATOR1*, chez des patients atteints d'épilepsie focale<sup>352</sup>. Il est donc fort probable que d'autres gènes impliqués dans cette

voie puissent être responsables de divers autres syndromes épileptiques. De plus, la découverte de mutations somatiques dans le cerveau de patients avec dysplasie corticale supporte l'hypothèse de mutations double-hit dans les épilepsies avec malformations corticales. Il serait intéressant de vérifier la prévalence de ce type de mutations chez les patients pharmacorésistants qui ont subi une chirurgie de l'épilepsie. Les avancées technologiques dans le domaine du séquençage à haut débit permettraient de réaliser ces études sur de grandes cohortes d'épilepsie réfractaire avec malformation corticale. Ces connaissances seraient un atout de taille dans le dépistage des épilepsies, mais surtout, elles fourniraient des pistes d'investigation pour le développement de nouveaux traitements pharmacologiques.

### **5.2.2 *Galr1* comme gène de susceptibilité à l'excitotoxicité dans un modèle animal d'ÉLTm**

L'épilepsie du lobe temporal avec sclérose de l'hippocampe, que l'on appelle aussi épilepsie du lobe temporal mésial (ÉLTm) est une des formes d'épilepsie la plus fréquente, et chez laquelle on retrouve le plus haut taux de pharmacorésistance. La découverte des mécanismes moléculaires et physiologiques la sous-jacent est donc essentielle. Comme pour la plupart des épilepsies, l'ÉLT est une maladie à transmission génétique complexe où une interaction gène-environnement est soupçonnée. Réussir à distinguer le rôle de chacun de ces facteurs pour le développement de la maladie n'est malheureusement pas possible en recherche clinique. Cela reste toutefois essentiel.

### 5.2.2.1 Utilisation de souches de rat consanguins dans l'étude de maladie à traits complexes

Pour remédier à cette difficulté, l'utilisation de modèles animaux consanguins est une méthode qui a fait ses preuves pour plusieurs traits génétiques complexes comme l'hypertension<sup>339,353</sup> ou l'alcoolisme<sup>354</sup>. Les souches consanguines sont obtenues grâce aux croisements, sur 20 générations, de frères et de sœurs d'une même lignée. Les animaux consanguins ainsi produits sont génétiquement identiques. Les différences observées entre les individus d'une même souche peuvent donc être attribuées à l'environnement. À l'opposé, dans le cas où l'environnement est contrôlé, les différences entre les individus de deux souches consanguines différentes peuvent être attribuées à des facteurs génétiques<sup>354</sup>. De plus, la création de souches congéniques, obtenues grâce à des techniques de substitution chromosomiques chez ces animaux consanguins, permet la découverte de loci, ou de gènes impliqués dans le trait étudié. Comparativement à la génétique humaine, cette méthode permet une évaluation objective et quantitative des différents phénotypes associés aux traits génétiques complexes.

C'est donc dans cette optique que nous avons réalisé l'étude, présentée au chapitre 3, sur la sensibilité à la mort neuronale induite par une crise épileptique prolongée chez des souches de rats consanguins. Les rongeurs, suite à un *status epilepticus* induit par des drogues ou par des stimulations électriques, recréent la pathologie caractéristique de l'ÉLTm : la sclérose de l'hippocampe. Puisque la SH est une cause importante d'épilepsie pharmacorésistante, nous voulions, grâce à l'utilisation de souches de rats consanguins, déterminer les mécanismes moléculaires responsables de cette pathologie.

### 5.2.2.2 Implication de *Galr1* dans la susceptibilité à la mort neuronale dans notre modèle

Lorsque nous avons entamé ce travail, l'importance du fond génétique dans la sensibilité à la mort neuronale avait déjà été démontrée chez des souches consanguines de souris, mais le gène de susceptibilité n'était pas connu<sup>237,355</sup>. Les travaux de Schauwecker avaient en effet montré que les souris C57BL/6 étaient résistantes à l'excitotoxicité induite par un SE, tandis que les souris FVB/N étaient sensibles. Grâce à la création de souris congéniques pour les divers chromosomes, différents loci ayant un impact sur cette susceptibilité ont été identifiés<sup>239,240,356</sup>. Un des plus importants, situé sur le chromosome 18, contenait le gène *Galr1*, et Schauwecker a par la suite démontré qu'une expression différentielle de ce gène était à l'origine de la différence entre les deux souches<sup>242</sup>.

À ce jour, aucune étude systématique sur la susceptibilité à la mort neuronale n'avait encore été réalisée chez des rats consanguins. C'est dans cette optique que nous avons décidé de tester la susceptibilité à la mort neuronale chez 4 souches de rats consanguins. Notre choix s'est arrêté sur les rats SHR, Brown-Norway, Dahl et Lewis, puisque ces derniers sont régulièrement utilisés comme modèle génétique dans les études sur l'hypertension et nous avons accès à des lignées congéniques impliquant l'ensemble du génome à des fins de cartographie génétique. Les résultats présentés dans le chapitre 3 de cette thèse ont démontré que les rats Dahl étaient sensibles à la mort neuronale induite par un SE, tandis que les rats Lewis étaient résistants. Grâce à la souche congénique Dahl/lew.Chr18b5, nous avons confirmé l'importance du chromosome 18 dans la sensibilité à la mort neuronale chez les rats. Puisque ce locus contenait également le gène *Galr1*, nous avons vérifié son niveau d'expression dans les deux souches, et encore une fois, nous avons confirmé qu'il était bel et bien différenciellement exprimé entre nos deux souches. Les résultats de notre étude renforcent

ainsi l'idée que le système galaninergique pourrait jouer un rôle important dans le développement de l'épilepsie du lobe temporal avec sclérose de l'hippocampe.

### 5.2.2.3 Rôle de la galanine dans l'épilepsie

La galanine est un peptide de 30 acides aminés (29 chez le rat) qui intervient dans la régulation de divers procédés physiologiques tels que l'appétit, l'émotion, la douleur et la mémoire. Il a également été démontré qu'il agissait comme modulateur de l'excitabilité neuronale dans l'hippocampe <sup>357,358</sup>. En effet, l'application d'agoniste au récepteur à la galanine sur des coupes organotypiques d'hippocampe de rats inhibe le relâchement de glutamate lors de la dépolarisation <sup>358</sup>. La galanine aurait donc un effet inhibiteur sur la neurotransmission glutaminergique excitatrice. En 1992, Mazarati et ses collègues ont démontré pour la première fois, l'effet anticonvulsif de la galanine dans un modèle de rats kindlés <sup>359</sup>. Les souris KO pour le gène *Galr1*, en plus de souffrir de crises partielles spontanées, sont plus susceptibles de développer des lésions neuronales suite à l'administration d'excitotoxine <sup>325,327</sup>. Dans le même ordre d'idée, une surexpression de la galanine diminue la perte neuronale suite à des crises limbiques <sup>315,326</sup>. La raison pour laquelle le système galaninergique semble important dans la pathophysiologie du lobe temporal vient du fait que le gyrus dentelé, qui reçoit les signaux excitateurs via la voie perforante et qui joue un rôle important dans la propagation des crises, est également la partie qui reçoit le plus d'innervations galaninergiques <sup>360</sup>.



Dans notre étude, le niveau d'expression de la *Galr1* était 4 fois plus élevé chez les rats Lewis en comparaison aux rats Dahl. Ce résultat est consistant avec les observations faites chez la souris, mais dans un autre modèle : le rat. Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggèrent que la diminution d'expression du récepteur 1 à la galanine entrainera une diminution de l'activité galaninergique. Une diminution de l'effet inhibiteur de la galanine sur la neurotransmission glutaminergique serait donc ainsi associée à une hyperexcitabilité neuronale.

#### 5.2.2.2 Perspectives

Au moment où nous avons réalisé notre étude, bien que le rôle du système galaninergique dans l'épilepsie avait été largement démontré dans les modèles animaux, son rôle dans l'épilepsie humaine demeurait hypothétique. Toutefois, une étude a récemment publié le premier cas de mutations dans le gène *Gal* (codant pour la galanine), chez des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal<sup>132</sup>. La prévalence de mutation dans ce gène semble toutefois relativement faible. Nous avons d'ailleurs réalisé le criblage du gène *Gal* et *Galr1* dans notre cohorte de 95 patients atteints d'épilepsie du lobe temporal et d'épilepsie focale, et aucune mutation n'avait été trouvée (données non présentées dans cette thèse). De la même manière, le séquençage du gène *Galr1* chez nos deux souches de rats n'a permis de déceler aucune mutation. Il est fort possible qu'un second gène ou une variation dans les régions non codantes situées dans la région d'intérêt soient responsables du niveau d'expression de *Galr1*. Un phénomène semblable pourrait également être impliqué dans l'ÉLT chez l'humain. De ce fait, le séquençage du génome complet des rats Dahl et Lewis, avec une attention particulière au chromosome 18, devrait nous aider à découvrir la cause génétique de cette sensibilité à la mort neuronale dans le modèle d'ÉLTm. Ces connaissances pourraient ainsi aider la communauté

scientifique médicale et à mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables du développement de la sclérose de l'hippocampe, ouvrant par le fait même la porte à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

### **5.2.3 Mort subite et inexpliquée en épilepsie chez les rats SHR : description d'un nouveau modèle génétique**

Les épilepsies d'origines focales, qui sont au centre de cette thèse, sont associées à un haut taux de pharmacorésistance. De plus, ces patients pharmacorésistants ont de deux à trois fois plus de chance de mourir subitement que le reste de la population<sup>333-335</sup>. Un phénomène, appelé mort subite et inexpliquée en épilepsie (ou MSIÉ), est responsable de près de 50 % des décès chez ces patients<sup>8,9</sup>. Il y a donc un fort intérêt dans la communauté scientifique et médicale à comprendre les mécanismes qui sous-tendent la MSIÉ. Deux hypothèses sont proposées pour expliquer la MSIÉ : une dysfonction cardiaque, ou une dysfonction respiratoire. Dans le cadre de notre étude sur la sensibilité à la mort neuronale présentée dans le chapitre 3, nous avons fait la découverte fortuite que les rats de souche SHR mouraient systématiquement suite à l'induction d'une crise généralisée prolongée. C'est dans l'optique de bien décrire ce nouveau modèle génétique de mort subite que nous avons entrepris d'investiguer la cause physiologique de ces décès.

#### *5.2.3.1 Hypothèse respiratoire*

La première hypothèse que nous avons émise était que les rats SHR mourraient durant la crise épileptique suite à un arrêt respiratoire. L'observation clinique des animaux suggérait des

difficultés respiratoires avant le décès et la présence d'œdème pulmonaire à la nécropsie. Cette hypothèse allait dans le sens de la littérature qui associe la MSIÉ à une dysfonction respiratoire. De l'hypoxémie, causée par de l'apnée ou de l'hypoventilation, est en effet fréquemment observée chez les patients durant une crise épileptique<sup>281,287</sup>. De plus, des cas documentés de MSIÉ ou de quasi-MSIÉ ont été reliés à de l'apnée centrale, une constriction du larynx et/ou de l'œdème pulmonaire neurogénique<sup>283,284,286</sup>. Par ailleurs, les modèles animaux les plus utilisés dans la recherche sur la MSIÉ sont les souris DBA/1 et DBA/2. Ces dernières, suite à une crise induite par un stimulus auditif, tombent en arrêt respiratoire, et meurent si elles ne reçoivent pas de support ventilatoire<sup>361,362</sup>. Dans leur cas, une dysfonction du système sérotoninergique en serait responsable<sup>291,293,294</sup>. Nous avons donc voulu vérifier si notre modèle animal de rats présentait, comme chez la souris, des signes que le décès était causé par une dysfonction respiratoire. L'analyse histopathologique des poumons suite au décès subit pendant la crise épileptique tonico-clonique a révélé, tel que soupçonné cliniquement, la présence de signes d'œdème pulmonaire sévère. Ces résultats, bien qu'encourageants, ne permettaient en aucun cas d'exclure l'hypothèse cardiaque dans notre modèle, puisque l'œdème est une conséquence fréquente de défaillance cardiaque.

### *5.2.3.2 Hypothèse cardiaque*

Tel que mentionné dans la section 1.5.2.1, de nombreuses études ont montré un lien fort entre la MSIÉ et une dysfonction cardiaque. Tout d'abord, de l'arythmie, de la bradycardie et de la tachycardie sont fréquentes chez les patients durant une crise épileptique<sup>255-258</sup>. De plus, plusieurs gènes associés à des conditions cardiaques sont également mutés chez des patients

atteints de divers syndromes épileptiques. Un bon exemple est le syndrome du QT long, qui est lui-même associé à haut taux de mort subite. Également, 75 % des patients atteints du SQTl sont porteurs de mutations dans des gènes codant pour des canaux potassiques (*KCNQ1*, *KCNH2*) ou des canaux calciques (*SCN5A*)<sup>266-268</sup>. Ces gènes sont exprimés à la fois dans le cerveau et dans les tissus cardiaques, et des mutations dans les canaux calciques et potassiques expliquent également plusieurs formes d'épilepsies<sup>29,30,40-43</sup>. Un autre exemple intéressant est le syndrome de Dravet, qui est associé à de la mort subite fréquente. Les patients atteints de cette encéphalopathie épileptique présentent également des anomalies cardiaques telles que de la variabilité du rythme cardiaque et de la dispersion des QT. Encore une fois, ce sont des mutations dans un canal calcique, *SCN1A*, qui causent la maladie chez 80% des patients<sup>83,84,86,277,278</sup>. Nous avons donc poursuivi l'étude afin de vérifier la seconde hypothèse, à savoir qu'une dysfonction cardiaque était à l'origine des décès chez les rats SHR. L'analyse histopathologique des cœurs post-décès a révélé la présence de foyers de nécroses dans les ventricules, ce qui suggère une ischémie cardiaque avec défaillance. La cause de l'œdème semble donc bel et bien d'origine cardiogénique. Par la suite, afin de mieux caractériser la cause du décès des rats SHR, nous avons recueilli des données sur la pression artérielle, la fréquence cardiaque et les tracés ECG chez les rats avant, et pendant la crise épileptique grâce à des implants radio-téléométriques. Une pression artérielle et une fréquence cardiaque plus élevées chez les rats SHR comparativement aux rats Dahl ont été observées pendant la crise, et avant le décès. Bien que notre souche de rats contrôle, le Dahl, soit aussi reconnu pour être hypertendu, les résultats suggèrent que les SHR sont plus sensibles au stress induit par la crise. Ce phénomène rappelle un syndrome rare, mais bien caractérisé chez l'humain soit le syndrome de Takotsubo, qui est une forme de cardiomyopathie induite par un

stress. Cette cardiomyopathie apparaît chez certains patients suite à un stress émotionnel ou physique comme des crises épileptiques ou un status epilepticus<sup>363,364</sup>. À la lumière de ces résultats, nous croyons que les rats SHR sont de bons modèles de MSIÉ dont la cause principale est une dysfonction cardiaque.

#### *5.2.3.1 Perspectives*

Les résultats présentés dans le chapitre 4 sont préliminaires. Il s'agit en effet d'une première étude pilote dans le but de caractériser ce possible nouveau modèle génétique de susceptibilité à la MSIÉ. Les résultats préliminaires ainsi obtenus devront évidemment être confirmés chez un plus grand nombre d'animaux. Par ailleurs, une analyse exhaustive des données d'ECG permettra de mieux caractériser la dysfonction cardiaque responsable de la mort subite chez les rats SHR. Un des avantages de ce modèle est que les SHR sont des rats consanguins fréquemment utilisés dans les études génétiques sur l'hypertension et plusieurs souches congéniques de SHR sont disponibles. Vérifier si la mort subite se produit également chez ces souches congéniques permettra de déterminer quelles régions chromosomiques sont susceptibles d'être responsables de ce phénotype et éventuellement identifier le ou les gènes responsables. Une combinaison entre la compréhension physiologique et génétique de la MSIÉ chez les rats SHR permettra ainsi de découvrir de nouveaux facteurs de risques et de nouvelles méthodes de préventions chez les patients atteints d'épilepsie réfractaires.

## 5.2 Conclusion

Les épilepsies d'origines focales sont fréquentes, souvent difficiles à contrôler pharmacologiquement, et associées à un risque élevé de décès prématuré. La compréhension des mécanismes moléculaires et physiologiques qui sous-tendent ces formes d'épilepsies est essentielle afin d'éventuellement prévenir la morbidité et la mortalité associées à cette maladie dévastatrice. Grâce à une combinaison entre des approches humaines et animales, nous avons contribué à développer une meilleure connaissance de ces mécanismes. En premier lieu, nous avons confirmé l'importance du gène *DEPDC5* dans les épilepsies d'origines focales, puisque des mutations dans ce gène expliquent 5 % de notre cohorte. Les données plus récentes de la littérature ont montré que des mutations génétiques dans *DEPDC5*, mais également dans d'autres gènes impliqués dans la voie mTOR constituent une cause importante d'épilepsie partielle et en particulier d'épilepsie réfractaire. Par la suite, la découverte d'un nouveau modèle génétique de rats ÉLT a permis de démontrer l'importance du système galaninergique dans l'épileptogénèse et une des caractéristique majeure de la sclérose de l'hippocampe : la mort neuronale. Alors que la SH est généralement considérée comme une cause environnementale d'épilepsie du lobe temporal, notre étude a démontré que des facteurs génétiques sont importants afin de permettre le développement de la SH chez le rat. Enfin, nos résultats préliminaires suggèrent la découverte d'un nouveau modèle génétique de rats susceptibles à la MSIÉ, et ces mêmes résultats suggèrent fortement que le décès est d'origine cardiaque. En sommes, les résultats de notre travail présenté dans cette thèse proposent de nouvelles pistes afin d'expliquer les épilepsies d'origine focale et le développement de la SH associé à l'ÉLT. De plus, les nouveaux modèles génétiques présentés dans cette thèse offrent

de nouveaux outils d'investigation essentiels à la compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'épileptogénèse, et la mort subite et inexplicée en épilepsie.

## Références

1. Meinardi H, Scott R a., Reis R, Sander JW a S. The treatment gap in epilepsy: The current situation and ways forward. *Epilepsia*. 2001;42(1):136-149. doi:10.1046/j.1528-1157.2001.32800.x.
2. Tellez-Zenteno JF, Pondal-Sordo M, Matijevic S, Wiebe S. National and regional prevalence of self-reported epilepsy in Canada. *Epilepsia*. 2004;45(12):1623-1629. doi:10.1111/j.0013-9580.2004.24904.x.
3. Begley CE, Famulari M, Annegers JF, et al. The cost of epilepsy in the United States: an estimate from population-based clinical and survey data. *Epilepsia*. 2000;41(3):342-351. doi:10.1111/j.1528-1157.2000.tb00166.x.
4. Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med*. 2000;342(5):314-319. doi:10.1056/NEJM200002033420503.
5. Berg AT. Identification of Pharmacoresistant Epilepsy. *Neurol Clin*. 2009;27(4):1003-1013. doi:10.1016/j.ncl.2009.06.001.
6. Strzelczyk A, Reese JP, Dodel R, Hamer HM. A Systematic Review. *Pharmacoeconomics*. 2008;26(6):463-476.
7. Wiebe S, Bellhouse DR, Fallahay C, Eliasziw M. Burden of epilepsy: the Ontario Health Survey. *Can J Neurol Sci*. 1999;26(4):263-270.
8. Shorvon S, Tomson T. Sudden unexpected death in epilepsy. *Lancet*. 2011;378(9808):2028-2038.
9. Tolstykh GP, Cavazos JE. Potential mechanisms of sudden unexpected death in epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2013;26(3):410-414.
10. Ekman M, Forsgren L. Economic evidence in epilepsy: A review. *Eur J Heal Econ*. 2004;5(SUPPL. 1):36-42. doi:10.1007/s10198-005-0287-0.
11. Begley CE, Durgin TL. The direct cost of epilepsy in the United States: A systematic review of estimates. *Epilepsia*. 2015;56(9):n/a - n/a. doi:10.1111/epi.13084.
12. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475-482. doi:10.1111/epi.12550.
13. Sillanpää M, Koskenvuo M, Romanov K, Kaprio J. Genetic factors in epileptic seizures: evidence from a large twin population. *Acta Neurol Scand*. 1991;84(6):523-526.



14. Kjeldsen MJ, Corey LA, Christensen K, Friis ML. Epileptic seizures and syndromes in twins: The importance of genetic factors. *Epilepsy Res.* 2003;55(1-2):137-146. doi:10.1016/S0920-1211(03)00117-7.
15. Corey LA, Pellock JM, Kjeldsen MJ, Nakken KO. Importance of genetic factors in the occurrence of epilepsy syndrome type: A twin study. *Epilepsy Res.* 2011;97(1-2):103-111. doi:10.1016/j.eplepsyres.2011.07.018.
16. Kjeldsen MJ, Kyvik KO, Christensen K, Friis ML. Genetic and environmental factors in epilepsy: a population-based study of 11900 Danish twin pairs. *Epilepsy Res.* 2001;44(2-3):167-178.
17. Weckhuysen S, Korff CM. Epilepsy: Old syndromes, new genes. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2014;14(6). doi:10.1007/s11910-014-0447-7.
18. Ottman R, Annegers JF, Hauser W a, Kurland LT. Seizure risk in offspring of parents with generalized versus partial epilepsy. *Epilepsia.* 1989;30(2):157-161.
19. Annegers JF, Hauser W a, Anderson VE, Kurland LT. The risks of seizure disorders among relatives of patients with childhood onset epilepsy. *Neurology.* 1982;32(2):174-179. doi:10.1212/WNL.32.2.174.
20. Berkovic SF, Howell RA, Hay D a., Hopper JL. Epilepsies in twins: Genetics of the major epilepsy syndromes. *Ann Neurol.* 1998;43(4):435-445. doi:10.1002/ana.410430405.
21. Scheffer IE, Bhatia KP, Lopes-Cendes I, et al. Autosomal dominant frontal epilepsy misdiagnosed as sleep disorder. *Lancet.* 1994;343(8896):515-517. doi:10.1016/S0140-6736(94)91463-X.
22. Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, 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.* 1995;11(2):201-203. doi:10.1038/ng1095-201.
23. Aridon P, Marini C, Di Resta C, et al. Increased sensitivity of the neuronal nicotinic receptor alpha 2 subunit causes familial epilepsy with nocturnal wandering and ictal fear. *Am J Hum Genet.* 2006;79(August):342-350. doi:10.1086/506459.
24. De Fusco M, Becchetti A, Patrignani A, et al. The nicotinic receptor beta 2 subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet.* 2000;26(3):275-276. doi:10.1038/81566.

25. Heron SE, Smith KR, Bahlo M, et al. Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene *KCNT1* cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet.* 2012;44(11):1188-1190. doi:10.1038/ng.2440.
26. Phillips HA, Favre I, Kirkpatrick M, et al. *CHRNA2* is the second acetylcholine receptor subunit associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Am J Hum Genet.* 2001;68(1):225-231. doi:10.1086/316946.
27. Steinlein OK, Magnusson A, Stoodt J, et al. An insertion mutation of the *CHRNA4* gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Hum Mol Genet.* 1997;6(6):943-947. doi:10.1093/hmg/6.6.943.
28. Díaz-Otero F, Quesada M, Morales-Corraliza J, Martínez-Parra C, Gómez-Garre P, Serratos JM. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy with a mutation in the *CHRNA2* gene. *Epilepsia.* 2008;49(3):516-520. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01328.x.
29. Singh N a, Charlier C, Stauffer D, et al. A novel potassium channel gene, *KCNQ2*, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet.* 1998;18:25-29. doi:10.1038/ng0198-25.
30. Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, et al. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science.* 1998;279(January):403-406. doi:10.1126/science.279.5349.403.
31. Cossette P, Liu L, Brisebois K, et al. Mutation of *GABRA1* in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 2002;31(june):184-189. doi:10.1038/ng885.
32. Kananura C, Haug K, Sander T, et al. A splice-site mutation in *GABRG2* associated with childhood absence epilepsy and febrile convulsions. *Arch Neurol.* 2002;59:1137-1141. doi:10.1001/archneur.59.7.1137.
33. Ito M, Ohmori I, Nakahori T, Ouchida M, Ohtsuka Y. Mutation screen of *GABRA1*, *GABRB2* and *GABRG2* genes in Japanese patients with absence seizures. *Neurosci Lett.* 2005;383(3):220-224. doi:10.1016/j.neulet.2005.04.017.
34. Johnston AJ, Kang JQ, Shen W, et al. A Novel *GABRG2* mutation, p.R1367\*, in a family with GEFS+ and extended phenotypes. *Neurobiol Dis.* 2014;64(Estudio de asociacion(estudio de cohortes)):131-141. doi:10.1016/j.nbd.2013.12.013.
35. Sun H, Zhang A E Y, Liang A E J, et al. *SCN1A* , *SCN1B* , and *GABRG2* gene mutation analysis in Chinese families with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *J Hum Genet.* 2008;53(8):769-774. doi:10.1007/s10038-008-0306-y.

36. Dibbens LM, Feng HJ, Richards MC, et al. GABRD encoding a protein for extra- or peri- synaptic GABAA receptors is susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet.* 2004;13(13):1315-1319. doi:10.1093/hmg/ddh146.
37. Lachance-Touchette P, Martin C, Poulin C, Gravel M, Carmant L, Cossette P. Screening of GABRB3 in French-Canadian families with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia.* 2010;51(9):1894-1897. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02642.x.
38. Tanaka M, Olsen RW, Medina MT, et al. Hyperglycosylation and Reduced GABA Currents of Mutated GABRB3 Polypeptide in Remitting Childhood Absence Epilepsy. *Am J Hum Genet.* 2008;82(June):1249-1261. doi:10.1016/j.ajhg.2008.04.020.
39. Glatt K, Glatt H, Lalonde M. Structure and organization of GABRB3 and GABRA5. *Genomics.* 1997;41(41):63-69. doi:10.1006/geno.1997.4639.
40. Dorland M, Beemer FA, Kristian H, Amstel P Van. Mutations of SCN1A , encoding a neuronal sodium channel in two families with GEFS+2. *Nat Genet.* 2000;24:343-345. doi:10.1038/74159.
41. Herini ES, Gunadi, Harahap ISK, et al. Generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) spectrum: Clinical manifestations and SCN1A mutations in Indonesian patients. *Epilepsy Res.* 2010;90(1-2):132-139. doi:10.1016/j.eplepsyres.2010.04.003.
42. Escayg A, Heils A, MacDonald BT, Haug K, Sander T, Meisler MH. A novel SCN1A mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus--and prevalence of variants in patients with epilepsy. *Am J Hum Genet.* 2001;68(4):866-873. doi:10.1086/319524.
43. Pineda-Trujillo N, Carrizosa J, Cornejo W, et al. A novel SCN1A mutation associated with severe GEFS+ in a large South American pedigree. *Seizure.* 2005;14(2):123-128. doi:10.1016/j.seizure.2004.12.007.
44. Vanlerberghe C, Petit F, Malan V, et al. 15q11.2 microdeletion (BP1–BP2) and developmental delay, behaviour issues, epilepsy and congenital heart disease: A series of 52 patients. *Eur J Med Genet.* 2015;58(3):140-147. doi:10.1016/j.ejmg.2015.01.002.
45. Vincent a. K, Noor a., Janson a., et al. Identification of genomic deletions spanning the PCDH19 gene in two unrelated girls with intellectual disability and seizures. *Clin Genet.* 2012;82(6):540-545. doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01812.x.
46. Mefford HC, Yendle SC, Hsu C, et al. Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies. *Ann Neurol.* 2011;70(6):974-985. doi:10.1002/ana.22645.

47. Epilepsy Phenome/Genome Project Epi4k Consortium.. Copy number variant analysis from exome data in 349 patients with epileptic encephalopathy. *Ann Neurol*. 2015;78(2):323-328. doi:10.1002/ana.24457.
48. Ishida S, Picard F, Rudolf G, et al. Mutations of DEPDC5 cause autosomal dominant focal epilepsies. *Nat Publ Gr*. 2013;45(5):552-555. doi:10.1038/ng.2601.
49. Dibbens LM, de Vries B, Donatello S, et al. Mutations in DEPDC5 cause familial focal epilepsy with variable foci. *Nat Genet*. 2013;45(5):546-551. doi:10.1038/ng.2599.
50. Picard F, Makrythanasis P, Navarro V, et al. DEPDC5 mutations in families presenting as autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Neurology*. 2014;82(23):2101-2106. doi:10.1212/WNL.0000000000000488.
51. Lal D, Reinthaler EM, Schubert J, et al. DEPDC5 mutations in genetic focal epilepsies of childhood. *Ann Neurol*. 2014;75(5):788-792. doi:10.1002/ana.24127.
52. Papandreou A, McTague A, Trump N, et al. *GABRB3* mutations: a new and emerging cause of early infantile epileptic encephalopathy. *Dev Med Child Neurol*. 2015:n/a - n/a. doi:10.1111/dmcn.12976.
53. Allen AS, Berkovic SF, Cossette P, et al. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*. 2013;501(7466):217-221. doi:10.1038/nature12439.
54. Elia M, Falco M, Ferri R, et al. *CDKL5* mutations in boys with severe encephalopathy and early-onset intractable epilepsy. *Neurology*. 2008;71(13):997-999. doi:10.1212/01.wnl.0000326592.37105.88.
55. Mei D, Marini C, Novara F, et al. Xp22.3 genomic deletions involving the *CDKL5* gene in girls with early onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia*. 2010;51(4):647-654. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02308.x.
56. Evans JC, Archer HL, Colley JP, et al. Early onset seizures and Rett-like features associated with mutations in *CDKL5*. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(10):1113-1120. doi:10.1038/sj.ejhg.5201451.
57. Castrén M, Gaily E, Tengström C, Lähdetie J, Archer H, Ala-Mello S. Epilepsy caused by *CDKL5* mutations. *Eur J Paediatr Neurol*. 2011;15(1):65-69. doi:10.1016/j.ejpn.2010.04.005.
58. Lund C, Brodtkorb E, Øye AM, Røsby O, Selmer KK. *CHD2* mutations in Lennox-Gastaut syndrome. *Epilepsy Behav*. 2014;33:18-21. doi:10.1016/j.yebeh.2014.02.005.

59. Thomas RH, Zhang LM, Carvill GL, et al. CHD2 myoclonic encephalopathy is frequently associated with self-induced seizures. *Neurology*. 2015;84(9):951-958. doi:10.1212/WNL.0000000000001305.
60. Suls A, Jaehn J a., Kecskés A, et al. De novo loss-of-function mutations in CHD2 cause a fever-sensitive myoclonic epileptic encephalopathy sharing features with dravet syndrome. *Am J Hum Genet*. 2013;93(5):967-975. doi:10.1016/j.ajhg.2013.09.017.
61. Carvill GL, Heavin SB, Yendle SC, et al. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nat Genet*. 2013;45(7):825-830. doi:10.1038/ng.2646.
62. Yuan H, Hansen KB, Zhang J, et al. Functional analysis of a de novo GRIN2A missense mutation associated with early-onset epileptic encephalopathy. *Nat Commun*. 2014;5:3251. doi:10.1038/ncomms4251.
63. Carvill GL, Regan BM, Yendle SC, et al. GRIN2A mutations cause epilepsy-aphasia spectrum disorders. *Nat Genet*. 2013;45(9):1073-1076. doi:10.1038/ng.2727.
64. Lesca G, Rudolf G, Bruneau N, et al. GRIN2A mutations in acquired epileptic aphasia and related childhood focal epilepsies and encephalopathies with speech and language dysfunction. *Nat Genet*. 2013;45(9):1061-1066. doi:10.1038/ng.2726.
65. Syrbe S, Hedrich UBS, Riesch E, et al. De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy. *Nat Genet*. 2015;47(4):393-399. doi:10.1038/ng.3239.
66. Kearney JA. KCNA2-Related Epileptic Encephalopathy. *Pediatr Neurol Briefs*. 2015;29(4):27. doi:10.15844/pedneurbriefs-29-4-2.
67. Abidi A, Devaux JJ, Molinari F, et al. A recurrent KCNQ2 pore mutation causing early onset epileptic encephalopathy has a moderate effect on M current but alters subcellular localization of Kv7 channels. *Neurobiol Dis*. 2015;80:80-92. doi:10.1016/j.nbd.2015.04.017.
68. Kato M, Yamagata T, Kubota M, et al. Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia*. 2013;54(7):1282-1287. doi:10.1111/epi.12200.
69. Weckhuysen S, Mandelstam S, Suls A, et al. KCNQ2 encephalopathy: Emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Ann Neurol*. 2012;71(1):15-25. doi:10.1002/ana.22644.

70. Milh M, Boutry-Kryza N, Sutura-Sardo J, et al. Similar early characteristics but variable neurological outcome of patients with a de novo mutation of KCNQ2. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:80. doi:10.1186/1750-1172-8-80.
71. Depienne C, Leguern E. PCDH19-related infantile epileptic encephalopathy: An unusual X-linked inheritance disorder. *Hum Mutat.* 2012;33(4):627-634. doi:10.1002/humu.22029.
72. Dibbens LM, Kneen R, Bayly M a., et al. Recurrence risk of epilepsy and mental retardation in females due to parental mosaicism of PCDH19 mutations. *Neurology.* 2011;76:1514-1519. doi:10.1212/WNL.0b013e318217e7b6.
73. Hynes K, Tarpey P, Dibbens LM, et al. Epilepsy and mental retardation limited to females with PCDH19 mutations can present de novo or in single generation families. *J Med Genet.* 2010;47:211-216. doi:10.1136/jmg.2009.068817.
74. Depienne C, Trouillard O, Bouteiller D, et al. Mutations and deletions in PCDH19 account for various familial or isolated epilepsies in females. *Hum Mutat.* 2011;32(1):1-17. doi:10.1002/humu.21373.
75. Depienne C, Bouteiller D, Keren B, et al. Sporadic infantile epileptic encephalopathy caused by mutations in PCDH19 resembles Dravet syndrome but mainly affects females. *PLoS Genet.* 2009;5(2):e1000381. doi:10.1371/journal.pgen.1000381.
76. Lalani SR, Zhang J, Schaaf CP, et al. Mutations in PURA cause profound neonatal hypotonia, seizures, and encephalopathy in 5q31.3 microdeletion syndrome. *Am J Hum Genet.* 2014;95(5):579-583. doi:10.1016/j.ajhg.2014.09.014.
77. Hunt D, Leventer RJ, Simons C, et al. Whole exome sequencing in family trios reveals de novo mutations in PURA as a cause of severe neurodevelopmental delay and learning disability. *J Med Genet.* 2014:1-8. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102798.
78. Molinari F, Raas-Rothschild A, Rio M, et al. Impaired mitochondrial glutamate transport in autosomal recessive neonatal myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet.* 2005;76(2):334-339. doi:10.1086/427564.
79. Molinari F, Kaminska a., Fiermonte G, et al. Mutations in the mitochondrial glutamate carrier SLC25A22 in neonatal epileptic encephalopathy with suppression bursts. *Clin Genet.* 2009;76(2):188-194. doi:10.1111/j.1399-0004.2009.01236.x.
80. Cohen R, Basel-Vanagaite L, Goldberg-Stern H, et al. Two siblings with early infantile myoclonic encephalopathy due to mutation in the gene encoding mitochondrial glutamate/H<sup>+</sup> symporter SLC25A22. *Eur J Paediatr Neurol.* 2014;18(6):801-805. doi:10.1016/j.ejpn.2014.06.007.

81. Kodera H, Nakamura K, Osaka H, et al. De Novo Mutations in SLC35A2 Encoding a UDP-Galactose Transporter Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy. *Hum Mutat.* 2013;34(11105137):1708-1714. doi:10.1002/humu.22446.
82. Epilepsy Phenome/Genome Project Epi4k Consortium. De novo mutations in synaptic transmission genes including DNMI1 cause epileptic encephalopathies. *Am J Hum Genet.* 2014;95(4):360-370. doi:10.1016/j.ajhg.2014.08.013.
83. Selmer KK, Eriksson AS, Brandal K, Egeland T, Tallaksen C. Parental SCN1A mutation mosaicism in familial Dravet syndrome. *Clin Genet.* 2009;76:398-403. doi:10.1111/j.1399-0004.2009.01208.x.
84. Depienne C, Trouillard O, Saint-Martin C, et al. Spectrum of SCN1A gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *J Med Genet.* 2009;46(3):183-191. doi:10.1136/jmg.2008.062323.
85. Marini C, Scheffer IE, Nabbout R, et al. SCN1A duplications and deletions detected in Dravet syndrome: implications for molecular diagnosis. *Epilepsia.* 2009;50(7):1670-1678. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02013.x.
86. Shi X, Yasumoto S, Nakagawa E, Fukasawa T, Uchiya S, Hirose S. Missense mutation of the sodium channel gene SCN2A causes Dravet syndrome. *Brain Dev.* 2009;31(10):758-762. doi:10.1016/j.braindev.2009.08.009.
87. Liao Y, Anttonen a. K, Liukkonen E, et al. SCN2A mutation associated with neonatal epilepsy, late-onset episodic ataxia, myoclonus, and pain. *Neurology.* 2010;75(16):1454-1458. doi:10.1212/WNL.0b013e3181f8812e.
88. Nakamura K, Kato M, Osaka H, et al. Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology.* 2013;81(11):992-998. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a43e57.
89. Kobayashi K, Ohzono H, Shinohara M, et al. Acute encephalopathy with a novel point mutation in the SCN2A gene. *Epilepsy Res.* 2012;102(1-2):109-112. doi:10.1016/j.epilepsyres.2012.04.016.
90. O'Brien JE, Meisler MH. Sodium channel SCN8A (Nav1.6): properties and de novo mutations in epileptic encephalopathy and intellectual disability. *Front Genet.* 2013;4(October):213. doi:10.3389/fgene.2013.00213.
91. Ohba C, Kato M, Takahashi S, et al. Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo SCN8A mutations. *Epilepsia.* 2014;55:994-1000. doi:10.1111/epi.12668.
92. S. W, L. D, P. H, et al. STXBP1 mutation screening in a cohort of patients with early onset epileptic encephalopathies. *Epilepsia.* 2009;50:18.

93. Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, et al. De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet.* 2008;40(6):782-788. doi:10.1038/ng.150.
94. Carvill GL, Weckhuysen S, McMahon JM, et al. GABRA1 and STXBP1: Novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology.* 2014;82(14):1245-1253. doi:10.1212/WNL.0000000000000291.
95. Sampaio M, Rocha R, Biskup S, Leão M. Novel STXBP1 Mutations in 2 Patients With Early Infantile Epileptic Encephalopathy. *J Child Neurol.* 2013;30(March):1-4. doi:10.1177/0883073813479169.
96. Stražičar BG, Neubauer D, Paro Panjan D, Writzl K. Early-onset epileptic encephalopathy with hearing loss in two siblings with TBC1D24 recessive mutations. *Eur J Paediatr Neurol.* 2014:2-7. doi:10.1016/j.ejpn.2014.12.011.
97. Falace A, Filipello F, La Padula V, et al. TBC1D24, an ARF6-interacting protein, is mutated in familial infantile myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet.* 2010;87(3):365-370. doi:10.1016/j.ajhg.2010.07.020.
98. Afawi Z, Mandelstam S, Korczyn AD, et al. TBC1D24 mutation associated with focal epilepsy, cognitive impairment and a distinctive cerebro-cerebellar malformation. *Epilepsy Res.* 2013;105(1-2):240-244. doi:10.1016/j.eplepsyres.2013.02.005.
99. Valduga M, Philippe C, Lambert L, et al. WWOX and severe autosomal recessive epileptic encephalopathy: first case in the prenatal period. *J Hum Genet.* 2015. doi:10.1038/jhg.2015.17.
100. Ben-Salem S, Al-Shamsi AM, John A, Ali BR, Al-Gazali L. A novel whole exon deletion in WWOX gene causes early epilepsy, intellectual disability and optic atrophy. *J Mol Neurosci.* 2015;56(1):17-23. doi:10.1007/s12031-014-0463-8.
101. Jouvenceau A, Eunson LH, Spauschus A, et al. Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet.* 2001;358(9284):801-807. doi:10.1016/S0140-6736(01)05971-2.
102. Imbrici P, Jaffe SL, Eunson LH, et al. Dysfunction of the brain calcium channel Cav2.1 in absence epilepsy and episodic ataxia. *Brain.* 2004;127(12):2682-2692. doi:10.1093/brain/awh301.
103. Chen Y, Lu J, Pan H, et al. Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann Neurol.* 2003;54(2):239-243. doi:10.1002/ana.10607.



104. Liang J, Zhang Y, Chen Y, et al. Common polymorphisms in the CACNA1H gene associated with childhood absence epilepsy in Chinese Han population. *Ann Hum Genet.* 2007;71(3):325-335. doi:10.1111/j.1469-1809.2006.00332.x.
105. Liang J, Zhang Y, Wang J, et al. New variants in the CACNA1H gene identified in childhood absence epilepsy. *Neurosci Lett.* 2006;406(1-2):27-32. doi:10.1016/j.neulet.2006.06.073.
106. Ohmori I, Ouchida M, Miki T, et al. A CACNB4 mutation shows that altered Cav2.1 function may be a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurobiol Dis.* 2008;32(3):349-354. doi:10.1016/j.nbd.2008.07.017.
107. Escayg A, De Waard M, Lee DD, et al. Coding and Noncoding Variation of the Human Calcium-Channel  $\beta$ 4-Subunit Gene CACNB4 in Patients with Idiopathic Generalized Epilepsy and Episodic Ataxia. *Am J Hum Genet.* 2000;66(5):1531-1539. doi:10.1086/302909.
108. Etemad S, Campiglio M, Obermair GJ, Flucher BE. The juvenile myoclonic epilepsy mutant of the calcium channel  $\beta$ (4) subunit displays normal nuclear targeting in nerve and muscle cells. *Channels (Austin).* 2014;8(4):334-343. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24875574>.
109. Saint-Martin C, Gauvain G, Teodorescu G, et al. Two novel CLCN2 mutations accelerating chloride channel deactivation are associated with idiopathic generalized epilepsy. *Hum Mutat.* 2009;30(3):397-405. doi:10.1002/humu.20876.
110. Kleefuss-Lie A, Friedl W, Cichon S, et al. CLCN2 variants in idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet.* 2009;41(9):954-955. doi:10.1038/ng0909-954.
111. Stogmann E, Lichtner P, Baumgartner C, et al. Mutations in the CLCN2 gene are a rare cause of idiopathic generalized epilepsy syndromes. *Neurogenetics.* 2006;7(4):265-268. doi:10.1007/s10048-006-0057-x.
112. Haug K, Warnstedt M, Alekov AK, et al. Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat Genet.* 2003;33(4):527-532. doi:10.1038/ng1121.
113. Annesi F, Gambardella A, Michelucci R, et al. Mutational analysis of EFHC1 gene in Italian families with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia.* 2007;48(9):1686-1690. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01173.x.
114. Suzuki T, Delgado-Escueta A V, Aguan K, et al. Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 2004;36(8):842-849. doi:10.1038/ng1393.

115. Ma S, Blair M a., Abou-Khalil B, Lagrange AH, Gurnett C a., Hedera P. Mutations in the GABRA1 and EFHC1 genes are rare in familial juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Res.* 2006;71:129-134. doi:10.1016/j.eplepsyres.2006.06.001.
116. Ma S, Blair M a., Abou-Khalil B, Lagrange AH, Gurnett C a., Hedera P. Mutations in the GABRA1 and EFHC1 genes are rare in familial juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Res.* 2006;71:129-134. doi:10.1016/j.eplepsyres.2006.06.001.
117. Lachance-Touchette P, Brown P, Meloche C, et al. Novel  $\alpha 1$  and  $\gamma 2$  GABAA receptor subunit mutations in families with idiopathic generalized epilepsy. *Eur J Neurosci.* 2011;34(2):237-249. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07767.x.
118. Lucarini N, Verrotti A, Napolioni V, Bosco G, Curatolo P. Genetic Polymorphisms and Idiopathic Generalized Epilepsies. *Pediatr Neurol.* 2007;37(Mc):157-164. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2007.06.001.
119. 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.* 2006;15(16):2533-2541. doi:10.1093/hmg/ddl174.
120. Tanaka M, Olsen RW, Medina MT, et al. Hyperglycosylation and reduced GABA currents of mutated GABRB3 polypeptide in remitting childhood absence epilepsy. *Am J Hum Genet.* 2008;82(6):1249-1261. doi:10.1016/j.ajhg.2008.04.020.
121. Audenaert D, Schwartz E, Claeys KG, et al. A novel GABRG2 mutation associated with febrile seizures. *Neurology.* 2006;67(4):687-690. doi:10.1212/01.wnl.0000230145.73496.a2.
122. Agostinelli S, Traverso M, Accorsi P, et al. Early-onset absence epilepsy: SLC2A1 gene analysis and treatment evolution. *Eur J Neurol.* 2013;20(5):856-859. doi:10.1111/j.1468-1331.2012.03871.x.
123. Suls A, Mullen S, Weber YG, et al. Early-onset absence epilepsy caused by mutations in the glucose transporter GLUT1. *Ann Neurol.* 2009;66(3):415-419. doi:10.1002/ana.21724.
124. Sáenz A, Galán J, Caloustian C, et al. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy in a Spanish family with a Ser252Phe mutation in the CHRNA4 gene. *Arch Neurol.* 1999;56:1004-1009. doi:10.1001/archneur.56.8.1004.
125. Rozycka A, Skorupska E, Kostyrko A, Trzeciak WH. Evidence for S284L mutation of the CHRNA4 in a white family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2003;44(8):1113-1117. doi:10.1046/j.1528-1157.2003.07603.x.

126. Hirose S, Iwata H, Akiyoshi H, et al. A novel mutation of CHRNA4 responsible for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Neurology*. 1999;53(8):1749-1753. doi:10.1212/WNL.53.8.1749.
127. Chen Y, Wu L, Fang Y, et al. A novel mutation of the nicotinic acetylcholine receptor gene CHRNA4 in sporadic nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 2009;83(2-3):152-156. doi:10.1016/j.eplepsyres.2008.10.009.
128. Wang MY, Liu XZ, Wang J, Wu LW. A novel mutation of the nicotinic acetylcholine receptor gene CHRNA4 in a Chinese patient with non-familial nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 2014;108(10):1927-1931. doi:10.1016/j.eplepsyres.2014.08.024.
129. Chen ZH, Zhai QX, Gui J, et al. Mutational analysis of CHRNB2 and CHRNA2 genes in southern Chinese population with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Chinese J Med Genet*. 2011;28(1):14-18. doi:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2011.01.004.
130. Yamamoto T, Shimojima K, Sangu N, et al. Single Nucleotide Variations in CLCN6 Identified in Patients with Benign Partial Epilepsies in Infancy and/or Febrile Seizures. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118946. doi:10.1371/journal.pone.0118946.
131. Martin C, Meloche C, Rioux M-F, et al. A recurrent mutation in DEPDC5 predisposes to focal epilepsies in the French-Canadian population. *Clin Genet*. 2013;(3):1-5. doi:10.1111/cge.12311.
132. Guipponi M, Chentouf A, Webling KEB, et al. Galanin pathogenic mutations in temporal lobe epilepsy. *Hum Mol Genet*. 2015;(February):1-10. doi:10.1093/hmg/ddv060.
133. Lemke JR, Lal D, Reinthaler EM, et al. Mutations in GRIN2A cause idiopathic focal epilepsy with rolandic spikes. *Nat Genet*. 2013;45(9):1067-1072. doi:10.1038/ng.2728.
134. Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, et al. Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet*. 2002;30(3):335-341. doi:10.1038/ng832.
135. Ottman R, Winawer MR, Kalachikov S, et al. LGI1 mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology*. 2004;62(7):1120-1126. doi:10.1212/01.WNL.0000120098.39231.6E.
136. Striano P, Busolin G, Santulli L, et al. Familial temporal lobe epilepsy with psychic auras associated with a novel LGI1 mutation. *Neurology*. 2011;76(13):1173-1176. doi:10.1212/WNL.0b013e318212ab2e.

137. Kawamata J, Ikeda A, Fujita Y, Usui K, Shimohama S, Takahashi R. Mutations in LGI1 gene in Japanese families with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy: the first report from Asian families. *Epilepsia*. 2010;51(4):690-693. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02309.x.
138. Nakashima M, Saitsu H, Takei N, et al. Somatic mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. *Ann Neurol*. 2015. doi:10.1002/ana.24444.
139. Lim JS, Kim W-I, Kang H-C, et al. Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. *Nat Med*. 2015;(November 2014):1-9. doi:10.1038/nm.3824.
140. Heron SE, Grinton BE, Kivity S, et al. PRRT2 mutations cause benign familial infantile epilepsy and infantile convulsions with choreoathetosis syndrome. *Am J Hum Genet*. 2012;90(1):152-160. doi:10.1016/j.ajhg.2011.12.003.
141. Okumura A, Shimojima K, Kubota T, et al. PRRT2 mutation in Japanese children with benign infantile epilepsy. *Brain Dev*. 2013;35(7):641-646. doi:10.1016/j.braindev.2012.09.015.
142. Marini C, Conti V, Mei D, et al. PRRT2 mutations in familial infantile seizures, paroxysmal dyskinesia, and hemiplegic migraine. *Neurology*. 2012;79(21):2109-2114. doi:10.1212/WNL.0b013e3182752ca2.
143. Striano P, Bordo L, Lispi ML, et al. A novel SCN2A mutation in family with benign familial infantile seizures. *Epilepsia*. 2006;47(1):218-220. doi:10.1111/j.1528-1167.2006.00392.x.
144. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for Revised Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes. *Epilepsia*. 1989;30(4):389-399. doi:10.1111/j.1528-1157.1989.tb05316.x.
145. Engel J. ILAE Commission Report A Proposed Diagnostic Scheme for People with Epileptic Seizures and with Epilepsy : Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology De mo ( V isi t htt p : / / w lit me rg er . co m ) ( V isi t htt p : / / w ww De fsp . 2001;42(6):796-803.
146. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010;51(4):676-685. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x.
147. Wiebe S. Epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Can J Neurol Sci*. 2000;27 Suppl 1:S6-S10; discussion S20-S21. doi:10830320.

148. Wass CT, Rajala MM, Hughes JM, et al. Long-term follow-up of patients treated surgically for medically intractable epilepsy: Results in 291 patients treated at Mayo Clinic Rochester between July 1972 and March 1985. *Mayo Clin Proc.* 1996;71(11):1105-1113. doi:10.1016/S0025-6196(11)63285-0.
149. Guldvog B, Loyning Y, Hauglie-Hanssen E, Flood S, Bjornaes H. Surgical treatment for partial epilepsy among Norwegian children and adolescents. *Epilepsia.* 1994;35(3):554-565. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1157.1994.tb02475.x.
150. Keene DL, Higgins MJ, Ventureyra EC. Outcome and life prospects after surgical management of medically intractable epilepsy in patients under 18 years of age. *Childs Nerv Syst.* 1997;13(10):530-535. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9403201.
151. Rougier A, Dartigues JF, Commenges D, Claverie B, Loiseau P, Cohadon F. A longitudinal assessment of seizure outcome and overall benefit from 100 cortectomies for epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1992;55(9):762-767. doi:10.1136/jnnp.55.9.762.
152. Daniel RT, Chandy MJ. Epilepsy surgery : overview Of forty years experience. *Neurol India.* 1999;47(2):98-103.
153. Semah F, Picot MC, Adam C, et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology.* 1998;51(5):1256-1262. doi:10.1212/WNL.53.2.437-e.
154. Spencer SS. Neural Networks in Human Epilepsy : Evidence of and Implications for Treatment. 2002;43(3):219-227.
155. Berg AT, Scheffer IE. New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. *Epilepsia.* 2011;52(6):1058-1062. doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03101.x.
156. Barkovich a. J, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: Update 2012. *Brain.* 2012;135(5):1348-1369. doi:10.1093/brain/aws019.
157. Thom M. Review : Hippocampal sclerosis in epilepsy : a neuropathology review. 2014:520-543. doi:10.1111/nan.12150.
158. Al Sufiani F, Ang LC. Neuropathology of Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Res Treat.* 2012;2012:1-13. doi:10.1155/2012/624519.
159. Engel J. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist.* 2001;7(4):340-352. doi:10.1177/107385840100700410.

160. Bouchet C, Cazauvieilh C. De l'épilepsie considérée dans ses rapports avec l'aliénation mentale. Recherche sur la nature et le siège de ces deux maladies. *Arch Gen Med.* 1825;510-542.
161. Thom M. Hippocampal sclerosis: Progress since sommer. *Brain Pathol.* 2009;19(4):565-572. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00201.x.
162. Braak H, Braak E, Yilmazer D, Bohl J. Functional anatomy of human hippocampal formation and related structures. *J Child Neurol.* 1996;11(4):265-275.
163. Steve TA, Jirsch JD, Gross DW. Quantification of subfield pathology in hippocampal sclerosis : A systematic review and meta-analysis. *Epilepsy Res.* 2014;108(8):1279-1285. doi:10.1016/j.eplepsyres.2014.07.003.
164. Blümcke I, Thom M, Armstrong DD et al. International concensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia* 2013; 54(7): 1315-1329.
165. Pitkänen A, Kharatishvili I, Karhunen H, et al. Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia.* 2007;48(SUPPL. 2):13-20. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01063.x.
166. Shorvon S. The concept of symptomatic epilepsy and the complexities of assigning cause in epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2014;32:1-8. doi:10.1016/j.yebeh.2013.12.025.
167. Pitkänen A, Lukasiuk K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol.* 2011;10(2):173-186. doi:10.1016/S1474-4422(10)70310-0.
168. Pitkänen A. Therapeutic approaches to epileptogenesis - Hope on the horizon. *Epilepsia.* 2010;51(SUPPL. 3):2-17. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02602.x.
169. Pitkänen A, Lukasiuk K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2009;14(1 SUPPL. 1):16-25. doi:10.1016/j.yebeh.2008.09.023.
170. Pitkänen A, Sutula T. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol.* 2002;1(3):173-181. doi:10.1016/S1474-4422(02)00073-X.
171. Dingledine R, Varvel NH, Dudek FE. When and how do seizures kill neurons, and is cell death relevant to epileptogenesis? *Adv Exp Med Biol.* 2014;813:109-122. doi:10.1007/978-94-017-8914-1\_9.
172. Lukasiuk K, Dabrowski M, Adach A, Pitkänen A. Epileptogenesis-related genes revisited. *Prog Brain Res.* 2006;158:223-241. doi:10.1016/S0079-6123(06)58011-2.

173. Brooks-Kayal AR, Raol YH, Russek SJ. Alteration of Epileptogenesis Genes. *Neurotherapeutics*. 2009;6(2):312-318. doi:10.1016/j.nurt.2009.01.019.
174. Itoh T, Satou T, Nishida S, Hashimoto S, Ito H. Immature and mature neurons coexist among glial scars after rat traumatic brain injury. *Neurol Res*. 2007;29(7):734-742. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18183647>.
175. Vezzani A, Baram TZ. New Roles for Interleukin-1 Beta in the Mechanisms of Epilepsy. *Epilepsy Curr*. 2007;7(2):45-50. doi:10.1111/j.1535-7511.2007.00165.x.
176. Wetherington J, Serrano G, Dingledine R. Astrocytes in the Epileptic Brain. *Neuron*. 2008;58(2):168-178. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.002.
177. Hailer NP, Grampp A, Nitsch R. Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion : a quantitative bromodeoxyuridine-labelling study. *Eur J Neurosci*. 1999;11:3359-3364. doi:10.1046/j.1460-9568.1999.00808.x.
178. Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci*. 1996;16(8):2508-2521.
179. Miwa T, Furukawa S, Nakajima K, Furukawa Y, Kohsaka S. Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *J Neurosci Res*. 1997;50(6):1023-1029. doi:10.1002/(sici)1097-4547(19971215)50:6<1023::aid-jnr13>3.3.co;2-s.
180. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996;19(8):312-318. doi:10.1016/0166-2236(96)10049-7.
181. Stollg G, Jander S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol*. 1999;58(3):233-247. doi:10.1016/S0301-0082(98)00083-5.
182. Hermann A, Maisel M, Liebau S, et al. Mesodermal cell types induce neurogenesis from adult human hippocampal progenitor cells. *J Neurochem*. 2006;98(2):629-640. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03916.x.
183. Scharfman HE, Goodman JH, Sollas a L. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci*. 2000;20(16):6144-6158. doi:20/16/6144 [pii].
184. Mathern GW, Pretorius JK, Babb TL. Quantified patterns of mossy fiber sprouting and neuron densities in hippocampal and lesional seizures. *J Neurosurg*. 1995;82(2):211-219. doi:10.3171/jns.1995.82.2.0211.

185. Mathern GW, Babb TL, Mischel PS, et al. Childhood generalized and mesial temporal epilepsies demonstrate different amounts and patterns of hippocampal neuron loss and mossy fibre synaptic reorganization. *Brain*. 1996;119(3):965-987. doi:10.1093/brain/119.3.965.
186. Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius JK, Yeoman KM, Kuhlman P a. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res*. 1996;26(1):151-161. doi:10.1016/S0920-1211(96)00052-6.
187. Rao MS, Hattiangady B, Shetty AK. Fetal hippocampal CA3 cell grafts enriched with FGF-2 and BDNF exhibit robust long-term survival and integration and suppress aberrant mossy fiber sprouting in the injured middle-aged hippocampus. *Neurobiol Dis*. 2006;21(2):276-290. doi:10.1016/j.nbd.2005.07.009.
188. Grone BP, Baraban SC. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. *Nat Neurosci*. 2015;18(3):339-343. doi:10.1038/nn.3934.
189. Schwartzkroin P a, Roper SN, Wenzel HJ. Cortical dysplasia and epilepsy: animal models. *Adv Exp Med Biol*. 2004;548:145-174.
190. Wong M. Animal models of focal cortical dysplasia and tuberous sclerosis complex: Recent progress toward clinical applications. *Epilepsia*. 2009;50(SUPPL. 9):34-44. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02295.x.
191. D'Arcangelo G. From human tissue to animal models: Insights into the pathogenesis of cortical dysplasia. *Epilepsia*. 2009;50(SUPPL. 9):28-33. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02290.x.
192. Bradford HF. Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol*. 1995;47(6):477-511. doi:10.1016/0301-0082(95)00030-5.
193. Pun RYK, Rolle IJ, LaSarge CL, et al. Excessive Activation of mTOR in Postnatally Generated Granule Cells Is Sufficient to Cause Epilepsy. *Neuron*. 2012;75(6):1022-1034. doi:10.1016/j.neuron.2012.08.002.
194. Ryan K, Backos DS, Reigan P, Patel M. Post-Translational Oxidative Modification and Inactivation of Mitochondrial Complex I in Epileptogenesis. *J Neurosci*. 2012;32(33):11250-11258. doi:10.1523/JNEUROSCI.0907-12.2012.
195. Mercado-Gómez O, Landgrave-Gómez J, Arriaga-Avila V, Nebreda-Corona A, Guevara-Guzmán R. Role of TGF- $\beta$  signaling pathway on Tenascin C protein upregulation in a pilocarpine seizure model. *Epilepsy Res*. 2014;108(10):1694-1704. doi:10.1016/j.eplepsyres.2014.09.019.



196. Jobe PC, Mishra PK, Ludvig N, Dailey JW. Scope and contribution of genetic models to an understanding of the epilepsies. *Crit Rev Neurobiol*. 1991;6(3):183-220. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1773452>.
197. Loscher W. Genetic animal models of epilepsy as a unique resource for the evaluation of anticonvulsant drugs. A review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1984;6(9):531-547. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6439966>.
198. Noebels JL. Single-gene models of epilepsy. *Adv Neurol*. 1999;79:227-238. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10514817>.
199. Puranam RS, McNamara JO. Seizure disorders in mutant mice: relevance to human epilepsies. *Curr Opin Neurobiol*. 1999;9(3):281-287. [papers2://publication/uuid/2C7EDDFE-9B6A-4235-8954-832BD0FEEA53](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10514817/).
200. Schauwecker PE. Role of genetic influences in animal models of status. *Epilepsia*. 2007;48:21-23. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01340.x.
201. Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*. 2011;20(5):359-368. doi:10.1016/j.seizure.2011.01.003.
202. Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014;10:1693-1705. doi:10.2147/NDT.S50371.
203. Martín E, Pozo M. Animal models for the development of new neuropharmacological therapeutics in the status epilepticus. *Curr Neuropharmacol*. 2006;4(1):33-40. doi:10.2174/157015906775203002.
204. Goddard G V., McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol*. 1969;25(3):295-330. doi:10.1016/0014-4886(69)90128-9.
205. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972;32(3):281-294. doi:10.1016/0013-4694(72)90177-0.
206. Löscher W, Cramer S, Ebert U. Differences in kindling development in seven outbred and inbred rat strains. *Exp Neurol*. 1998;154(2):551-559. doi:10.1006/exnr.1998.6948.
207. McIntyre DC, Kelly ME, Dufresne C. FAST and SLOW amygdala kindling rat strains: Comparison of amygdala, hippocampal, piriform and perirhinal cortex kindling. *Epilepsy Res*. 1999;35(3):197-209. doi:10.1016/S0920-1211(99)00012-1.

208. Hashimoto R, Voigt B, Ishimaru Y, et al. Identification of QTLs Involved in the Development of Amygdala Kindling in the Rat. *Exp Anim*. 2013;62 (3):181-187. doi:10.1538/expanim.62.181.
209. Gorter J, van Vliet E, Lopes da Silva FH. Which insights have we gained from the kindling and post-status epilepticus models? *J Neurosci Methods*. 2015. doi:10.1016/j.jneumeth.2015.03.025.
210. Pitkänen A, Halonen T. Prevention of epilepsy. *Trends Pharmacol Sci*. 1998;19(7):253-255. doi:10.1016/S0140-6736(71)91281-5.
211. Simonato M, Brooks-Kayal AR, Engel J, et al. The challenge and promise of anti-epileptic therapy development in animal models. *Lancet Neurol*. 2014;13(9):949-960. doi:10.1016/S1474-4422(14)70076-6.
212. Brandt C, Ebert U, Löscher W. Epilepsy induced by extended amygdala-kindling in rats: Lack of clear association between development of spontaneous seizures and neuronal damage. *Epilepsy Res*. 2004;62(2-3):135-156. doi:10.1016/j.eplepsyres.2004.08.008.
213. Gorter JA, Van Vliet EA, Aronica E, Lopes Da Silva FH. Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. *Eur J Neurosci*. 2001;13(4):657-669. doi:10.1046/j.1460-9568.2001.01428.x.
214. Gorter J, Gonc PM, Vliet E Van, Aronica E, Lopes FH, Lucassen PJ. Neuronal Cell Death in a Rat Model for Mesial Temporal Lobe Epilepsy Is Induced by the Initial Status Epilepticus and Not by Later Repeated Spontaneous Seizures Reports cell loss in septum. 2003;44(2000):647-658. doi:10.1046/j.1528-1157.2003.53902.x.
215. Polli RS, Malheiros JM, Dos Santos R, et al. Changes in Hippocampal Volume are Correlated with Cell Loss but Not with Seizure Frequency in Two Chronic Models of Temporal Lobe Epilepsy. *Front Neurol*. 2014;5:111. doi:10.3389/fneur.2014.00111.
216. Golden GT, Smith GG, Ferraro TN, Reyes PF. Rat strain and age differences in kainic acid induced seizures. *Epilepsy Res*. 1995;20(94):151-159. doi:10.1016/0920-1211(94)00079-C.
217. McKhann GM, Wenzel HJ, Robbins C a., Sosunov a. a., Schwartzkroin P a. Mouse strain differences in kainic acid sensitivity, seizure behavior, mortality, and hippocampal pathology. *Neuroscience*. 2003;122:551-561. doi:10.1016/S0306-4522(03)00562-1.
218. Langer M, Brandt C, Löscher W. Marked strain and substrain differences in induction of status epilepticus and subsequent development of neurodegeneration, epilepsy, and

- behavioral alterations in rats. Strain and substrain differences in an epilepsy model in rats. *Epilepsy Res.* 2011;96(3):207-224. doi:10.1016/j.eplepsyres.2011.06.005.
219. Nadler JV. Kainic acid: Neurophysiological and neurotoxic actions. *Life Sci.* 1979;24(4):289-300. doi:10.1016/0024-3205(79)90325-4.
220. Murakami, S. Takemoto T, Shimizu S. Studies on the effective principles of *Dtagenae simplex* Aq. I. Separation of the effective fraction by liquid chromatography. *J Pharm Soc Jpn.* 1953;73:1026-1028.
221. Shinozaki H, Konishi S. Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones. *Brain Res.* 1970;24:368-371. doi:10.1016/0006-8993(70)90122-8.
222. Ben-Ari Y, Lagowska J, Tremblay E, Le Gal La Salle G. A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res.* 1979;163(1):176-179. doi:10.1016/0006-8993(79)90163-X.
223. Lothman EW, Collins RC, Ferrendelli JA. Kainic acid-induced limbic seizures: electrophysiologic studies. *Neurology.* 1981;31(7):806-812. doi:10.1212/WNL.31.7.806.
224. Lévesque M, Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013;37(10):2887-2899. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.10.011.
225. Bertram EH. Functional anatomy of spontaneous seizures in a rat model of limbic epilepsy. *Epilepsia.* 1997;38(1):95-105. doi:10.1111/j.1528-1157.1997.tb01083.x.
226. Lévesque M, Avoli M, Bernard C. chemoconvulsant administration. *J Neurosci Methods.* 2015. doi:10.1016/j.jneumeth.2015.03.009.
227. Lothman EW, Bertram EH, Bekenstein JW, Perlin JB. Self-sustaining limbic status epilepticus induced by “continuous” hippocampal stimulation: electrographic and behavioral characteristics. *Epilepsy Res.* 1989;3(2):107-119. doi:10.1016/0920-1211(89)90038-7.
228. Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: Rewiring the brain. *Prog Neurobiol.* 2004;73(1):1-60. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.03.009.
229. Nissinen J, Halonen T, Koivisto E, Pitkänen a. A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat. *Epilepsy Res.* 2000;38(2-3):177-205.

230. Löscher W, Brandt C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol Rev.* 2010;62(4):668-700. doi:10.1124/pr.110.003046.668.
231. Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, Berrettini WH. Differential susceptibility to seizures induced by systemic kainic acid treatment in mature DBA/2J and C57BL/6J mice. *Epilepsia.* 1995;36(3):301-307. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7614915](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7614915).
232. Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, et al. Fine mapping of a seizure susceptibility locus on mouse Chromosome 1: Nomination of Kcnj10 as a causative gene. *Mamm Genome.* 2004;15:239-251. doi:10.1007/s00335-003-2270-3.
233. Ferraro TN, Smith GG, Schwebel CL, et al. Confirmation of multiple seizure susceptibility QTLs on chromosome 15 in C57BL/6J and DBA/2J inbred mice. *Physiol Genomics.* 2010;42A(June 2010):1-7. doi:10.1152/physiolgenomics.00096.2010.
234. Ferraro TN, Smith GG, Schwebel CL, et al. Quantitative trait locus for seizure susceptibility on mouse chromosome 5 confirmed with reciprocal congenic strains. *Physiol Genomics.* 2007;31:458-462. doi:10.1152/physiolgenomics.00123.2007.
235. Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, et al. Mapping murine loci for seizure response to kainic acid. *Mamm Genome.* 1997;8(3):200-208. doi:10.1007/s003359900389.
236. Xu B, McIntyre DC, Fahnestock M, Racine RJ. Strain differences affect the induction of status epilepticus and seizure-induced morphological changes. *Eur J Neurosci.* 2004;20:403-418. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03489.x.
237. Schauwecker PE, Steward O. Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: implications for gene targeting approaches. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(April):4103-4108. doi:10.1073/pnas.94.8.4103.
238. McLin JP, Steward O. Comparison of seizure phenotype and neurodegeneration induced by systemic kainic acid in inbred, outbred, and hybrid mouse strains. *Eur J Neurosci.* 2006;24(April):2191-2202. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05111.x.
239. Schauwecker PE. Congenic strains provide evidence that a mapped locus on chromosome 15 influences excitotoxic cell death. *Genes, Brain Behav.* 2011;10:100-110. doi:10.1111/j.1601-183X.2010.00644.x.
240. Lorenzana A, Chancer Z, Schauwecker PE. A quantitative trait locus on chromosome 18 is a critical determinant of excitotoxic cell death susceptibility. *Eur J Neurosci.* 2007;25(January 2007):1998-2008. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05443.x.

241. Schauwecker PE, Williams RW, Santos JB. Genetic control of sensitivity to hippocampal cell death induced by kainic acid: a quantitative trait loci analysis. *J Comp Neurol*. 2004;477(April):96-107. doi:10.1002/cne.20245.
242. Kong S, Lorenzana A, Deng Q, McNeill TH, Schauwecker PE. Variation in Galr1 expression determines susceptibility to excitotoxin-induced cell death in mice. *Genes, Brain Behav*. 2008;7:587-598. doi:10.1111/j.1601-183X.2008.00395.x.
243. Elyse Schauwecker P. Galanin receptor 1 deletion exacerbates hippocampal neuronal loss after systemic kainate administration in mice. *PLoS One*. 2010;5(12):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0015657.
244. Schmidt D. Drug treatment of epilepsy: options and limitations. *Epilepsy Behav*. 2009;15(1):56-65. doi:10.1016/j.yebeh.2009.02.030.
245. Keezer MR, Sisodiya SM, Sander JW. Comorbidities of epilepsy: current concepts and future perspectives. *Lancet Neurol*. 2015;4422(15). doi:10.1016/S1474-4422(15)00225-2.
246. Ottman R, Lipton RB, Ettinger AB, et al. Comorbidities of epilepsy: Results from the Epilepsy Comorbidities and Health (EPIC) survey. *Epilepsia*. 2011;52:308-315. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02927.x.
247. Téllez-Zenteno JF, Ronquillo LH, Wiebe S. Sudden unexpected death in epilepsy: Evidence-based analysis of incidence and risk factors. *Epilepsy Res*. 2005;65(1-2):101-115. doi:10.1016/j.eplepsyres.2005.05.004.
248. Tomson T, Nashef L, Ryvlin P. Sudden unexpected death in epilepsy: current knowledge and future directions. *Lancet Neurol*. 2008;7(11):1021-1031. doi:10.1016/S1474-4422(08)70202-3.
249. Walczak TS, Leppik IE, D'Amelio M, et al. Incidence and risk factors in sudden unexpected death in epilepsy: a prospective cohort study. *Neurology*. 2001;56:519-525.
250. Nashef L. Sudden unexpected death in epilepsy: terminology and definitions. *Epilepsia*. 1997;38(11 Suppl):S6-S8. doi:10.1111/j.1528-1157.1997.tb06130.x.
251. Nashef L, Hindocha N, Makoff A. Risk factors in sudden death in epilepsy (SUDEP): The quest for mechanisms. *Epilepsia*. 2007;48(5):859-871. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01082.x.
252. Tomson T, Walczak T, Sillanpaa M, Sander JW a S. Sudden unexpected death in epilepsy: A review of incidence and risk factors. *Epilepsia*. 2005;46(SUPPL. 11):54-61. doi:10.1111/j.1528-1167.2005.00411.x.

253. Massey C, Sowers LP, Dlouhy BJ, Richerson GB. Mechanisms of sudden unexpected death in epilepsy: the pathway to prevention. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(5):271-282. doi:10.1038/nrneurol.2014.64.
254. Surges R, Sander J. Sudden unexpected death in epilepsy: mechanisms, prevalence, and prevention. 2012:201-207. doi:10.1097/WCO.0b013e3283506714.
255. Nashef L, Walker F, Allen P, Sander JW, Shorvon SD, Fish DR. Apnoea and bradycardia during epileptic seizures: relation to sudden death in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1996;60:297-300. doi:10.1136/jnnp.60.3.297.
256. Rugg-Gunn FJ, Simister RJ, Squirrell M, Holdright DR, Duncan PJS. Cardiac arrhythmias in focal epilepsy: A prospective long-term study. *Lancet*. 2004;364(9452):2212-2219. doi:10.1016/S0140-6736(04)17594-6.
257. Surges R, Thijs RD, Tan HL, Sander JW. Sudden unexpected death in epilepsy: risk factors and potential pathomechanisms. *Nat Rev Neurol*. 2009;5(9):492-504. doi:10.1038/nrneurol.2009.118.
258. Velagapudi P, Turagam M, Laurence T, Kocheril A. Cardiac arrhythmias and sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP). *Pacing Clin Electrophysiol*. 2012;35(3):363-370. doi:10.1111/j.1540-8159.2011.03276.x.
259. Neufeld G, Lazar JM, Chari G, et al. Cardiac repolarization indices in epilepsy patients. *Cardiology*. 2009;114(4):255-260. doi:10.1159/000233236.
260. Surges R, Adjei P, Kallis C, et al. Pathologic cardiac repolarization in pharmaco-resistant epilepsy and its potential role in sudden unexpected death in epilepsy: A case-control study. *Epilepsia*. 2010;51(2):233-242. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02330.x.
261. Dogan EA, Dogan U, Yildiz GU, et al. Evaluation of cardiac repolarization indices in well-controlled partial epilepsy: 12-Lead ECG findings. *Epilepsy Res*. 2010;90(1-2):157-163. doi:10.1016/j.eplepsyres.2010.04.008.
262. Rejdak K, Rubaj A, Głowniak A, et al. Analysis of ventricular late potentials in signal-averaged ECG of people with epilepsy. *Epilepsia*. 2011;52(11):2118-2124. doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03270.x.
263. Goldenberg I, Moss AJ. Long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(24):2291-2300. doi:10.1016/j.jacc.2008.02.068.
264. Johnson JN, Hofman N, Haglund CM, Cascino GD, Wilde a. a M, Ackerman MJ. Identification of a possible pathogenic link between congenital long QT syndrome and epilepsy. *Neurology*. 2009;72(3):224-231. doi:10.1212/01.wnl.0000335760.02995.ca.

265. Tester DJ, Ackerman MJ. Genetics of Long Qt Syndrome. *Methodist Debaquey Cardiovasc J*. 2014;10(1):29-33.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4051331&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
266. Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2005;2(5):507-517. doi:10.1016/j.hrthm.2005.01.020.
267. Splawski I, Shen J, Timothy KW, et al. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation*. 2000;102(10):1178-1185. doi:10.1161/01.CIR.102.10.1178.
268. Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, et al. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA*. 2005;294(23):2975-2980. doi:10.1001/jama.294.23.2975.
269. Tu E, Bagnall RD, Duflou J, Semsarian C. Post-Mortem Review and Genetic Analysis of Sudden Unexpected Death in Epilepsy (SUDEP) Cases. *Brain Pathol*. 2011;21(2):201-208. doi:10.1111/j.1750-3639.2010.00438.x.
270. Casimiro MC, Knollmann BC, Yamoah EN, et al. Targeted point mutagenesis of mouse *Kcnq1*: phenotypic analysis of mice with point mutations that cause Romano-Ward syndrome in humans. *Genomics*. 2004;84(3):555-564.  
 doi:10.1016/j.ygeno.2004.06.007.
271. Goldman AM, Glasscock E, Yoo J, Chen TT, Klassen TL and JL Noebels. Arrhythmia in Heart and Brain KCNQ1 Mutations Link Epilepsy and Sudden Unexplained Death. *Sci Transl Med*. 2009;1(2):1-19. doi:10.1126/scitranslmed.3000289.Arrhythmia.
272. Glasscock E, Yoo JW, Chen TT, Klassen TL, Noebels JL. Kv1.1 potassium channel deficiency reveals brain-driven cardiac dysfunction as a candidate mechanism for sudden unexplained death in epilepsy. *J Neurosci*. 2010;30(15):5167-5175.  
 doi:10.1523/JNEUROSCI.5591-09.2010.
273. Guerrini R. Dravet syndrome: The main issues. *Eur J Paediatr Neurol*. 2012;16(SUPPL. 1):S1-S4. doi:10.1016/j.ejpn.2012.04.006.
274. Dravet C. The core Dravet syndrome phenotype. *Epilepsia*. 2011;52(SUPPL. 2):3-9.  
 doi:10.1111/j.1528-1167.2011.02994.x.
275. Delogu AB, Spinelli A, Battaglia D, et al. Electrical and autonomic cardiac function in patients with Dravet syndrome. *Epilepsia*. 2011;52(SUPPL. 2):55-58.  
 doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03003.x.

276. Ergul Y, Ekici B, Tatli B, Nisli K, Ozmen M. QT and P wave dispersion and heart rate variability in patients with Dravet syndrome. *Acta Neurol Belg.* 2013;113(2):161-166. doi:10.1007/s13760-012-0140-z.
277. Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet.* 2001;68(6):1327-1332. doi:10.1086/320609.
278. Marini C, Mei D, Temudo T, et al. Idiopathic epilepsies with seizures precipitated by fever and SCN1A abnormalities. *Epilepsia.* 2007;48(9):1678-1685. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01122.x.
279. Kalume F, Westenbroek RE, Cheah CS, et al. Sudden unexpected death in a mouse model of Dravet syndrome. *J Clin Invest.* 2013;123(4):1798-1808. doi:10.1172/JCI66220.
280. Seyal M, Bateman LM. Ictal apnea linked to contralateral spread of temporal lobe seizures: Intracranial EEG recordings in refractory temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2009;50(12):2557-2562. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02245.x.
281. Moseley BD, Nickels K, Britton J, Wirrell E. How common is ictal hypoxemia and bradycardia in children with partial complex and generalized convulsive seizures? *Epilepsia.* 2010;51(7):1219-1224. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02490.x.
282. Schuele SU, Afshari M, Afshari ZS, et al. Ictal central apnea as a predictor for sudden unexpected death in epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2011;22(2):401-403. doi:10.1016/j.yebeh.2011.06.036.
283. So EL, Sam MC, Lagerlund TL. Postictal central apnea as a cause of SUDEP: evidence from near-SUDEP incident. *Epilepsia.* 2000;41(11):1494-1497. doi:10.1111/j.1528-1157.2000.tb00128.x.
284. Pezzella M, Striano P, Ciampa C, Errichiello L, Penza P, Striano S. Severe pulmonary congestion in a near miss at the first seizure: further evidence for respiratory dysfunction in sudden unexpected death in epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2009;14(4):701-702. doi:10.1016/j.yebeh.2009.02.012.
285. Tao JX, Qian S, Baldwin M, et al. SUDEP, suspected positional airway obstruction, and hypoventilation in postictal coma. *Epilepsia.* 2010;51(11):2344-2347. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02719.x.
286. Tavee J, Morris H. Severe postictal laryngospasm as a potential mechanism for sudden unexpected death in epilepsy: a near-miss in an EMU. *Epilepsia.* 2008;49(12):2113-2117. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01781.x.



287. Bateman LM, Li CS, Seyal M. Ictal hypoxemia in localization-related epilepsy: Analysis of incidence, severity and risk factors. *Brain*. 2008;131(12):3239-3245. doi:10.1093/brain/awn277.
288. Bateman LM, Spitz M, Seyal M. Ictal hypoventilation contributes to cardiac arrhythmia and SUDEP: Report on two deaths in video-EEG-monitored patients. *Epilepsia*. 2010;51(5):916-920. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02513.x.
289. Faingold CL, Randall M, Tupal S. DBA/1 mice exhibit chronic susceptibility to audiogenic seizures followed by sudden death associated with respiratory arrest. *Epilepsy Behav*. 2010;17(4):436-440. doi:10.1016/j.yebeh.2010.02.007.
290. Venit EL, Shepard BD, Seyfried TN. Oxygenation prevents sudden death in seizure-prone mice. *Epilepsia*. 2004;45(8):993-996. doi:10.1111/j.0013-9580.2004.02304.x.
291. Uteshev V V., Tupal S, Mhaskar Y, Faingold CL. Abnormal serotonin receptor expression in DBA/2 mice associated with susceptibility to sudden death due to respiratory arrest. *Epilepsy Res*. 2010;88(2-3):183-188. doi:10.1016/j.eplepsyres.2009.11.004.
292. Tupal S, Faingold CL. Evidence supporting a role of serotonin in modulation of sudden death induced by seizures in DBA/2 mice. *Epilepsia*. 2006;47(1):21-26. doi:10.1111/j.1528-1167.2006.00365.x.
293. Zeng C, Long X, Cotten JF, et al. Fluoxetine prevents respiratory arrest without enhancing ventilation in DBA/1 mice. *Epilepsy Behav*. 2015;45:1-7. doi:10.1016/j.yebeh.2015.02.013.
294. Faingold CL, Randall M, Mhaskar Y, Uteshev V V. Differences in serotonin receptor expression in the brainstem may explain the differential ability of a serotonin agonist to block seizure-induced sudden death in DBA/2 vs. DBA/1 mice. *Brain Res*. 2011;1418:104-110. doi:10.1016/j.brainres.2011.08.043.
295. Budzinska K. Serotonergic modulation of cortical and respiratory responses to episodic hypoxia. *Eur J Med Res*. 2009;14 Suppl 4:32-37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20156721>.
296. Hodges MR, Richerson GB. The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO<sub>2</sub> chemoreception, and thermoregulation. *J Appl Physiol*. 2010;108(5):1425-1432. doi:10.1152/jappphysiol.01270.2009.
297. Buchanan GF, Richerson GB. Central serotonin neurons are required for arousal to CO<sub>2</sub>. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol 107.; 2010:16354-16359. doi:10.1073/pnas.1004587107.

298. Bagdy G, Kecskemeti V, Riba P, Jakus R. Serotonin and epilepsy. *J Neurochem*. 2007;100(4):857-873. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04277.x.
299. Albano C, Cupello A, Mainardi P, Scarrone S, Favale E. Successful treatment of epilepsy with serotonin reuptake inhibitors: proposed mechanism. *Neurochem Res*. 2006;31(4):509-514. doi:10.1007/s11064-006-9045-7.
300. Okada M, Kaneko S, Hirano T, et al. Effects of zonisamide on extracellular levels of monoamine and its metabolite, and on Ca<sup>2+</sup> dependent dopamine release. *Epilepsy Res*. 1992;13(2):113-119. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1464296>.
301. Dailey JW, Reith ME, Yan QS, Li MY, Jobe PC. Anticonvulsant doses of carbamazepine increase hippocampal extracellular serotonin in genetically epilepsy-prone rats: dose response relationships. *Neurosci Lett*. 1997;227(1):13-16. doi:10.1016/S0304-3940(97)00288-7.
302. Ahmad S, Fowler LJ, Whitton PS. Lamotrigine, carbamazepine and phenytoin differentially alter extracellular levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and amino acids. *Epilepsy Res*. 2005;63(2-3):141-149. doi:10.1016/j.eplepsyres.2005.02.002.
303. Bateman LM, Li CS, Lin TC, Seyal M. Serotonin reuptake inhibitors are associated with reduced severity of ictal hypoxemia in medically refractory partial epilepsy. *Epilepsia*. 2010;51(10):2211-2214. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02594.x.
304. Scheffer IE, Phillips HA, O'Brien CE, et al. *Familial Partial Epilepsy with Variable Foci: A New Partial Epilepsy Syndrome with Suggestion of Linkage to Chromosome 2*. *Annals of neurology* 44, 890-899 (1998). doi:10.1002/ana.410440607.
305. Baulac S, Baulac M. Advances on the Genetics of Mendelian Idiopathic Epilepsies. *Clin Lab Med*. 2010;30(4):911-929. doi:10.1016/j.cll.2010.07.008.
306. Klein KM, O'Brien TJ, Praveen K, et al. Familial focal epilepsy with variable foci mapped to chromosome 22q12: Expansion of the phenotypic spectrum. *Epilepsia*. 2012;53(8):151-155. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03585.x.
307. Berkovic SF, Serratosa JM, Phillips H a., et al. Familial partial epilepsy with variable foci: Clinical features and linkage to chromosome 22q12. *Epilepsia*. 2004;45(9):1054-1060. doi:10.1111/j.0013-9580.2004.30502.x.
308. Xiong L, Labuda M, Li DS, et al. Mapping of a gene determining familial partial epilepsy with variable foci to chromosome 22q11-q12. *Am J Hum Genet*. 1999;65(6):1698-1710. doi:10.1086/302649.

309. Kinirons P, Verlaan DJ, Dubé MP, et al. A novel locus for idiopathic generalized epilepsy in French-Canadian families maps to 10p11. *Am J Med Genet Part A*. 2008;146:578-584. doi:10.1002/ajmg.a.32139.
310. Dupré N, Bouchard J-P, Brais B, Rouleau GA. Hereditary ataxia, spastic paraparesis and neuropathy in the French-Canadian population. *Can J Neurol Sci*. 2006;33(2):149-157.
311. Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack AD, et al. A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science*. 2013;340(6136):1100-1106. doi:10.1126/science.1232044.
312. Téllez-Zenteno JF, Hernández-Ronquillo L. A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Res Treat*. 2012;2012:1-5.
313. Sendrowski K, Sobaniec W. Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. *Pharmacol Reports*. 2013;65:555-565. doi:10.1016/S1734-1140(13)71033-8.
314. Wieser H-G. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*. 2004;45(6):695-714. doi:10.1111/j.0013-9580.2004.09004.x.
315. Haberman RP, Samulski RJ, McCown TJ. Attenuation of seizures and neuronal death by adeno-associated virus vector galanin expression and secretion. *Nat Med*. 2003;9(8):1076-1080. doi:10.1038/nm901.
316. Editorial. Rats! *Nat Methods*. 2010;7(6):413. doi:10.1038/nmeth0610-413.
317. Tchekalarova J, Pechlivanova D, Atanasova T, Markova P, Lozanov V, Stoynev A. Diurnal variations in depression-like behavior of Wistar and spontaneously hypertensive rats in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2011;20(2):277-285. doi:10.1016/j.yebeh.2010.12.021.
318. Petkova Z, Tchekalarova J, Pechlivanova D, et al. Treatment with melatonin after status epilepticus attenuates seizure activity and neuronal damage but does not prevent the disturbance in diurnal rhythms and behavioral alterations in spontaneously hypertensive rats in kainate model of temporal lobe epile. *Epilepsy Behav*. 2014;31:198-208. doi:10.1016/j.yebeh.2013.12.013.
319. Jupp B, Williams J, Binns D, et al. Hypometabolism precedes limbic atrophy and spontaneous recurrent seizures in a rat model of TLE. *Epilepsia*. 2012;53(7):1233-1244. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03525.x.
320. Medina-Ceja L, Pardo-Peña K, Ventura-Mejía C. Evaluation of behavioral parameters and mortality in a model of temporal lobe epilepsy induced by intracerebroventricular

- pilocarpine administration. *Neuroreport*. 2014;25:875-879.  
doi:10.1097/WNR.0000000000000207.
321. Brandt C, Löscher W. Antiepileptic efficacy of lamotrigine in phenobarbital-resistant and -responsive epileptic rats: A pilot study. *Epilepsy Res*. 2014;108(7):1145-1157.  
doi:10.1016/j.eplepsyres.2014.05.008.
322. Schauwecker PE. Genetic basis of kainate-induced excitotoxicity in mice: Phenotypic modulation of seizure-induced cell death. *Epilepsy Res*. 2003;55:201-210.  
doi:10.1016/S0920-1211(03)00115-3.
323. Schauwecker PE. Susceptibility to excitotoxic and metabolic striatal neurodegeneration in the mouse is genotype dependent. *Brain Res*. 2005;1040:112-120.  
doi:10.1016/j.brainres.2005.01.067.
324. Saar K, Mazarati AM, Mahlapuu R, et al. Anticonvulsant activity of a nonpeptide galanin receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:7136-7141.  
doi:10.1073/pnas.102163499.
325. Mazarati A, Lu X. Regulation of limbic status epilepticus by hippocampal galanin type 1 and type 2 receptors. *Neuropeptides*. 2005;39:277-280.  
doi:10.1016/j.npep.2004.12.003.
326. Mazarati a M, Hohmann JG, Bacon a, et al. Modulation of hippocampal excitability and seizures by galanin. *J Neurosci*. 2000;20(16):6276-6281.
327. McColl CD, Jacoby AS, Shine J, Iismaa TP, Bekkers JM. Galanin receptor-1 knockout mice exhibit spontaneous epilepsy, abnormal EEGs and altered inhibition in the hippocampus. *Neuropharmacology*. 2006;50(2006):209-218.  
doi:10.1016/j.neuropharm.2005.09.001.
328. Bartfai T, Lu X, Badie-Mahdavi H, et al. Galmic, a nonpeptide galanin receptor agonist, affects behaviors in seizure, pain, and forced-swim tests. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(28):10470-10475. doi:10.1073/pnas.0403802101.
329. McCown TJ. Adeno-Associated Virus Vector-Mediated Expression and Constitutive Secretion of Galanin Suppresses Limbic Seizure Activity. *Neurotherapeutics*. 2009;6(2):307-311. doi:10.1016/j.nurt.2009.01.004.
330. Lu X, Roberts E, Xia F, et al. GalR2-positive allosteric modulator exhibits anticonvulsant effects in animal models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(34):15229-15234.

331. Nikitidou L, Torp M, Fjord-Larsen L, Kusk P, Wahlberg LU, Kokaia M. Encapsulated galanin-producing cells attenuate focal epileptic seizures in the hippocampus. *Epilepsia*. 2014;55(1):167-174. doi:10.1111/epi.12470.
332. Ledri XM, Sørensen AT, Madsen MG, et al. Differential Effect of Neuropeptides on Excitatory Synaptic Transmission in Human Epileptic Hippocampus. 2015;35(26):9622-9631. doi:10.1523/JNEUROSCI.3973-14.2015.
333. Hitiris N, Mohanraj R, Norrie J, Brodie MJ. Mortality in epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2007;10(3):363-376. doi:10.1016/j.yebeh.2007.01.005.
334. Mohanraj R, Norrie J, Stephen LJ, Kelly K, Hitiris N, Brodie MJ. Mortality in adults with newly diagnosed and chronic epilepsy: a retrospective comparative study. *Lancet Neurol*. 2006;5(6):481-487. doi:10.1016/S1474-4422(06)70448-3.
335. Christensen J, Pedersen CB, Sidenius P, Olsen J, Vestergaard M. Long-term mortality in children and young adults with epilepsy--A population-based cohort study. *Epilepsy Res*. 2015;114:81-88. doi:10.1016/j.eplepsyres.2015.05.001.
336. Thom M, Seetah S, Sisodiya S, Koeppe M, Scaravilli F. Sudden and unexpected death in epilepsy (SUDEP): Evidence of acute neuronal injury using HSP-70 and c-Jun immunohistochemistry. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2003;29(2):132-143. doi:10.1046/j.1365-2990.2003.00452.x.
337. Kloster R, Engelskjøn T. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP): a clinical perspective and a search for risk factors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;67(4):439-444.
338. Leestma JE, Annegers JF, Brodie MJ, et al. Sudden unexplained death in epilepsy: Observations from a large clinical development program. *Epilepsia*. 1997;38(1):47-55. doi:10.1111/j.1528-1157.1997.tb01076.x.
339. Pravenec M, Křen V, Landa V, et al. Recent progress in the genetics of spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res*. 2014;63 Suppl 1:S1-S8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24564651>.
340. Pravenec M, Kurtz TW. Recent advances in genetics of the spontaneously hypertensive rat. *Curr Hypertens Rep*. 2010;12(1):5-9. doi:10.1007/s11906-009-0083-9.
341. Pfeffer JM, Pfeffer M a, Fishbein MC, Frohlich ED. Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am J ...* 1979;237(4):H461-H468. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/495731> \n <http://ajpheart.physiology.org/content/237/4/H461.short>.

342. Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1997;272(11):H2313-H2319.
343. Wong M. A critical review of mTOR inhibitors and epilepsy: from basic science to clinical trials. *Expert Rev Neurother.* 2013;13(6):657-669. doi:10.1586/ern.13.48.
344. Crino PB. mTOR: A pathogenic signaling pathway in developmental brain malformations. *Trends Mol Med.* 2011;17(12):734-742. doi:10.1016/j.molmed.2011.07.008.
345. Puffenberger EG, Strauss K a., Ramsey KE, et al. Polyhydramnios, megalencephaly and symptomatic epilepsy caused by a homozygous 7-kilobase deletion in LYK5. *Brain.* 2007;130:1929-1941. doi:10.1093/brain/awm100.
346. Lizcano JM, Göransson O, Toth R, et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 2004;23(4):833-843. doi:10.1038/sj.emboj.7600110.
347. Amiri A, Cho W, Zhou J, et al. Pten deletion in adult hippocampal neural stem/progenitor cells causes cellular abnormalities and alters neurogenesis. *J Neurosci.* 2012;32(17):5880-5890. doi:10.1523/JNEUROSCI.5462-11.2012.
348. Choi Y-J, Di Nardo A, Kramvis I, et al. Tuberous sclerosis complex proteins control axon formation. *Genes Dev.* 2008;22(18):2485-2495. doi:10.1101/gad.1685008.
349. Meikle L, Talos DM, Onda H, et al. A mouse model of tuberous sclerosis: neuronal loss of Tsc1 causes dysplastic and ectopic neurons, reduced myelination, seizure activity, and limited survival. *J Neurosci.* 2007;27(21):5546-5558. doi:10.1523/JNEUROSCI.5540-06.2007.
350. Scheffer IE, Heron SE, Regan BM, et al. Mutations in mammalian target of rapamycin regulator DEPDC5 cause focal epilepsy with brain malformations. *Ann Neurol.* 2014;75(5):782-787. doi:10.1002/ana.24126.
351. Baulac S, Ishida S, Marsan E, et al. Familial focal epilepsy with focal cortical dysplasia due to DEPDC5 mutations. *Ann Neurol.* 2015;77(4):675-683. doi:10.1002/ana.24368.
352. Ricos M, Hodgson B, Pippucci T, et al. Mutations in the mTOR pathway regulators NPRL2 and NPRL3 cause focal epilepsy. *Ann Neurol.* 2015:1-12. doi:10.1002/ana.24547.
353. Rudemiller NP, Mattson DL. Candidate genes for hypertension: Insights from the Dahl S rat. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015:ajprenal.00092.2015. doi:10.1152/ajprenal.00092.2015.

354. Grahame NJ. Selected lines and inbred strains. Tools in the hunt for the genes involved in alcoholism. *Alcohol Res Health*. 2000;24(3):159-163. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11199285>.
355. Schauwecker PE. Modulation of cell death by mouse genotype: differential vulnerability to excitatory amino acid-induced lesions. *Exp Neurol*. 2002;178:219-235. doi:10.1006/exnr.2002.8038.
356. Schauwecker PE, Williams RW, Santos JB. Genetic control of sensitivity to hippocampal cell death induced by kainic acid: a quantitative trait loci analysis. *J Comp Neurol*. 2004;477(1):96-107. doi:10.1002/cne.20245.
357. Ben-Ari Y. Galanin and Glibenclamide Modulate the Anoxic Release of Glutamate in Rat CA3 Hippocampal Neurons. *Eur J Neurosci*. 1990;2(1):62-68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106103>.
358. Zini S, Roisin MP, Langel U, Bartfai T, Ben-Ari Y. Galanin reduces release of endogenous excitatory amino acids in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol*. 1993;245(1):1-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682961>.
359. Mazarati AM, Halaszi E, Telegdy G. Anticonvulsive effects of galanin administered into the central nervous system upon the picrotoxin-kindled seizure syndrome in rats. *Brain Res*. 1992;589(1):164-166.
360. Lerner J, Sankar R, Mazarati A. Galanin and epilepsy. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:1864-1871. doi:10.1007/s00018-008-8152-9.
361. Faingold CL, Randall M, Tupal S. DBA/1 mice exhibit chronic susceptibility to audiogenic seizures followed by sudden death associated with respiratory arrest. *Epilepsy Behav*. 2010;17(4):436-440. doi:10.1016/j.yebeh.2010.02.007.
362. Faingold CL, Tupal S, Randall M. Prevention of seizure-induced sudden death in a chronic SUDEP model by semichronic administration of a selective serotonin reuptake inhibitor. *Epilepsy Behav*. 2011;22(2):186-190. doi:10.1016/j.yebeh.2011.06.015.
363. Dupuis M, van Rijckevorsel K, Evrard F, Dubuisson N, Dupuis F, Van Robays P. Takotsubo syndrome (TKS): a possible mechanism of sudden unexplained death in epilepsy (SUDEP). *Seizure*. 2012;21(1):51-54. doi:10.1016/j.seizure.2011.09.006.
364. Stöllberger C, Wegner C, Finsterer J. Seizure-associated Takotsubo cardiomyopathy. *Epilepsia*. 2011;52(11):160-167. doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03185.x.
365. Holtzman D, Obana K, Olson J. Hyperthermia-induced seizures in the rat pup: a model for febrile convulsions in children. *Science*. 1981;213(4511):1034-1036. doi:10.1126/science.7268407.

366. Jensen FE, Wang C. Hypoxia-induced hyperexcitability in vivo and in vitro in the immature hippocampus. *Epilepsy Res.* 1996;26(1):131-140. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0920-1211(96)00049-6.
367. Scantlebury MH, Ouellet P-L, Psarropoulou C, Carmant L. Freeze lesion-induced focal cortical dysplasia predisposes to atypical hyperthermic seizures in the immature rat. *Epilepsia.* 2004;45(6):592-600. doi:10.1111/j.0013-9580.2004.51503.x.
368. Ito S, Ogiwara I, Yamada K, et al. Mouse with Nav1.1 haploinsufficiency, a model for Dravet syndrome, exhibits lowered sociability and learning impairment. *Neurobiol Dis.* 2013;49(1):29-40. doi:10.1016/j.nbd.2012.08.003.
369. Yu YE, Wen L, Silva J, et al. Lgi1 null mutant mice exhibit myoclonic seizures and CA1 neuronal hyperexcitability. *Hum Mol Genet.* 2010;19(9):1702-1711. doi:10.1093/hmg/ddq047.
370. Baulac S, Ishida S, Mashimo T, et al. A rat model for LGI1-related epilepsies. *Hum Mol Genet.* 2012;21(16):3546-3557. doi:10.1093/hmg/dds184.
371. Heuermann RJ, Jaramillo TC, Ying S-W, et al. Reduction of thalamic and cortical Ih by deletion of TRIP8b produces a mouse model of human absence epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2016;85:81-92. doi:10.1016/j.nbd.2015.10.005.
372. Ishida S, Sakamoto Y, Nishio T, et al. Kcna1-mutant rats dominantly display myokymia, neuromyotonia and spontaneous epileptic seizures. *Brain Res.* 2012;1435:154-166. doi:10.1016/j.brainres.2011.11.023.
373. Bumanglag A V., Sloviter RS. Minimal latency to hippocampal epileptogenesis and clinical epilepsy after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in awake rats. *J Comp Neurol.* 2008;510(6):561-580. doi:10.1002/cne.21801.
374. Lothman EW, Williamson JM. Rapid kindling with recurrent hippocampal seizures. *Epilepsy Res.* 1993;14(3):209-220. doi:10.1016/0920-1211(93)90045-9.
375. Toman J, Swinyard E, Goodman L. Properties of maximal seizures, and their alteration by anticonvulsant drugs and other agents. *J Neurophysiol.* 1946;9:231-239.
376. Jobe PC, Mishra PK, Adams-Curtis LE, et al. The Genetically Epilepsy-Prone Rat (GEPR). *Ital J Neurol Sci.* 1995;16(1-2):91-99. doi:10.1007/BF02229080.
377. Garcia-Cairasco N, Oliveira J a, Wakamatsu H, Bueno ST, Guimarães FS. Reduced exploratory activity of audiogenic seizures susceptible Wistar rats. *Physiol Behav.* 1998;64(5):671-674. doi:S0031938498001292 [pii].



378. Romanova LG, Zorina Z a., Korochkin LI. A genetic, physiological, and biochemical investigation of audiogenic seizures in rats. *Behav Genet.* 1993;23(5):483-489. doi:10.1007/BF01067984.
379. Vergnes M, Marescaux C, Micheletti G, et al. Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in rat: a model of generalized non-convulsive epilepsy. *Neurosci Lett.* 1982;33(1):97-101. doi:10.1016/0304-3940(82)90136-7.
380. Menuz K, Nicoll R a. Loss of inhibitory neuron AMPA receptors contributes to ataxia and epilepsy in stargazer mice. *J Neurosci.* 2008;28(42):10599-10603. doi:10.1523/JNEUROSCI.2732-08.2008.
381. Papandrea D, Anderson TM, Herron BJ, Ferland RJ. Dissociation of seizure traits in inbred strains of mice using the flurothyl kindling model of epileptogenesis. *Exp Neurol.* 2009;215(1):60-68. doi:10.1016/j.expneurol.2008.09.016.
382. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RSG, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods.* 2008;172(2):143-157. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.04.019.
383. Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC and M Sheng. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J. Neurosci.* 2005 (25): 11300-11312.
384. Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J and GY Wu. Regulation of dendritic morphogenesis by ras-pi3k-akt-mtor and ras-mapk signaling pathways. *J. Neurosci.* 2005 (25): 11288-11299.

**Annexe 1: Screening of GABRB3 in French-Canadian families with idiopathic generalized epilepsy**

## BRIEF COMMUNICATION

# Screening of *GABRB3* in French-Canadian families with idiopathic generalized epilepsy

\*Pamela Lachance-Touchette, \*Caroline Martin, Chantal Poulin, Micheline Gravel, Lionel Carmant, and Patrick Cossette

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

### SUMMARY

Mutations in the *GABRB3* have been recently associated with childhood absence epilepsy (CAE) in 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 nine single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified, five 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 of 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 to confirm the association between this rare functional variant and epilepsy.

**KEY WORDS:** Idiopathic generalized epilepsy, Childhood absence epilepsy, Genetics, GABA<sub>A</sub> receptor, *GABRB3*.

Childhood absence epilepsy [CAE (ECA MIM 600131, ECA2 MIM 607681, ECA3 MIM 607682, ECA4 MIM 611136)] is a classical idiopathic generalized epilepsy (IGE) syndrome and accounts for up to 15% of childhood epilepsies (Loiseau et al., 2002). CAE usually begins in children between 2 and 8 years of age 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 syndrome (Helbig et al., 2008). 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 IGE syndromes. More specifically, mutations in various subunits of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)<sub>A</sub> receptor have been found in families with generalized epilepsy with febrile seizure plus (GEFS+) (Baulac et al., 2001; Dibbens et al., 2004), autosomal dominant juvenile myoclonic epilepsy (Cossette

et al., 2002), and childhood absences epilepsy with or without febrile seizures (Wallace et al., 2001a; Marini et al., 2003; Maljevic et al., 2006). Tanaka et al. (2008) recently reported three mutations in the *GABRB3* gene, encoding for the  $\beta 3$  subunit of the GABA<sub>A</sub> 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.

### 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 have been described previously (Kinirons et al., 2008). We amplified by polymerase chain reaction (PCR) (Applied Biosystems 9700; Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) 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 the software *Exon primer* from the UCSC Genome Browser database using NM\_021912 and NM\_000814 sequences. Primer sequences and PCR conditions are available upon request. The amplicons were run on the ABI3730 automatic sequencer (Applied Biosystems) and analyzed by using Mutation Surveyor software version 3.0.

Accepted April 13, 2010; Early View publication June 7, 2010.

Address correspondence to Patrick Cossette MD, PhD, CHUM-Hôpital Notre-Dame, 1560 Sherbrooke est, Montréal, QC H2L 4M1, Canada. E-mail: patrick.cossette@umontreal.ca

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

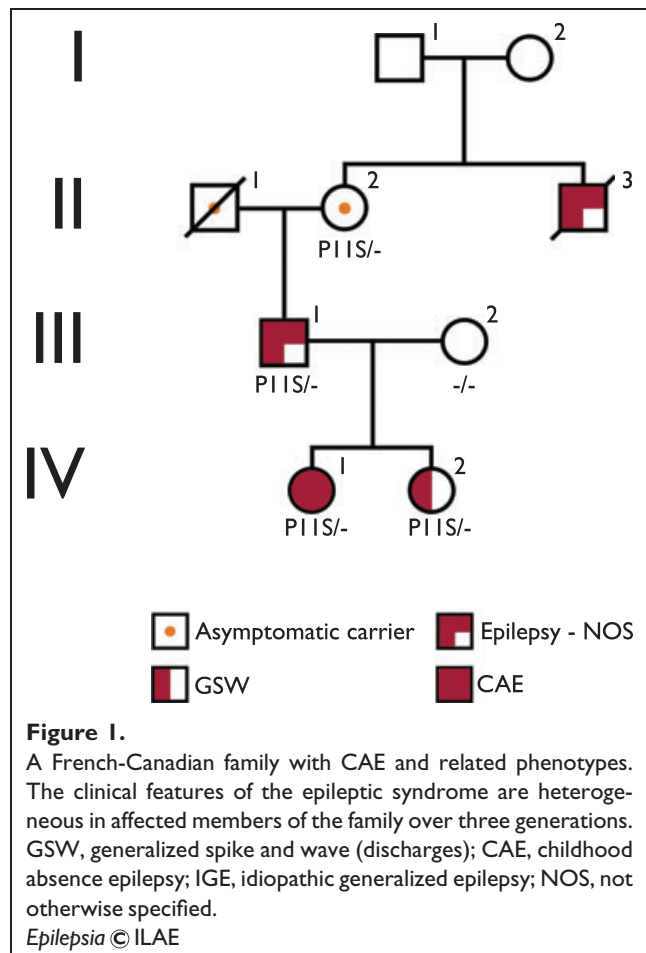
Wiley Periodicals, Inc.

© 2010 International League Against Epilepsy

All mutations and variants were confirmed by resequencing. All novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) and known mutations were tested in a French-Canadian control population of 190 individuals. In order to exclude symptoms compatible with seizures as well as any familial history of epilepsy, a systematic questionnaire was used with these control individuals. The main aim of this study was to assess whether mutations or rare variants in *GABRB3* are associated with epilepsy in our cohort. We did not wish to perform a systematic association study. However, because we generated many novel genetic variants in the *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 was assessed by using chi-square test for SNP 1 and SNP 6. The association between these genotypes and epilepsy was estimated by a logistic regression analysis [odds ratios (ORs); 95% confidence interval (CI)]. The low frequency of minor allele for the other new variants made the statistical analysis nonapplicable.

## 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) (Fig. 1). This individual had typical absence seizures starting at the age of 6, and her electroencephalography (EEG) showed generalized spike and waves (GSW) discharges enhanced by hyperventilation. The *GABRB3*<sub>P11S</sub> 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*<sub>P11S</sub> variant was also found in an asymptomatic individual (II-02). EEG recording was not obtained in this latter individual. In contrast to the Mexican population (Tanaka et al., 2008), in our population the *GABRB3*<sub>P11S</sub> variant was present in one of the 378 control chromosomes. 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 eight other SNPs, five of which are novel (one intronic, four silent). The following phenotypes are associated with these novel SNPs: 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.

## DISCUSSION

Recently, Tanaka et al. (2008) showed that loss of function mutations in *GABRB3* are associated with CAE, including for the *GABRB3*<sub>P11S</sub> variation found in one Mexican family with four CAE individuals and one Mexican singleton. In this study, we report the same *P11S* variation in

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

SNPs	Nucleotide genomic	Allele major/minor	AA	Rs	Maf		$\chi^2$	p-Value	Odds ratio (95% CI)
					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.

*GABRB3* in four individuals from a French-Canadian family. In contrast to the Mexican families, in the French-Canadian family described here, only one *GABRB3*<sub>P11S</sub> mutation carrier is affected with CAE, whereas the other affected carrier exhibit nonspecific and late-onset generalized epilepsy. Among the two asymptomatic carriers, one shows GSW discharges. Although we cannot exclude that GSW discharges may have been present during childhood in the three additional carriers, this observation suggests that the *GABRB3*<sub>P11S</sub> 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 (Steinlein et al., 1995; Wallace et al., 2001b). In addition, even for the CAE phenotype, the prevalence of the *GABRB3* mutations is lower in our population (one mutation in 88 CAE) compared to the population of Central America (four mutations in 48 CAE). However, whereas Tanaka et al. (2008) did not find the *GABRB3*<sub>P11S</sub> 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 (Steinlein et al., 1995; Baulac et al., 2001; Wallace et al., 2001b; Cossette et al., 2002; Tanaka et al., 2008). 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 (<1% of the population) are associated with mildly deleterious effects (Helbig et al., 2008). 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*<sub>P11S</sub> is a rare missense variation segregating with CAE, asymptomatic GSW discharges, and late-onset generalized seizures in a small French-Canadian family. Screening for *GABRB3* variants in additional IGE cohorts is warranted to assess the relative contribution of these genetic variants and mutations to the various IGE phenotypes.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors 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 Canadian Institutes of Health Research (CIHR). This study has been funded by the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and the CIHR.

## DISCLOSURE

None of the authors has any conflict of interest to disclose. 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.

## REFERENCES

- Baulac S, Huberfeld G, Gournifinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'homme JF, Baulac M, Brice A, Bruzzone R, LeGuern E. (2001) First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* 28:46–48.
- Cossette P, Liu L, Brisebois K, Dong H, Lortie A, Vanasse M, Saint-Hilaire JM, Carmant L, Verner A, Lu WY, Wang YT, Rouleau GA. (2002) Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 31:184–189.
- Dibbens LM, Feng HJ, Richards MC, Harkin LA, Hodgson BL, Scott D, Jenkins M, Petrou S, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF, Macdonald RL, Mulley JC. (2004) GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet* 13:1315–1319.
- Helbig I, Scheffer IE, Mulley JC, Berkovic SF. (2008) Navigating the channels and beyond: unravelling the genetics of the epilepsies. *Lancet Neurol* 7:231–245.

- Kinirons P, Rabinowitz D, Gravel M, Long J, Winawer M, Senechal G, Ottman R, Cossette P. (2008) Phenotypic concordance in 70 families with IGE-implications for genetic studies of epilepsy. *Epilepsy Res* 82:21–28.
- Loiseau P, Panayiotopoulos CP, Hirsch E. (2002) Childhood absence epilepsy and related syndromes. In Roger J, Bureau M, Dravet C, Genton P, Tassinari C, Wolf P (eds) *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. John Libbey, London, pp. 285–304.
- Maljevic S, Krampfl K, Cobilanschi J, Tilgen N, Beyer S, Weber YG, Schlesinger F, Ursu D, Melzer W, Cossette P, Bufler J, Lerche H, Heils A. (2006) A mutation in the GABA(A) receptor alpha(1)-subunit is associated with absence epilepsy. *Ann Neurol* 59:983–987.
- Marini C, Harkin LA, Wallace RH, Mulley JC, Scheffer IE, Berkovic SF. (2003) Childhood absence epilepsy and febrile seizures: a family with a GABA(A) receptor mutation. *Brain* 126(Pt 1):230–240.
- Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF. (1995) A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* 11:201–203.
- Tanaka M, Olsen RW, Medina MT, Schwartz E, Alonso ME, Duron RM, Castro-Ortega R, Martinez-Juarez IE, Pascual-Castroviejo I, Machado-Salas J, Silva R, Bailey JN, Bai D, Ochoa A, Jara-Prado A, Pineda G, Macdonald RL, Delgado-Escueta AV. (2008) Hyperglycosylation and reduced GABA currents of mutated GABRB3 polypeptide in remitting childhood absence epilepsy. *Am J Hum Genet* 82:1249–1261.
- Wallace RH, Marini C, Petrou S, Harkin LA, Bowser DN, Panchal RG, Williams DA, Sutherland GR, Mulley JC, Scheffer IE, Berkovic SF. (2001a) Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet* 28:49–52.
- Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, Richards M, Dibbens L, Desai RR, Lerman-Sagie T, Lev D, Mazarib A, Brand N, Ben-Zeev B, Goikhman I, Singh R, Kremmidiotis G, Gardner A, Sutherland GR, George AL Jr, Mulley JC, Berkovic SF. (2001b) Neuronal sodium-channel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet* 68:859–865.