

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE
FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
UMRS910 INSERM - Génétique Médicale et Génomique Fonctionnelle

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant
LA FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE

Le 25 Mars 2016

Par Mlle Affef ABIDI

Née le 20 Janvier 1988 à Villeurbanne (69)

Contribution à l'étude des encéphalopathies épileptiques précoces :
recherche de nouvelles causes génétiques
& caractérisation fonctionnelle des mutations du gène *KCNQ2*.

Pour obtenir le grade de DOCTORAT d'AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ

Spécialité Pathologie Humaine mention Génétique Humaine

Membres du Jury de la Thèse :

Mr. le Docteur Laurent VILLARD	Directeur de thèse
Mr. le Professeur Mathieu MILH	Président du Jury
Mme le Docteur Laurence COLLEAUX	Rapporteur
Mme le Docteur Sarah WECKHUYSSEN	Rapporteur
Mr. le Docteur Gaétan LESCA	Examineur
Mr. le Docteur Jean Charles VIEMARI	Examineur

Remerciements

Seul on va plus vite,
Ensemble on va plus loin. (Proverbe africain)

Cette citation résume parfaitement ce travail qui n'aurait pas été possible sans les nombreuses personnes qui m'ont soutenue, encadrée et accompagnée au cours de ces quatre années.

Je souhaite remercier toute l'équipe de Neurogénétique Humaine, c'est une équipe fantastique avec laquelle j'ai eu du plaisir à travailler. Je n'oublierais jamais chacun des membres passés et présents de cette équipe qui sont pour moi comme la famille d'emprunt que j'ai eue cours de ces quatre ans. C'est grâce à cette équipe soudée et motivée que j'ai pu continuer même lors des moments difficiles.

Je remercie tout d'abord mon directeur de thèse, le Docteur Laurent Villard qui a su être toujours présent, disponible et réactif à chaque instant de cette thèse malgré ses charges très importantes. Je pense que peu d'étudiants peuvent en dire autant. Je suis ravie d'avoir travaillé avec toi, tu m'as soutenue moralement mais tu as également souvent trouvé les mots justes au cours de la rédaction de ma thèse pour me remotiver. J'ai apprécié de travailler sur ce beau projet et j'espère pouvoir utiliser tes conseils et ta formation dans mon avenir professionnel.

Ma gratitude va également envers le Professeur Mathieu Milh, sans qui ce projet n'aurait jamais existé, qui été à l'écoute et qui a pris le temps de me former au niveau clinique. Je te remercie pour tous tes encouragements et tes mails toujours positifs qui m'ont permis de garder le moral.

Je remercie le Docteur Jean-Christophe Roux pour nos échanges scientifiques, pour ces conversations toujours plus inspirantes les unes que les autres. Je souhaite te remercier surtout pour ta capacité à nous faire rêver du prix Nobel. Tu as essayé sans relâche de me faire comprendre le second degré, je te le dis, j'y travaille, en espérant qu'un jour j'y arriverai en partie grâce à toi.

Je garde une gratitude infinie le Docteur Valérie Matagne, mon amie, qui été présente depuis le début dans les moments difficiles autant personnels que professionnels. Je te remercie d'être ce rare chercheur qui prend le temps pour les autres tout en réussissant à avancer de ton côté. Je n'oublierais jamais tout ce que tu m'as appris au cours de ces quatre années et surtout, à partager le savoir autant que possible. Bien évidemment, merci d'avoir pris le temps de te casser la tête sur la rédaction de ma thèse... j'aurais aimé que ce soit plus facile pour toi, mais saches que ces années n'auraient jamais été les mêmes si tu n'avais pas été là et quelques lignes ne suffiront jamais à exprimer ce que je ressens.

Je souhaite également faire une mention spéciale pour Ana Borges-Correia qui, malgré ses réticences, a réussi à travailler avec moi. Ce binôme que nous avons formé ces derniers mois était très dynamique et j'ai beaucoup apprécié partager avec toi. Ton optimisme a été très enrichissant. Tu es une personne que j'admire, bien sûr scientifiquement mais également personnellement, tu réussis à allier famille, cuisine, sport, films... tout en gardant la tête sur les épaules.

Mes remerciements vont également à Pierre Cacciagli, qui m'a appris ma première PCR, comme toujours pour tous les stagiaires qui arrivent. Je ne souhaite te dire qu'une chose: BRAVO, tu arrives à former les bébés chercheurs, avec patience et rigueur. Tu réussis toujours à soutirer un sourire même dans les moments les plus dramatiques, cela fait du bien de travailler avec quelqu'un comme toi.

Bien sûr, je remercie le Docteur Cécile Ravix. Même si je n'ai que peu travaillé avec toi, j'ai tout de même apprécié partager avec toi, ta rigueur scientifique, ton organisation mais également nos visions différentes de la

vie. Ces conversations ont toujours été très enrichissantes, parfois même embarrassantes, mais n'est-ce pas ce qui les rendaient si intéressantes et qui m'ont parfois fait bien rire. Je sais que je suis quelqu'un qui se complique la vie mais ne t'inquiète pas j'y travaille. J'espère que je n'ai pas fait trop de fautes dans les pages que tu vas lire... héhé.

Et je n'oublie pas Yann Ehinger, avec qui j'ai partagé beaucoup de choses (et même mon appartement!), j'aurais aimé que l'on introduise de façon plus régulière les conversations scientifiques autour d'un sujet particulier même si on dérivait souvent sur des sujets un peu plus terre à terre. Je te souhaite toute la réussite que tu mérites, accroches toi, tu as de grandes capacités pour réussir le travail de chercheur. En tout cas, ma porte te sera toujours grande ouverte.

Je remercie également Lydia Saidi, j'espère que tu pourras réaliser tes projets professionnels comme tu le souhaites, que tu réussiras à faire la thèse dont tu rêves tant. Tu le mérites, tu as cette capacité à avoir le regard critique et sceptique à chaque fois que tu réfléchis sur un problème. Je suis triste de n'avoir pas pu travailler avec toi sur la souris Ohtahara mais j'espère que tu m'en donneras des nouvelles.

Mes remerciements vont également au Docteur Majdi Nagara, finalement, on a beaucoup partagé depuis ces quelques mois. Tes questions quand je présentais (que ce soit pour ma thèse ou en septembre pour la préparation à la bourse) m'ont beaucoup aidé et nos échanges sur les gènes impliqués dans les épilepsies m'ont beaucoup plu. Je pense que tu apprécieras de ne plus recevoir de coups sur la tête ainsi que la baisse d'agitation juste derrière toi.

Je souhaite également remercier les personnes qui ont quitté cette équipe.

Je remercie le Docteur Gisèle Alcaraz pour m'avoir formé au monde magique des protéines. Je te remercie pour toutes les heures de conversations autour des immuno et des westerns, pour tes coups d'enthousiasmes au sujet de mécanismes que nous aurions pu étudier, mais également pour toutes nos autres conversations sur le côté, scientifique, cuisine, culturelle.

A Adeline Ghata, pour nos discussions au sujet des souris (ces autres bébés) mais, surtout pour tes délicieuses pâtisseries que tu partageais avec nous. Tu es toujours à l'écoute de mes petites inquiétudes, merci d'avoir été ma confidente au cours de ces années. Je te remercie aussi pour toutes les petites excursions à la découverte de nouvelles saveurs que nous avons faites ensemble. Je n'oublierais jamais comment nous avons réussi à créer, ensemble, un univers de Noël autour des contes de fées, cela fait parti d'un de mes plus beaux souvenirs dans cette unité.

A Julie Sutera-Sardo, avec qui j'ai eu l'occasion de débiter les études des mutations de KCNQ2. On s'est lancé ensemble sur ce beau projet, on a commencé ensemble les premières mutagenèses. Ces étapes ont été difficiles, pour nous deux (autant scientifiquement que personnellement) mais finalement on a réussi à les produire ces plasmides mutés. Tu m'as beaucoup manqué au cours de cette troisième année et je regrette que tu sois partie aussi vite.

Mais également, Virginia Ferreira à qui je souhaite tout le bonheur dans son avenir professionnel.

Au sein de cette unité de recherche, j'ai également eu l'occasion de rencontrer beaucoup de personnes formidables:

Amélie Pinard, qui est devenue une véritable amie et avec qui j'ai eu l'occasion de partager chaque fois que j'avais un oral ou un poster, mais aussi une inquiétude. Je te remercie d'avoir été ma partenaire de sport, pour les séances de piscine tous les mercredis/jeudis soirs qui m'ont fait respirer. Courage Amélie, la soutenance avance à grands pas, je suis certaine que ce sera une réussite et bientôt, tu pourras t'envoler vers de nouveaux horizons outre-Atlantique :).

Pauline Heux, pour nos discussions courtes mais toujours intéressantes entre deux créneaux en salle de culture.

Morgan, pour nos échanges scientifiques, j'espère que j'ai pu t'aider (même juste un peu) que ce soit sur les immunoprécipitations ou sur la culture.

Nathalie Trevisiol qui m'a formé à la bactériologie et avec qui j'ai compris pourquoi certaines bactéries refusaient certaines mutations (elles sont capricieuses les petites).

Camille Dion, pour ces smileys posés sur les écrans, pour les bonbons et les doses de sucre nécessaires à toute journée de travail intensif. Celui de mon anniversaire m'a particulièrement touchée lors de la rédaction de ma thèse, merci.

Bien sur, cette liste n'est pas exhaustive et je remercie également, toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de rencontrer à l'U910 : Marie-Cécile, Eugénie, Françoise, Frédéric, Marc, Valérie, Rodolphe, Evelyne...

Ces remerciements vont également à mon équipe d'emprunt, avec qui j'ai passé près d'un quart de ma thèse.

Je remercie d'abord le Docteur Laurent Aniksztejn qui m'a formée à l'électrophysiologie et a eu cette patience pour m'expliquer les méandres de l'enregistrement de courant. Je te remercie également pour nos conversations scientifiques autour de KCNQ2 qui étaient toujours très enrichissantes. Je reste tout de même déçue de ne pas avoir partager plus avec toi au niveau cuisine et notamment, le fait de n'avoir toujours pas eu l'occasion de cuisiner le couscous que je t'avais promis.

Puis, je remercie également le Docteur Florence Molinari pour qui j'ai une grande admiration. J'espère un jour acquérir un peu de ton organisation minutieuse et rigoureuse. Tu m'as toujours étonné dans ta manière d'aborder la science. Je te remercie d'avoir pris du temps pour corriger ma thèse, tous tes commentaires m'ont été très utiles.

Au Docteur Helène Becq avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger de façon scientifique, qui a su m'étonner par son organisation même lorsque Florence était absente. Pour cela bravo.

Je souhaite également remercier les personnes avec qui j'ai travaillé au sein de l'association Hippo' thèse et avec qui nous avons créé le beau forum des jeunes chercheurs qui est maintenant une réussite chaque année. Quelques noms me viennent bien sûr en tête : Nicolas, Marie-Cécile, Aurélien, Inès, Yasmine, Sandrine, Habib...

Je souhaite également remercier ma famille.

Ma mère, qui m'a soutenue durant toutes ces années, qui a su supporter mes excès de stress tous les matins. Merci d'être présente même à distance, de me comprendre, de m'écouter tout simplement. Sans toi, je ne serais pas là où je suis aujourd'hui, merci pour toute l'aide que tu m'as fourni et surtout pour avoir cru en moi toutes ces années.

Je remercie mes deux frères et ma sœur qui m'ont toujours poussée afin de trouver le courage de continuer. Mon grand frère, Mehdi, qui a pris le temps de m'écouter et de me conseiller. Mon deuxième frère, Hedi, qui m'a fait profiter de son expérience (effectivement, j'aurais pu écrire l'introduction dès le départ). Ma sœur pour les journées de détente que nous avons passées ensemble.

Je remercie également, mon amie Claire Bernardin pour ses grains de folie, et avec qui il est toujours intéressant d'échanger au niveau scientifique. Je te souhaite tout le meilleur pour ta soutenance de thèse qui approche.

Et enfin, je souhaite remercier Christophe Ostorero, ma moitié, qui a toujours été là depuis le début (ça, c'était facile) mais chose très étrange... qui est resté même pendant la rédaction de ma thèse, lorsque j'étais devenue insupportable (c'est là que c'était difficile). Je te remercie d'avoir été là durant cette période, d'avoir accepté de

relire ma thèse des dizaines de fois pour corriger les fautes (alors que je disais que tu n'y comprenais rien), de m'avoir aidé pour ma biblio. Cela fait du bien de se sentir aidée et soutenue et sans toi, tout cela n'aurait pas été possible. Je te remercie pour cette belle preuve d'amour.

Je terminerais sur une pensée à mon père dont le vide m'a rongé au cours de ces trois ans, et que je n'oublierais jamais. J'aurais aimé que tu sois là, que tu partages cela avec moi, mais saches que tu restes à chaque instant dans mon esprit.

Résumé

Les Encéphalopathies Épileptiques Précoces (EEP) sont des pathologies rares et sévères caractérisées par l'association de crises fréquentes commençant dans les trois premiers mois de vie accompagnées d'un EEG intercritique altéré. Le pronostic de ces patients est très défavorable et il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement pour ces pathologies. Au cours de la caractérisation génétique d'une cohorte de 402 patients atteints d'EEP, nous avons mis en évidence une délétion de 19,9 kilobases localisée en Xp11.23 chez un garçon et 34 mutations *de novo* du gène *KCNQ2* (*Potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 2*). La première partie de mon projet a consisté en l'étude de la pathogénicité de la délétion Xp11.23, qui implique trois gènes dont *WDR45* (*WD repeat 45*). Les mutations de ce gène ont été récemment décrites dans une dégénérescence neuronale avec accumulation de fer (BPAN). Cette pathologie a été décrite presque exclusivement chez des patients de sexe féminin et seulement 3 cas de garçons sont reportés, ce qui suggère une mortalité précoce au cours du développement. Le diagnostic initial, chez ce patient, montre une IRM normale avec un phénotype d'EEP et l'accumulation de fer a été détectée chez ce patient à partir de 5 ans. Ce travail m'a permis de décrire le premier patient atteint d'EEP porteur d'une délétion de *WDR45*. La deuxième partie de mon projet a concerné l'étude fonctionnelle de deux mutations du gène *KCNQ2* qui code pour un canal potassique dépendant du voltage. Au cours de ce travail, nos résultats ont montré que les mutations du gène *KCNQ2* sont impliquées dans deux mécanismes physiopathologiques, une délocalisation subcellulaire et un gain de fonction du canal. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives en terme de compréhension de la pathologie et de thérapies qui peuvent être proposées. Une dernière partie de mon projet a consisté en l'élaboration de nouveaux modèles *in vitro*, j'ai mis au point des lignées stables exprimant *KCNQ2* qui permettront le criblage de molécules thérapeutiques à haut-débit, ainsi que des progéniteurs neuronaux différenciés à partir de cellules souches pluripotentes induites issues de la reprogrammation de fibroblastes de patients mutés pour le gène *KCNQ2*.

Abstract

Early onset epileptic encephalopathies (EOEE) are rare and severe disorders, characterized by frequent motor seizures occurring before three months of age associated with an altered interictal EEG pattern. The prognosis is poor and this form of epilepsy is largely drug resistant. During the course of the genetic characterization of a cohort of 402 EOEE patients, we identified a *de novo* deletion located at Xp11.23 in a male patient and 34 *KCNQ2* *de novo* mutations. The first part of my project consisted in the study of the pathogenicity of the Xp11.23 deletion that encompasses three genes including *WDR45* (*WD repeat 45*). Mutations in the *WDR45* gene have been recently identified in patients suffering from neurodegeneration with brain iron accumulation. *WDR45* mutations have been almost exclusively found in females and only three male cases have been described to date, suggesting lethality in male. Our patient with the Xp11.23 deletion presented a normal MRI and the EOEE phenotype was predominant. Iron accumulation began only at 5 years. My work reveals that deletions of *WDR45* are viable in males and can be diagnosed as EOEE. The second part of my project was aimed at the functional study of two *KCNQ2* gene mutations. This gene encodes the voltage-dependent potassium M channel Kv7.2 subunit. During this work, my results showed that those mutations were involved in new pathological mechanisms, namely a mislocalization or gain of function of the channel. Those results provide new perspectives in term of disease knowledge and therapy. The last part of my project consisted in the development of two new *in vitro* models for the study of *KCNQ2* mutations: stable cell lines expressing the Kv7.2 channel for high-throughput screening of drugs and the production of neurons from induced pluripotent stem cells arising from reprogrammed patient fibroblasts.

Table des matières

Abréviations	6
Introduction	9
I. Généralités sur les épilepsies	9
I.1. Historique de l'épilepsie	9
I.2. Définition de l'épilepsie	10
I.3. L'épilepsie – Epidémiologie	10
I.4. Classification de l'épilepsie selon l'ILAE	11
I.4.1. Bases de la classification définie par l'ILAE	11
I.4.2. Causes génétiques	12
I.4.3. Causes structurelles /métaboliques	13
I.4.4. Causes inconnues	14
II. Les encéphalopathies épileptiques précoces d'origine génétique	15
II.1. Introduction sur les encéphalopathies épileptiques précoces	15
II.1.1. Généralités et définition	15
II.1.2. Classification des encéphalopathies épileptiques précoces	15
II.2. Causes génétiques dans les EEP	20
II.2.1. Type d'anomalie génétique	20
II.2.2. Mise en place d'une cohorte EEP à l'hôpital de la Timone	21
II.2.3. Principaux gènes impliqués dans les encéphalopathies épileptiques précoces	22
II.2.4. Physiopathologie des épilepsies	26
II.2.4.2. Les défauts de neurotransmission	29
II.2.4.3. Dérégulation du métabolisme	31
II.2.4.4. Défaut de régulation génique	31
III. Etude du gène <i>KCNQ2</i>	33
III.1. Biologie des canaux Kv7 neuronaux	33
III.1.1. Les canaux potassiques dépendants du voltage	33
III.1.2. Rôle des canaux Kv7 neuronaux	34
Génération du courant I_M	34
Rôle dans le potentiel de membrane et le seuil de genèse des PA	36
Rôle dans l'intégration synaptique	36
Contrôle de la configuration de la décharge	37
Rôle dans la neurotransmission	38
III.1.3. Structure des canaux potassiques Kv7.2 et Kv7.3	39
III.1.4. Expression des canaux potassiques de type Kv7	40
III.1.4.1. Tétramérisation des canaux Kv7.2 et Kv7.3	40
III.1.4.2. Protéines partenaires des sous-unités Kv7.2-Kv7.3	41
L'ankyrine G	42
La syntaxine 1A	42
La calmoduline	43
Le Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate et la protéine kinase C	45
Les protéines AKAP79/150 et la protéine kinase A	46
III.1.4.3. Expression membranaire de Kv7.2 et Kv7.3	47
III.1.4.4. Localisation subcellulaire des canaux Kv7.2-Kv7.3	48
III.1.4.5. Localisation neuronale des canaux potassiques Kv7.2 et Kv7.3	49
III.2. Implication des gènes <i>KCNQ2</i> et <i>KCNQ3</i> dans les épilepsies	51
III.2.1. Les gènes <i>KCNQ2</i> et <i>KCNQ3</i>	51
III.2.2. Epilepsies néonatales familiales bénignes (BFNS)	52
III.2.3. Encéphalopathies épileptiques précoces	53
III.3. Impact des mutations dans le gène <i>KCNQ2</i>	55
III.3.1. Mécanismes physiopathologiques modifiant le courant M	55
Défaut de densité de courant, défaut d'ouverture du canal	56

Défaut dans la courbe d'activation du canal et la cinétique du canal	57
III.3.2. Défaut d'expression à la membrane plasmique et à l'AIS	58
III.3.3. Défauts d'interaction	59
IV. Travail de thèse	60
Matériel et méthodes	63
I. Biologie moléculaire	63
I.1. Technique d'amplification en chaîne de la polymérase (pcr)	63
I.1.1. PCR classique	63
I.1.2. Réaction de séquençage	63
I.2. Extraction d'ARN puis transcription inverse à partir de progéniteurs en culture	64
Extraction d'ARN	64
Contrôle de la qualité et de la quantité des ARNs extraits	64
Transcription inverse des ARN extraits en ADN complémentaire (ADNc)	64
I.3. PCR quantitative ou en temps réel	65
I.4. Mutagenèse et préparation des plasmides	65
I.4.1. Mutagenèse de plasmides	65
I.4.1.1. Plasmide <i>KCNQ2-KCNQ3</i>	65
I.4.1.2. Protocole de mutagenèse	66
I.5. Amplification des plasmides	68
I.5.1. Transformation bactérienne	68
I.5.2. Culture bactérienne	69
I.5.3. Purification de l'ADN plasmidique	69
II. Biologie cellulaire	70
II.1. Culture cellulaire	70
II.1.1. Culture de neurones primaires de rats	70
II.1.2. Cellules Chinese Hamster Ovary (CHO)	70
II.1.2.1. Expériences d'immunoblot	70
II.1.2.2. Expériences d'électrophysiologie	71
II.1.2.3. Création de lignées stables exprimant Kv7.2 et Kv7.3	71
II.2. Différenciation de cellules souches pluripotentes induites (iPS)	73
Reprogrammation des fibroblastes issus de patients en cellules iPS	73
Différenciation des IPS en progéniteurs neuronaux	73
Traitement pour produire la matrice des boîtes de différenciation :	74
Passage des cellules en cours de différenciation	74
II.1. Immunohistochimie	75
II.1.1. Sur neurones en culture	75
II.1.2. Sur les cellules souches pluripotentes induites	75
III. Biochimie	76
III.1. Préparation des échantillons	76
Extraction de protéines totales	76
Précipitation de protéines membranaires par la technique de biotine-streptavidine	77
Dénaturation des échantillons	77
III.2. Techniques d'Immunoblots	78
IV. Electrophysiologie	79
IV.1. Enregistrement de cellules CHO par la technique de patch clamp en configuration cellule entière	79
IV.2. Analyses statistiques des résultats d'électrophysiologie	80
Résultats	82
I. Etude d'une délétion Xp11.23 (Article 1 : Abidi et al, 2015)	87
Identification d'anomalies du nombre de copies	87
Phénotype clinique du patient porteur de la délétion Xp11.23	87
Caractérisation moléculaire de la délétion Xp11.23	88

Implication du gène <i>WDR45</i> dans une pathologie neurologique conduisant à une neurodégénérescence	89
Comparaison du patient porteur de la délétion avec les autres patients présentant des mutations dans le gène <i>WDR45</i>	91
II. Etude fonctionnelle de mutations dans le gène <i>KCNQ2</i>	92
II.1. Hypothèse préalable	92
II.2. Présentation des résultats obtenus pour l'étude des mutations de <i>KCNQ2</i>	93
II.3. Etude d'une mutation récurrente dans le gène <i>KCNQ2</i> (Article 2 : Abidi et al, 2015)	97
II.4. Etude de la mutation P.V175L du gène <i>KCNQ2</i> (Article 3: Devaux et al, sous presse)	105
III. Développement de nouveaux modèles pour l'étude fonctionnelle de <i>KCNQ2</i> et la recherche préclinique	108
III.1. Mise en place d'un modèle de lignées stables pour la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques	108
III.2. Mise en place d'un modèle neuronal pour l'étude de l'impact des mutations de <i>KCNQ2</i>	111
Discussion	121
I. Variabilité clinique dans les pathologies liées à <i>WDR45</i>	122
II. Variabilité dans les épilepsies liées à <i>KCNQ2</i>	128
II.1. Variabilité clinique des patients porteurs de mutations dans le gène <i>KCNQ2</i>	128
II.2. Variabilité des conséquences fonctionnelles des mutations du gène <i>KCNQ2</i>	130
Le courant I_M est-il vraiment le paramètre à étudier ?	130
Perturbations dans la localisation du canal : un nouveau mécanisme responsable d'EEP ?	134
La diminution d'excitabilité est-elle à l'origine d'EEP ?	136
II.3. Les modèles utilisés pour les études de <i>KCNQ2</i>	139
La variabilité de l'impact des mutations de <i>KCNQ2</i> est-elle due au choix du modèle ?	139
Quels nouveaux modèles sont nécessaires pour étudier les mutations de <i>KCNQ2</i> et proposer de nouvelles approches thérapeutiques ?	141
II.4. Recherche de nouvelles thérapies pour les patients porteurs de mutations de <i>kcnq2</i>	145
III. Variabilité clinique dans les EEP	148
IV. Conclusion	151
Bibliographie	154
Annexes	175
Annexe 1 : Liste des amorces utilisées	175
Annexe 2 : Protocole de PCR	177
Annexe 3 : Liste des anticorps utilisés	178
Annexe 4 : Solutions pour l'immunoblot	179
Autres articles	180

ABREVIATIONS

AM : acétoxyméthyl

AHP : *Afterhyperpolarisation*

AIS : Segment initial de l'axone

AnkG : Ankyrine G

ApoCaM : Apo-Calmoduline

BFNS : *Benign familial neonatal seizures*

BPAN : Neurodégénérescence associée à une protéine beta-propeller

CaM : Calmoduline

CGH : Hybridation génomique comparative

CHO-K1 : cellules ovariennes de hamster chinois

CMV : cytomégalovirus

CNV : *Copy number variant*

COS7 : cellules rénales de Cercopithecus Aethiops

DAG : diacylglycérol

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DGV : *Database of Genomic Variants*

DMSO : diméthylsulfoxyde

DTT : dithiothréitol

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EEG : Electroencéphalogramme

EPP : Encephalopathies Épileptiques Précoces

EGF : *Epidermal growth factor*

EMP : Encéphalopathie myoclonique précoce

GABA : Acide gamma-aminobutyrique

GEF : *Guanine Nucleotide Exchange Factor*

GFAP : Glial fibrillary acidic protein

GPI : *glycophosphatidyl inositol*

HEK : *Human Embryonic Kidney 293*

HoloCaM : Holo-Calmoduline

ICC : immunocytochimie
IP3 : Inositol triphosphate
iPS : cellules souches pluripotentes induites
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
mAHP : *medium afterhyperpolarisation*
MCD : Malformation du développement cortical
MMPSI : Epilepsie focale migrante de l'enfance
Nav : Canaux sodiques dépendants au voltage
OS : Syndrome d'Ohtahara
PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2)
PKC : protéine kinase C
PLC : phospholipase C
PNKP : *Polynucleotide kinase 3-Prime Phosphate*
PPSE : Potentiel post-synaptique excitateur
PPSI : Potentiel post-synaptique inhibiteur
shRNA : Small hairpin RNA (ARN en épingle à cheveux)
SW : Syndrome de West
SWI : Susceptibility Weighted imaging (Séquence de susceptibilité magnétique)
TCC1 : *tetramerizing coiled-coil 1*
TCC2 : *tetramerizing coiled-coil2*
TCEP : Tris(2-carboxyethyl)phosphine
VSD : *Voltage sensor domain*

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Généralités sur les épilepsies

I.1. HISTORIQUE DE L'EPILEPSIE

L'épilepsie est une pathologie connue depuis l'antiquité. Son nom provient du grec "*epilêpsis*" ou "*epilêpsia*" qui signifie "attaque" ou "arrêt soudain" illustrant bien son caractère brutal. Au cours de l'histoire, cette pathologie a été à l'origine de nombreux mythes et les patients étaient exclus de la société. L'épilepsie est donc restée longtemps mal comprise et peu étudiée. La recherche sur cette pathologie a été considérablement ralentie car son origine était considérée comme liée à une source surnaturelle plutôt qu'à une maladie.

À partir du XVIII^e siècle, la vision de l'épilepsie évolue et elle est perçue comme une pathologie dont l'origine est périphérique mais qui garde une composante cérébrale (Magiorkinis, 2014). Ce n'est qu'au début du XIX^e siècle avec les avancées de la médecine, que l'on a commencé à s'intéresser à l'épilepsie en tant que maladie cérébrale, notamment grâce à l'avènement de la neurologie (Magiorkinis, 2014). Le premier médicament antiépileptique, le bromure de potassium, a ainsi été proposé de façon indépendante à un congrès de la société royale de médecine et de chirurgie à Londres en 1857 par Charles Locock (Eadie, 2012) et en 1861 par Samuel Wilks (Eadie, 2008). Son usage s'est ensuite étendu en Europe et aux Etats-Unis. Puis en 1920, l'invention de l'électroencéphalographie (EEG) par Hans Berger a permis de donner une nouvelle vision de cette pathologie et d'en confirmer la source cérébrale. Dès lors, une classification en fonction du type de crises a vu le jour. Les recherches qui ont suivi ont permis de mieux comprendre la maladie et, pour certains types d'épilepsie, d'en identifier la cause.

Les connaissances restent cependant jusqu'à aujourd'hui très éparpillées et, depuis le début du XX^e siècle, la recherche de causes notamment génétiques, continue d'apporter de nouveaux éléments étiologiques et diagnostiques.

I.2. DEFINITION DE L'EPILEPSIE

La ligue internationale contre l'épilepsie (*International League Against Epilepsy*, ILAE) définit la crise d'épilepsie comme la *survenue transitoire de signes ou symptômes en réponse à une activité anormale excessive ou asynchrone du cerveau* (Fisher, 2005; Fisher, 2014; Guerrini, 2006). L'épilepsie est définie de façon clinique comme une maladie cérébrale caractérisée par une prédisposition durable à générer des crises épileptiques qui peuvent entraîner des conséquences neurobiologiques, cognitives, psychologiques et/ou sociales (ILAE, 2001 et 2005 ; Fisher, 2014 ; Guerrini, 2006). La caractérisation clinique des épilepsies a fait l'objet en 2005 d'une nouvelle nomenclature.

I.3. L'EPILEPSIE – EPIDEMIOLOGIE

L'épilepsie est une pathologie neurologique fréquente dans la population. Elle peut affecter des personnes de toutes origines, âges et conditions sociales. L'épilepsie concernerait 1% de toute la population mondiale (Shakirullah, 2014). Il existe une différence entre les pays et l'incidence globale n'est pas tout à fait homogène. Les chiffres issus des études épidémiologiques de l'épilepsie proviennent surtout des pays occidentaux développés, ils diffèrent dans les pays en voie de développement, mais également en Asie. Ainsi, il est possible de distinguer une incidence dans les pays développés et une autre dans les pays en voie de développement. Pour le premier groupe, l'incidence a été estimée à 50 pour 100 000 et jusqu'à 100-190 pour 100 000 dans les pays du deuxième groupe. Cet écart serait dû à l'accès aux soins médicaux restreint des personnes vivant dans ces pays et surtout chez la femme enceinte. Le nombre de nouveaux cas pourrait donc être deux fois plus importants dans les pays les plus pauvres (Neligan et Sander, 2007 ; Banerjee et Hauser, 2007).

L'épilepsie touche tous les âges, néanmoins il existe une variabilité en fonction de la période de la vie. Des catégories d'âge sont définies pour l'épilepsie : nouveau-né (<44 semaines d'âge gestationnel), nourrisson (<1 an), enfant (1-12 ans), adolescent (12-18 ans),

adulte (>18 ans) (Berg, 2010) et personnes âgées (de plus de 70 ans), qui formeraient le dernier groupe. La période néonatale jusqu'à l'adolescence est une période critique où l'occurrence de cette pathologie est très importante (Hauser, 1994). Cette fréquence qui peut atteindre environ 100 à 150 enfants sur 100 000 avant l'âge de 1 an serait due à une immaturité du cerveau chez le nourrisson. L'incidence relative à l'âge diminue ensuite après cette période et semble plus basse chez l'adulte. Elle augmente de nouveau après 70 ans (Banerjee et Hauser, 2007).

I.4. CLASSIFICATION DE L'EPILEPSIE SELON L'ILAE

I.4.1. Bases de la classification définie par l'ILAE

L'épilepsie est une maladie chronique qui est caractérisée par la survenue de crises épileptiques non provoquées. Une crise d'épilepsie se définit par des manifestations paroxystiques, brèves, accompagnées ou non de mouvements anormaux. Il existe différents types de crises épileptiques que l'ILAE a répertorié (Tableau 1) afin de faciliter l'homogénéisation du diagnostic (Berg, 2010). Elles peuvent être généralisées, impliquant plusieurs réseaux cérébraux de manière bilatérale, ou focale, n'impliquant qu'une région cérébrale (Berg, 2010).

Toutes ces crises correspondent à une décharge électrique anormale des neurones. Les crises impliquent essentiellement le cortex cérébral, et sont accompagnées ou non d'une perte de conscience. L'EEG peut accompagner le diagnostic et permet l'enregistrement amplifié de l'activité du cerveau à l'aide d'électrodes placées sur le scalp crânien. L'EEG critique est le tracé obtenu au cours des crises et l'EEG intercritique est celui entre les crises.

Jusqu'à 2005, la classification des épilepsies reposait sur des critères de traitement et de sévérité. Cette classification pouvait parfois être biaisée du fait d'appellations incorrectes ou ambiguës de certaines épilepsies. Une nouvelle méthode de classification de l'épilepsie a été proposée en 2005 par l'ILAE et repose sur des données étiologiques, moins subjectives à chaque clinicien. Dans cette nouvelle classification, les causes de l'épilepsies

sont séparées en trois groupes distincts : génétique (monogénique ou polygénique), structurelle / métabolique, et de causes inconnues.

Tableau 1 : Classification des crises d'épilepsies selon l'ILAE (D'après Berg, 2010) Les épilepsies d'origine inconnues sont un type distinct.

<p>Crises Généralisées</p> <ul style="list-style-type: none"> Tonico-cloniques (quelle que soit la combinaison) Absences <ul style="list-style-type: none"> Typiques Atypiques Absences avec caractéristique particulière <ul style="list-style-type: none"> Absences Myocloniques Absences avec Myoclonies Palpébrales Myocloniques <ul style="list-style-type: none"> Myocloniques Myoclonos atoniques Myoclonos toniques Cloniques Toniques Atoniques <p>Crises Focales</p> <p>Inconnues</p> <p>Spasmes Epileptiques</p>
<p>Les crises qui ne peuvent pas être diagnostiquées dans une des catégories précédentes doivent être considérées comme « non classées » jusqu'à ce que davantage de données permettent de les diagnostiquer de manière fiable. Ceci n'est toutefois pas considéré comme une catégorie de classification.</p>

I.4.2. Causes génétiques

Les épilepsies d'origine génétique sont définies par le fait que la mutation elle-même serait responsable des désordres neuronaux observés. Elles peuvent être polygéniques ou monogéniques et correspondent à environ 20% des épilepsies. Le Tableau 2 représente des syndromes électrocliniques qui sont souvent synonymes d'épilepsie génétique. La génétique des épilepsies néonatales et du nourrisson avant l'âge de trois mois est détaillée en partie II.

Les épilepsies d'origine génétique sont classées en fonction de l'âge d'apparition (Tableau 2) et sont souvent associées à un syndrome électro-clinique particulier, la liste de l'ILAE est reportée dans le Tableau 2 (Berg, 2010). Ces syndromes peuvent avoir des profils EEG spécifiques en fonction de l'âge (comme le syndrome d'Ohtahara, *décrit plus bas*). Ces pathologies peuvent évoluer après 3 à 10 mois, et peuvent présenter un EEG de type hypsarythmie, spécifique du syndrome de West (Donat, 1992).

Tableau 2 : Syndromes électro-cliniques et autres épilepsies (D'après Berg, 2010)

Période néonatale	<ul style="list-style-type: none"> Epilepsie néonatale familiale bénigne (BFNE ou BFNS) Encéphalopathie myoclonique précoce (EME) Syndrome d'Ohtahara (OS)
Nourrisson	<ul style="list-style-type: none"> Epilepsie du nourrisson à crises focales migrantes (MMPSI) Syndrome de West (SW) Epilepsie myoclonique du nourrisson (MEI) Epilepsie bénigne du nourrisson (BIE) Epilepsie familiale bénigne du nourrisson (BFIS ou BFIE) Syndrome de Dravet (SD) Encéphalopathie myoclonique des affections non progressives
Enfant	<ul style="list-style-type: none"> Crises fébriles plus (FS+) (peut débuter chez un nourrisson) Syndrome de Panayiotopoulos Epilepsie à crises myoclonico-atoniques (précédemment asiatiques) Epilepsie bénigne avec pointes centrotemporales (BECTS) Epilepsie autosomique dominante à crises frontales nocturnes (ADNFLE) Epilepsie à crises occipitales de début tardif (Type Gastaut) Epilepsie avec absences myocloniques Syndrome de Lennox-Gastaut Encéphalopathie épileptique avec pointes-ondes continues au cours du sommeil (CSWS)* Syndrome de Landau-Kleffner (LKS) Epilepsie-absences de l'enfant (CAE)
* Appelé également Etat de mal électrique au cours du sommeil lent (ESES)	
Adolescence – Adulte	<ul style="list-style-type: none"> Epilepsie-absences de l'adolescent (JAE) Epilepsie myoclonique juvénile (JME) Epilepsie à crises généralisées tonico-cloniques prédominantes Epilepsie myoclonique progressive (PME) Epilepsie autosomique dominante avec crises à symptomatologie auditive (ADEAF) Autres formes d'épilepsie temporale familiale
Epilepsies dont l'âge de début est moins spécifique	<ul style="list-style-type: none"> Epilepsie focale familiale à foyer variable (enfant et adulte) Epilepsies réflexes
Constellations	<ul style="list-style-type: none"> Epilepsie temporale mésiale avec sclérose hippocampique (MTLE with HS) Syndrome de Rasmussen Epilepsie à crises gélastiques et hamartome hypothalamique Hémiconvulsion-hémiplégie-épileptique Epilepsies qui ne peuvent pas être classées dans une des catégories suscitées et qui peuvent être reconnues par la présence ou l'absence d'une anomalie structurale ou métabolique (présumé causale) et sur la base du mode de début de la crise (généralisées vs focales)
Epilepsies en relation avec une anomalie structurale-métabolique	<ul style="list-style-type: none"> Malformations du développement cortical (hémimégalencephalie, hétérotopies, etc.) Syndrome Neurocutané (Sclérose tubéreuse, Sturge-Weber, etc.) Tumeur Infection Traumatisme
Angiome	<ul style="list-style-type: none"> Souffrance périnatale Accident vasculaire Etc.
Epilepsies de causes inconnues	<ul style="list-style-type: none"> Conditions associées à des crises épileptiques et qui ne sont pas diagnostiquées comme une forme d'épilepsies Crises néonatales bénignes (BNS) Crises fébriles

I.4.3. Causes structurales /métaboliques

Dans ce groupe, une anomalie structurale du système nerveux central est la cause de l'épilepsie. Il comprend toute épilepsie due à des lésions acquises mais également de nombreuses pathologies d'origine génétique telles que les malformations du cortex cérébral ou MCD (*Malformation of Cortical Development*) (Berg, 2010). Ce groupe est détaillé dans le Tableau 2. Les MCD sont responsables d'environ 40% des épilepsies

pharmaco-résistantes. Les malformations du cortex cérébral peuvent engendrer un déséquilibre dans l'excitation et provoquer une épilepsie. Certaines de ces malformations peuvent être visibles dès la naissance à l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Les épilepsies métaboliques correspondent à une entité clinique où la défaillance d'une voie métabolique est responsable de l'épilepsie. Elles sont généralement dues à une anomalie génétique impliquant un gène spécifique d'une voie métabolique. Il existe également pour ces épilepsies une susceptibilité liée à l'âge en fonction du désordre observé (Papetti, 2013 ; Wolf, 2005). Ces épilepsies sont souvent résistantes aux médicaments anti-épileptiques et soignées par des traitements métaboliques.

I.4.4. Causes inconnues

Les épilepsies qui ne sont dues ni à une cause génétique ni à une cause structurelle ou métabolique sont classées dans cette catégorie. Ces épilepsies représentent plus de 40% des cas (Berg, 2010). Il est probable qu'une partie des épilepsies de ce groupe pourront être ensuite reclassées dans les deux groupes précédents, si un défaut structurel/métabolique ou génétique est découvert.

Au cours de ce travail de thèse, je me suis intéressée aux encéphalopathies épileptiques précoces d'origine génétique, qui sont centrées sur la période néonatale et le nourrisson.

II. Les encéphalopathies épileptiques précoces d'origine génétique

II.1. INTRODUCTION SUR LES ENCEPHALOPATHIES EPILEPTIQUES PRECOCES

II.1.1. Généralités et définition

Les encéphalopathies épileptiques précoces (EEP) sont des épilepsies sévères débutant le plus précocement dans la vie, avant l'âge de trois mois. Si elles surviennent au cours des vingt-huit premiers jours de vie, elles sont qualifiées de "néonatales". Elles appartiennent à la catégorie des encéphalopathies épileptiques car la répétition des crises contribuerait à la détérioration des fonctions cérébrales (Berg, 2010).

Les EEP sont caractérisées par la survenue de crises récurrentes et spontanées accompagnées d'activités paroxystiques sur l'EEG. La fréquence de ces crises est particulièrement importante, on dit qu'elles surviennent « en orage » ce qui fait que l'épilepsie est au premier plan du tableau clinique. Le tracé EEG intercritique est anormal dans l'immense majorité des cas. Ce tracé EEG intercritique est parfois de type « *suppression-burst* » (Figure 1). Ce tracé particulier est caractérisé par des périodes d'activité électriques appelées « bouffées paroxystiques » ou « *bursts* » interrompues par des intervalles de silence (tracé plat) ou d'amplitude faible. Le pronostic de ces EEP est défavorable dès le début des crises, notamment en terme de développement psychomoteur, et les patients présentent rapidement des déficits sensoriels, cognitifs et moteurs. La déficience intellectuelle est sévère chez ces patients. Le taux de mortalité est important dans les premières années de vie.

II.1.2. Classification des encéphalopathies épileptiques précoces

Les EEP montrent un fort degré de variabilité tant au niveau électro-clinique qu'au niveau étiologique ou physiopathologique. On distingue différents sous-types cliniques, ils sont

définis par un profil EEG spécifique, un type de crises majoritaires et une évolution sévère (Nieh, 2014). Mon équipe s'est intéressée aux quatre entités cliniques qui sont les plus précoces décrites dans la littérature (Tableau 2). Deux syndromes sont décrits chez le nouveau-né, le syndrome d'Ohtahara et l'encéphalopathie myoclonique précoce ; et deux syndromes sont décrits chez le nourrisson, le syndrome de West et l'épilepsie focale migrante du nourrisson.

On distingue ainsi :

- Le syndrome d'Ohtahara (ou encéphalopathie infantile épileptique précoce) (OS) : ce syndrome a été décrit pour la première fois par Ohtahara en 1976 (Ohtahara, 1976). Le début des crises se situe dans les trois premiers mois de vie. Une majorité des patients ont un début de crises au cours des toutes premières semaines de vie. L'imagerie médicale met en évidence des lésions associées dans 50% des cas (Aicardi et Ohtahara, 2005 ; Kaminska, 2009). Celles-ci peuvent être une porencéphalie, une hydrocéphalie, une hémimégalencéphalie, une lissencéphalie, une dysgénésie cérébrale ou une dysplasie dentato-olivaire (Harding et Boyd, 1991 ; Schlumberger, 1992 ; Ohtsuka, 1999). Ces patients porteurs de lésions ne sont pas classés dans les épilepsies d'origine génétique. Les manifestations épileptiques sont caractérisées par une majorité de crises de type tonique, de spasmes (Alam, 2012) et d'un EEG intercritique présentant un profil de *suppression-burst* avec des périodes d'activité souvent plus longues que les périodes de silence (Figure 1A). Les patients atteints par ce syndrome évoluent fréquemment vers un syndrome de West après 3 mois de vie.

- L'encéphalopathie myoclonique précoce (EMP) ou néonatale (EMN) qui a été décrite par Aicardi en 1978 (Aicardi et Goutières, 1978). Ce syndrome est très similaire à celui d'Ohtahara, ils diffèrent par le type de crises qui se présentent dans l'EMP par des crises myocloniques et/ou partielles débutant durant les trois premiers mois de vie, majoritairement au cours des dix premiers jours. L'EEG intercritique est différent et plus sévère, il présente un profil de *suppression-burst* avec des périodes de silence plus longues que les périodes d'activité (Figure 1B).

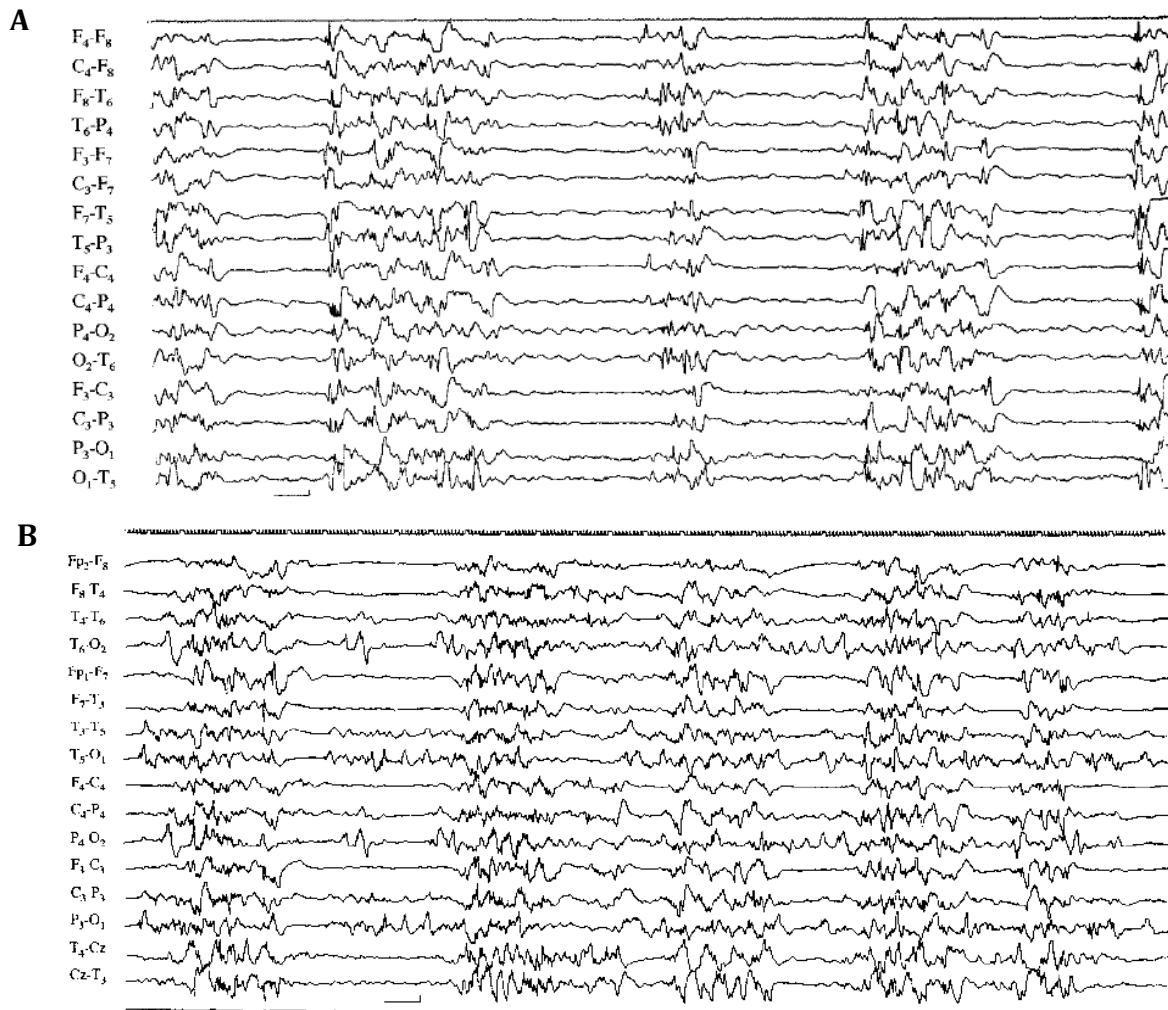


Figure 1 : Electroencéphalogramme des deux encephalopathies épileptiques néonatales (Ohtahara et Yamatogi, 2003).

(A) EEG intercritique chez un garçon âgé de deux mois atteint du syndrome d'Ohtahara montrant un profil de *suppression-burst* synchrone et bilatéral durant le sommeil. Les calibrations sont de 1 secondes pour 50 microvolts.

(B) EEG intercritique chez une fille âgée de six mois atteinte d'encéphalopathie myoclonique précoce montrant un profil de *suppression-burst* durant le sommeil. Les calibrations sont de 1 seconde pour 50 microvolts.

- L'épilepsie focale migrante de l'enfance (MMPSI) (auparavant appelé épilepsie partielle migrante de l'enfant) a été décrite par Coppola en 1995 (Coppola, 1995). Les crises débutent au cours des six premiers mois de vie et sont de type focales, peu fréquentes, puis vont progressivement migrer et devenir multifocales partielles. L'EEG critique montre des activités multifocales (Figure 2) provenant des deux hémisphères et une activité lente et diffuse (Coppola, 2013 ; Veneselli, 2001 ; Gross-Tsur, 2004 ; Marsh, 2005). L'évolution de cette pathologie est très sévère et deux périodes temporelles se distinguent. La première période se situe entre 24 jours et 10 mois avec des crises focales motrices très fréquentes qui ne répondent à aucun traitement. La seconde période montre au contraire une diminution de la fréquence des crises accompagnée d'une récupération partielle entre les crises. Le délai d'apparition de cette seconde période est très variable entre quelques jours

à quelques années et il est difficile de savoir si elle est consécutive aux traitements ou à l'évolution naturelle de la pathologie. L'arrêt des crises chez l'enfant est lié dans certains cas à une acquisition de la marche et de la préhension des objets mais également à une capacité à reconnaître leur entourage (Dulac, 2005).

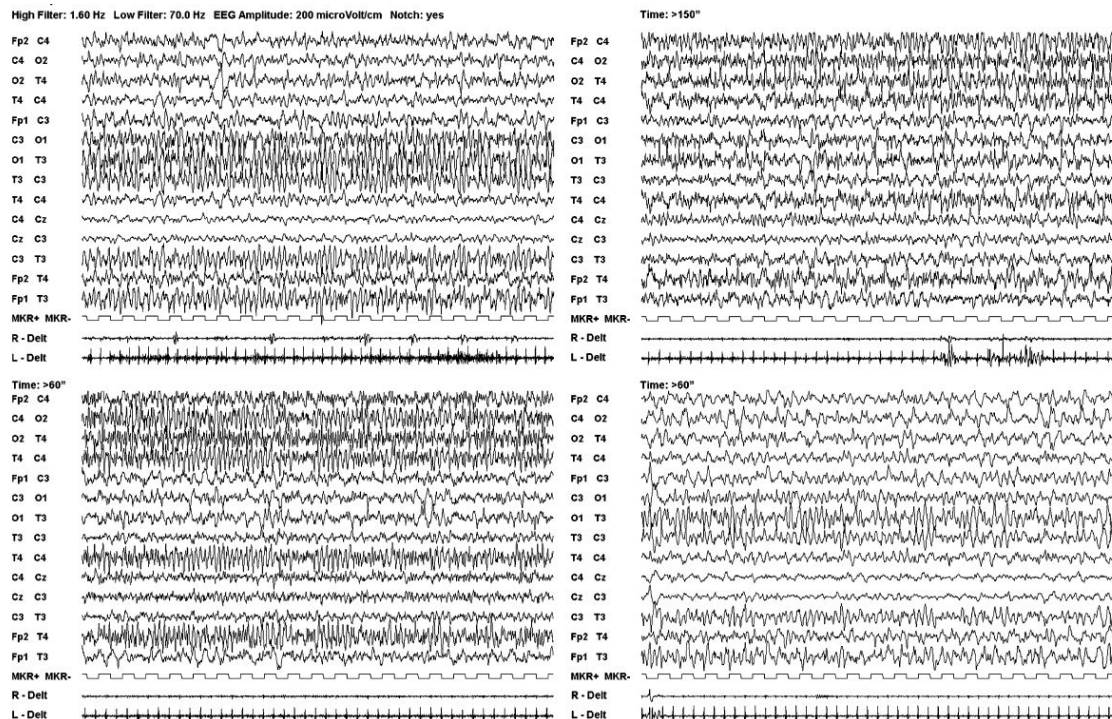


Figure 2 : Electroencéphalogramme intercritique chez un garçon âgé de cinq mois atteint d'épilepsie focale migrante de l'enfance. La décharge se termine sur le tracé au niveau temporo-occipital gauche (*en haut, tracé à gauche*), une autre commence au niveau fronto-central (*en haut tracés à gauche et à droite*) et dans les aires temporales droites (*en bas, tracé à gauche*) avec différentes fréquences puis la décharge migre dans l'aire temporale gauche (*en bas, tracé à droite*) (Coppola, 2009).

- Le syndrome de West précoce (SWP). Le syndrome de West a été décrit en 1841 (West, 1841). Il est caractérisé par des spasmes épileptiques accompagnés d'activité électro-encéphalographique de type hypersyndrome, avec une activité d'ondes lentes et de pointes irrégulières sans rythme (Figure 3 ; Sharma 2013). Les spasmes infantiles surviennent entre 1 et 6 mois. Le SW est qualifié de précoce lorsque ces spasmes apparaissent avant 3 mois. Le pronostic clinique est en général très défavorable avec une déficience intellectuelle et/ou une perte des acquisitions. Les spasmes disparaissent de façon spontanée après quelques semaines ou quelques mois suivis d'une période sans crise. Un autre type d'épilepsie peut apparaître après quelques années, elle sera plus sévère et difficile à traiter (Dulac et Tuxhorn 2005).

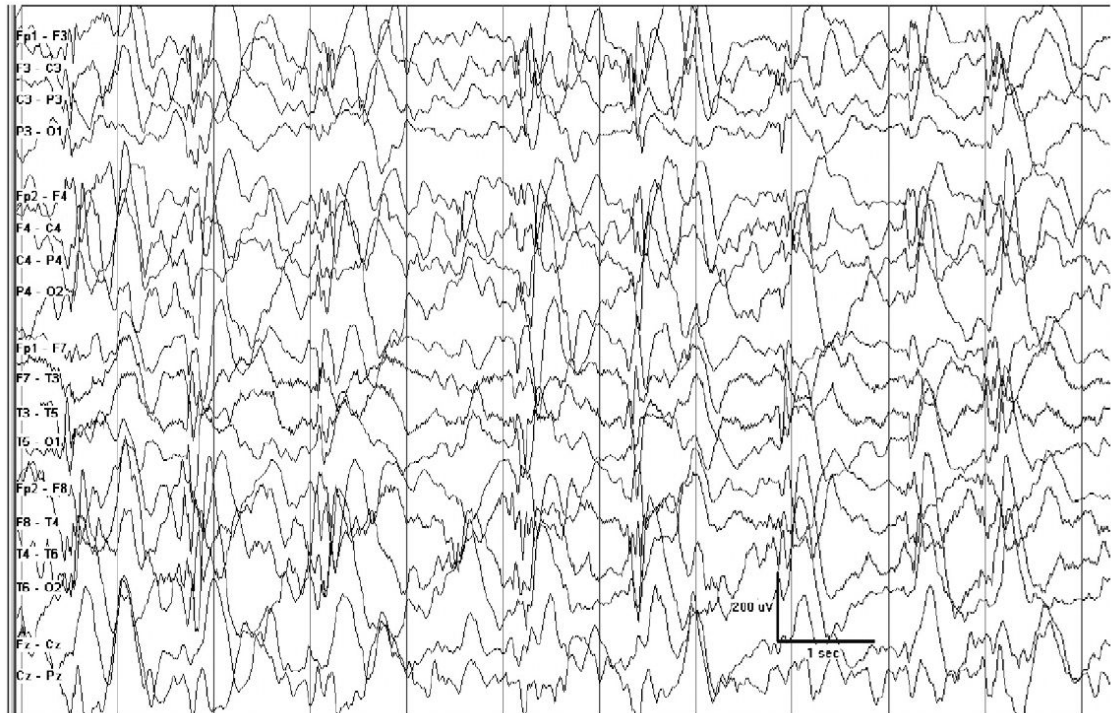


Figure 3 : Electroencéphalogramme chez une fille âgée de seize mois atteinte du syndrome de West. Une hypsarrhythmie apparaît sur le profil EEG (Korff, 2006).

Ces 4 groupes ne permettent cependant pas une classification de tous les patients atteints d'EEP, au vu des critères électro-encéphalographiques, d'imagerie et du type de crises. La distinction entre ces différents sous-types peut être très difficile du fait de l'hétérogénéité clinique et la classification selon l'ILAE n'est pas souvent représentative de la réalité clinique. De nombreux patients ne pourront pas être classés dans un des sous-groupes précédents et forment un sous-groupe nommé "EEP non classable".

La classification de l'épilepsie selon l'ILAE s'applique également aux EEP et les trois types de causes (structurelles/métaboliques, génétiques et inconnues) peuvent être également individualisées dans cette catégorie.

II.2. CAUSES GENETIQUES DANS LES EEP

II.2.1. Type d'anomalie génétique

Les remaniements génomiques dans les épilepsies

De nombreux remaniements génomiques, tels que des anomalies chromosomiques ou des variations du nombre de copies (CNV), peuvent être à l'origine d'EEP (Mefford, 2011). Les CNV sont des séquences d'ADN génomique de taille supérieure à 1 kb présentes en nombre variable dans la population. Elles participent notamment à la variabilité inter-individuelle, à l'évolution de l'espèce mais également aux pathologies. Ce n'est que récemment que les CNV ont été impliquées dans des cas d'encéphalopathies épileptiques (Garofalo, 2012 ; Helbig, 2013 ; Lesca, 2015 ;) et elles représentent environ 5% des cas totaux (Mefford, 2011). Pour être inclus dans les causes d'EEP, les CNV doivent conduire à une épilepsie non syndromique, indépendante d'une pathologie où l'épilepsie ne serait pas au premier plan clinique. Ces remaniements sont le plus souvent *de novo*, notamment du fait de la sévérité de la pathologie. Une origine germinale est ainsi souvent suspectée.

Les CNV sont recherchées à l'aide de puces d'hybridation génomique comparative (CGH). Les anomalies chromosomiques de grande taille (délétions, duplications, translocations, inversions) peuvent, quant à elles, être identifiées en utilisant la technique du caryotype, un test de routine effectué à l'hôpital.

Les mutations ponctuelles dans les EEP

Les mutations ponctuelles peuvent également être à l'origine d'EEP et ont été mises en évidence dans plus de 60 gènes (Helbig, 2013). Ces mutations ponctuelles sont en lien direct avec le phénotype clinique. Les EEP sont caractérisées par une hétérogénéité génétique très importante, ce qui peut être expliqué par la multitude de voies physiologiques pouvant entraîner une hyperexcitabilité dans un cerveau en développement. Souvent *de novo* et hétérozygotes, ces mutations peuvent être à l'origine d'une haplo-insuffisance mais également d'un effet dominant-négatif ou d'un gain de fonction. De nombreux gènes ont déjà été décrits et de nouveaux gènes continuent à être

identifiés, chaque mois, grâce à l'utilisation des techniques de séquençage à haut et moyen débit pour le diagnostic.

Le séquençage d'exome est une technique couramment utilisée pour la recherche de mutations dans de nouveaux gènes impliqués dans les épilepsies. Il permet de séquencer toutes les séquences codantes d'un génome et de les comparer à une séquence de référence afin d'en rechercher les variations. Cette analyse est généralement réalisée en trio, étude du patient et de ses deux parents. Cette stratégie permet de mettre en évidence des mutations *de novo* chez le patient. De nombreux nouveaux gènes ont pu être identifiés par les deux techniques précédentes (puces CGH et exome).

Pour rechercher ensuite de façon rapide des mutations dans des gènes impliqués dans la pathologie, des techniques de séquençage à moyen débit ont pris leur essor ces dernières années. Ainsi, les techniques de séquençage de groupes de gènes (ou "*panels*") sont utilisées dans le cadre du diagnostic de l'épilepsie ou pour la recherche de mutations dans des gènes mis en évidence par les techniques précédentes (Garofalo, 2012). Ces techniques permettent de sélectionner des gènes de façon spécifique afin de rechercher des mutations de façon plus rapide que le séquençage de type Sanger, et de façon plus spécifique et fiable que le séquençage d'exome.

II.2.2. Mise en place d'une cohorte EEP à l'hôpital de la Timone

Notre laboratoire s'intéresse aux maladies neurologiques et principalement à la caractérisation des causes génétiques dans la déficience intellectuelle. Le Pr. Mathieu Milh, neuropédiatre à l'Hôpital de La Timone à Marseille, a rejoint notre équipe il y a quelques années afin d'étudier les causes génétiques des EEP et leurs phénotypes cliniques associés. Depuis, nous avons constitué une cohorte nationale avec l'aide de nombreux centres hospitaliers en France. Nous avons choisi d'y inclure les patients qui présentaient : une épilepsie caractérisée par des crises fréquentes et une activité paroxystique accompagnée par une détérioration rapide des fonctions cérébrales, une épilepsie apparaissant avant l'âge de trois mois et aucune cause malformative et/ou métabolique identifiée suite à une IRM et un bilan métabolique. Cette analyse nous a permis de constituer une cohorte

nationale multicentrique dont le nombre est en constante augmentation : d'une soixantaine de patients début 2012 à 402 patients aujourd'hui.

Afin d'établir un diagnostic moléculaire, la recherche d'anomalies génétiques comporte dans un premier temps les puces CGH, qui identifient les remaniements génomiques déséquilibrés et dans un second temps, les techniques de recherche de mutations ponctuelles. Le génotypage est réalisé sur les gènes les plus connus dans ces pathologies, soit par séquençage utilisant la technique de Sanger, soit par séquençage de groupes de gènes. Cette dernière méthode est centrée sur le séquençage d'un groupe de 64 gènes connus pour être impliqués dans les épilepsies et dont des mutations ont été identifiées chez plus de 4 patients dans la littérature. Un caryotype peut également être effectué pour ces patients si l'examen clinique suggère une pathologie avec une anomalie chromosomique. Lorsqu'aucune anomalie connue n'est mise en évidence lors du génotypage de routine, les patients sont transférés dans un protocole de recherche si leur représentant légal donne son accord. Certains des patients sont choisis pour l'étude de leur ADN par séquençage d'exome.

Les mutations ou remaniements identifiés dans de nouveaux gènes par les techniques précédentes sont ensuite étudiés afin de progresser dans la compréhension des bases physiopathologiques de la pathologie. Ces études sont réalisées au sein de notre équipe.

II.2.3. Principaux gènes impliqués dans les encéphalopathies épileptiques précoces

Le Tableau 3 représente une liste de gènes qui ont été impliqués dans les EEP jusqu'à 2015. Certains de ces gènes ont également été décrits dans d'autres types d'épilepsies parfois différentes par le degré de sévérité ou l'âge de survenue.

Les trois gènes décrits ensuite correspondent aux principaux gènes impliqués dans les EEP. Ils représentent une sélection des gènes les plus fréquemment mutés dans notre cohorte et également le plus décrits dans la littérature.

Tableau 3 : Principaux gènes impliqués dans les encéphalopathies épileptiques précoces *OMIM* : indexation de la base de données *Online Mendelian Inheritance In Man*, *AD* : autosomique dominant, *AR* : autosomique récessif, *NR* : non référencé, *TBC* : *Tre-2/Bub2/Cdc16*, *GEF* : *guanine nucleotide exchange factor*, *GABA* : acide *Gamma-aminobutyrique*, *NMDA* : acide *N-méthyl-D-aspartique*, *NSF* : *N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*, *SNARE* : *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*

OMIM	Gène	Localisation	Mode d'hérédité	Détails sur la protéine	Référence
EIEE1	ARX	Xp22	Lié à l'X	Contrôle de la prolifération et de la différenciation	Kato, 2007
EIEE2	CDKL5	Xp22.13	Lié à l'X	Serine-Thréonine kinase	Fehr, 2013
EIEE3	SLC25A22	11p15.5	AR	Transporteur mitochondrial du glutamate	Molinari, 2005
EIEE4	STXBP1	9q34.1	AD	Protéine liée à la syntaxine (Neurotransmission)	Saitsu, 2008
EIEE5	SPTAN1	9q34.11	AD	Spectrine alpha 1 non-érythrocytaire	Tohyama, 2008
EIEE6	SCN1A	2q24.3	AD	Sous-unité alpha du canal sodique de type I (Canalopathies)	Harkin, 2007
EIEE7	KCNQ2	20q13.3	AD	Canal potassique dépendant au voltage (Canalopathies) (Thèse)	Weckhuysen, 2012
EIEE8	ARHGEF9	Xq11.1	Lié à l'X	Collybistine (GEF)	Shimojima, 2011
EIEE9	PCDH19	Xq22	Lié à l'X	Protocadherins gamma 2	Dibbens 2008
EIEE10	PNKP	19q13.33	AR	Polynucléotide kinase 3'phosphate impliqué (Réparation de l'ADN)	Shen, 2010
EIEE11	SCN2A	2q24.3	AD	Sous-unité alpha du canal sodique de type II (Canalopathies)	Herlenius, 2007
EIEE12	PLCB1	20p12.3	AR	Phospholipase C beta	Kurian, 2010
EIEE13	SCN8A	12q13.13	AD	Sous-unité alpha du canal sodique de type VIII (Canalopathies)	Ohba, 2014
EIEE14	KCNT1	9q34.3	AD	Canal potassique activé par le sodium (Canalopathies)	Barcia, 2012
EIEE15	ST3GAL3	1p34.1	AR	Beta-galactoside-alpha-2,3-sialyltransferase-III	Edvardson, 2013
EIEE16	TBC1D24	16p13.3	AR	Protéine contenant un domaine TBC (Neurotransmission)	Duru, 2010
EIEE17	GNAO1	16q12.2	AD	Sous-unité alpha d'une protéine G	Nakamura, 2013
EIEE18	SZT2	1p34.2	AR	Protéine de susceptibilité aux crises 2	Basel-Vanagaite, 2013
EIEE19	GABRA1	5q34	AD	Sous-unité alpha 1 du récepteur GABA	Carvill, 2014
EIEE20	PIGA	Xp22.2	Lié à l'X	Phosphatidylinositol glycane	Belet, 2014
EIEE21	NECAP1	12p13.31	AR	Protéine associée aux clathrines (Neurotransmission)	Alazami, 2014
EIEE22	SLC35A2	Xp11.23	Lié à l'X	Transporteur d'UDP galactose	Kodera, 2013
EIEE23	DOCK7	1p31.3	AR	GEF ayant un rôle dans la neurogenèse	Perrault 2014
EIEE24	HCN1	5p12	AD	Canal cationique activé par l'hyperpolarisation (Canalopathies)	Nava, 2014
EIEE25	SLC13A5	17p13.1	AR	Co-transporteur Citrate/Sodium	Thevenon, 2014
EIEE26	KCNB1	20q13.13	AD	Canal potassique à rectification retardée (Canalopathies)	Torkamani, 2014
EIEE27	GRIN2B	12p13.1	AD	Récepteur NMDA, sous-unité B (Canalopathie)	Endele, 2010
EIEE28	WWOX	16q23.1	AR	Oxidoreductase contenant un domaine WW	Mignot, 2015
EIEE29	AARS	16q22.1	AR	Enzyme alanyl-ARNt synthétase nucléaire	Simons, 2015
EIEE30	SIK1	21q22.3	AD	Serine-Thréonine kinase	Hansen, 2015
EIEE31	DNM1	9q34.11	AD	Dynamine (Neurotransmission)	Appenzeller, 2014
EIEE32	KCNA2	1p13.3	AD	Canal potassique dépendant au voltage (Canalopathies)	Syrbe, 2015
EIEE33	EEF1A2	20q13.33	AD	Facteur eucaryote d'élongation de la traduction alpha 2	de Ligt, 2012
EIEE34	SLC12A5	20q13.12	AR	Transporteur sodique (Canalopathies)	Stöberg T
EIEE35	ITPA	20q13	AR	Inosine triphosphate pyrophosphatase	Kevalam, 2015
NR	CACNA2D2	3p21.31	AR	Canal calcique dépendant au voltage (Canalopathies)	Pippucci, 2013
NR	GRIN2A	16p13.2	AD	Récepteur NMDA, sous-unité A (Canalopathie)	Endele, 2010
NR	PIGQ	16p13.3	AR	Phosphatidylinositol glycane	Martin, 2014
NR	SCN1B	19q13.11	AD	Sous-unité beta du canal sodique de type I (Canalopathies)	Sijben, 2009
NR	NAPB	20p11.21	AR	Protéine d'attachement au facteur NSF, dissociation du complexe SNARE (Neurotransmission)	Conroy, 2016
NR	PNPO	17q21.32	AR	Pyridoxamine 5'-phosphate oxydase	Mills, 2005

KCNQ2 (EIEE7)

Les mutations du gène *KCNQ2* (*potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily member 2*), localisé en 20q13.33, sont responsables d'EEP (Weckhuysen 2012) mais également d'épilepsies néonatales familiales bénignes (BFNS). La description de la clinique des patients porteurs de mutations dans ce gène ainsi que la description de la protéine seront détaillés dans la partie III. Les mutations de ce gène correspondent à 40% de toutes les causes génétiques identifiées dans notre cohorte.

STXBP1 (EIEE4)

Le gène *STXBP1* est situé en 9q34.1. Ce gène code une protéine très exprimée dans le cerveau, appelé *Syntaxin Binding Protein 1*. Cette protéine joue un rôle dans l'exocytose des neuromédiateurs en interagissant avec le complexe SNARE. Ce complexe permet la fusion des membranes de la cellule et de la vésicule synaptique et est donc important pour réguler les processus d'exocytose/endocytose.

Une microdélétion comprenant le gène *STXBP1* a été décrite pour la première fois en 2008 chez un patient atteint d'EEP (Saitsu, 2008). Plusieurs mutations ponctuelles ont par la suite été décrites chez d'autres patients présentant le même profil clinique (Deprez, 2010). Toutes les mutations décrites jusqu'à présent sont *de novo*. Les mutations faux-sens de la protéine *STXBP1* sont localisées dans le cœur hydrophobe de la protéine ; la déstabilisation de structure qui en résulte serait la cause de la dégradation plus rapide de la protéine (Saitsu, 2008).

Le phénotype clinique des patients porteurs de mutations ou de microremaniements impliquant *STXBP1* n'est pas clairement défini. La moitié des patients présenterait un profil type de OS qui peut évoluer vers un SW (Di Meglio, 2015), et quelques patients ont un SW au diagnostic initial (Otsuka, 2010). Parmi les patients porteurs de mutations dans le gène *STXBP1*, seulement 10% des patients ne présentent ni un SW spécifique ni un OS (Deprez, 2010 ; Milh, 2011).

Un article (Hamdan, 2011) a montré un cas de délétion du gène *STXBP1* à l'origine d'une déficience intellectuelle sans épilepsie. Les mutations dans ce gène peuvent donc être

responsables principalement d'épilepsie précoce, sans syndrome associé, mais également de déficience intellectuelle. Dans notre cohorte, les mutations dans ce gène représentent 24% des causes génétiques identifiées.

SCN8A (EIEE6)

Le gène *SCN8A* (*Sodium voltage-gated alpha subunit type VIII*) est situé en 12q13.13. Il a d'abord été impliqué dans des formes de déficience intellectuelle, de dystonies, d'ataxies et de tremblements (Trudeau, 2006) puis dans une forme d'épilepsie infantile (Veeramah, 2012) grâce au séquençage d'exome. Des mutations hétérozygotes dominantes et *de novo* ont été décrites en 2014 chez 7 patients présentant une EEP (6 souffrant d'épilepsie néonatale et 1 d'épilepsie partielle migrante) (Ohba, 2014). Ces mutations correspondent majoritairement à des mutations faux-sens et sont localisées sur la totalité du gène.

Au diagnostic initial, la caractérisation des patients porteurs d'une mutation dans le gène *SCN8A* a montré qu'ils présentent des crises débutant après la période néonatale, au cours des 3 à 8 premiers mois de vie, accompagnées d'une déficience intellectuelle et d'une régression intellectuelle après le début des crises. Les crises sont de type spasmes épileptiques, tonico-cloniques généralisées, toniques et/ou focales, elles sont accompagnées de mouvements anormaux. Pour la majorité des patients, l'EEG montre de nombreux pics d'activité. Seul un patient présente un profil de type *suppression-burst*. Une minorité de patients présente des crises dans la période néonatale (Ohba, 2014, Estacion, 2014). Les patients porteurs d'une mutation dans le gène *SCN8A* ont donc un profil clinique différent des patients mutés pour les gènes *STXBP1* ou *KCNQ2*. En effet, les mutations dans le gène *SCN8A* peuvent être responsables d'épilepsies au cours de la première année de vie, à la différence des épilepsies impliquant les deux autres gènes où la maladie est présente dès la période néonatale. L'EEG caractéristique de type *suppression-burst*, souvent retrouvé chez les patients mutés pour le gène *STXBP1*, est absent des patients mutés pour le gène *SCN8A* qui ont un EEG de type hypsarythmique. Une équipe a rapporté toutes les mutations connues pour le gène *SCN8A* mettant en évidence la grande diversité de phénotypes pour les patients concernés (Takahashi, 2015). Suite à cette étude, nous avons réalisé le génotypage de notre cohorte pour ce gène et nous avons découvert 11 mutations dans le gène *SCN8A* ce qui permet de classer les mutations de ce gène dans les

causes génétiques les plus fréquentes représentées dans notre cohorte (13% de toutes les causes génétiques identifiées).

II.2.4. Physiopathologie des épilepsies

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine des épilepsies conduisent à une dérégulation de l'excitabilité neuronale. Il existe dans le cerveau un équilibre entre l'excitation et l'inhibition permettant de conserver une activité neuronale stable. Si l'équilibre est modifié et entraîne une hyperactivité ou une baisse d'inhibition, le résultat pourra être l'apparition d'une épilepsie. Les processus d'activation d'un neurone sont la sommation temporelle et spatiale le long des dendrites de potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) ou inhibiteurs (PPSE) provenant de la stimulation du neurone, la génération du potentiel d'action, la propagation de ce potentiel d'action (PA) le long de l'axone suivi d'une augmentation de calcium intracellulaire au niveau présynaptique puis une fusion des vésicules contenant des neurotransmetteurs qui sont relargués dans la fente synaptique. Chaque neurotransmetteur, qu'il soit excitateur ou inhibiteur va agir au niveau synaptique sur des récepteurs dédiés pour permettre la transmission de l'influx nerveux. Ces neurotransmetteurs sont ensuite métabolisés afin d'être recyclés et réutilisés. Les principaux neurotransmetteurs du système nerveux central sont le glutamate (excitateur) et l'acide gamma-aminobutyrique (GABA, inhibiteur). Deux mécanismes sont décrits principalement dans l'épilepsie et conduisent à une dérégulation de l'excitabilité neuronale : l'altération de l'activité des canaux ioniques (Figure 4), et les défauts de la neurotransmission, conduisant à un déficit de stimulation au niveau des réseaux neuronaux.

Depuis début 2010, de nombreuses mutations dans de nouveaux gènes sont décrites dans les EEP (Mastrangelo, 2015). Les gènes impliqués codent pour des protéines nécessaires à de nombreuses voies cellulaires et qui ne sont pas directement impliquées dans l'excitabilité.

II.2.4.1. Les canalopathies

Les canalopathies sont des pathologies impliquant de nombreux canaux ioniques situés dans tout le corps humain. Les épilepsies dues à des mutations dans des canaux ioniques sont les premières à avoir été décrites. Les canaux ioniques régulent l'excitabilité neuronale dans le système nerveux central et les autres tissus excitables. Les canaux ioniques jouent un rôle crucial au sein du système nerveux central en permettant la génération du PA, en régulant l'excitabilité neuronale et en intervenant sur la signalisation au sein des réseaux de neurones (Kim, 2014). De façon simplifiée, les canaux sodiques vont permettre la génération du PA, tandis que les canaux potassiques vont intervenir dans la phase de repolarisation du PA et provoquer l'hyperpolarisation post-PA (Figure 5A, *schéma du potentiel d'action*). Le rôle des canaux ioniques est si important pour l'excitabilité des neurones qu'une anomalie même très faible peut être à l'origine d'une épilepsie, en provoquant une dérégulation de la balance excitation-inhibition neuronale. Le rôle des canaux ioniques dans la génération d'une épilepsie est donc largement décrit dans la littérature (Figure 4) et considéré comme l'une des premières causes de l'épilepsie de façon directe ou indirecte.

Les épilepsies liées aux canaux ioniques sont génétiquement très hétérogènes. Les mutations peuvent intervenir au niveau de canaux ioniques dépendant du voltage ou de la liaison à un ligand (Mantegazza, 2015). Lors de la découverte d'une mutation dans un gène codant pour un canal ionique, la fonctionnalité des canaux mutés peut être étudiée de façon approfondie par l'électrophysiologie. Les mutations peuvent être à l'origine de nombreux défauts dans le canal ionique (Figure 4).

Par exemple, pour le syndrome de Dravet, qui est une épilepsie sévère du nourrisson, plus d'une centaine de mutations dans le gène *SCN1A* codant pour le canal sodique Nav1.1 ont été décrites. Ce canal est important pour la génération du potentiel d'action des neurones inhibiteurs. Les mutations dans ce gène sont responsables d'une perte de fonction et donc d'une diminution de l'excitabilité des neurones inhibiteurs GABAergiques. Cette diminution de potentiel d'action provenant de ce type de neurones va donc créer une excitabilité accrue des neurones excitateurs et pourrait expliquer les crises d'épilepsies chez les enfants (Kim, 2014).

De nombreux médicaments agissant sur les canaux sodiques sont disponibles (Bagal, 2015) et peuvent permettre d'atténuer ou de supprimer les crises chez les patients. Des mutations dans des gènes codant des canaux sodiques (*SCN8A*, *SCN1A*, *SCN2A*), mais également dans des gènes codant des canaux potassiques (*KCNQ2*, *KCNQ3*) ont été fréquemment décrites dans les épilepsies et notamment les EEP.

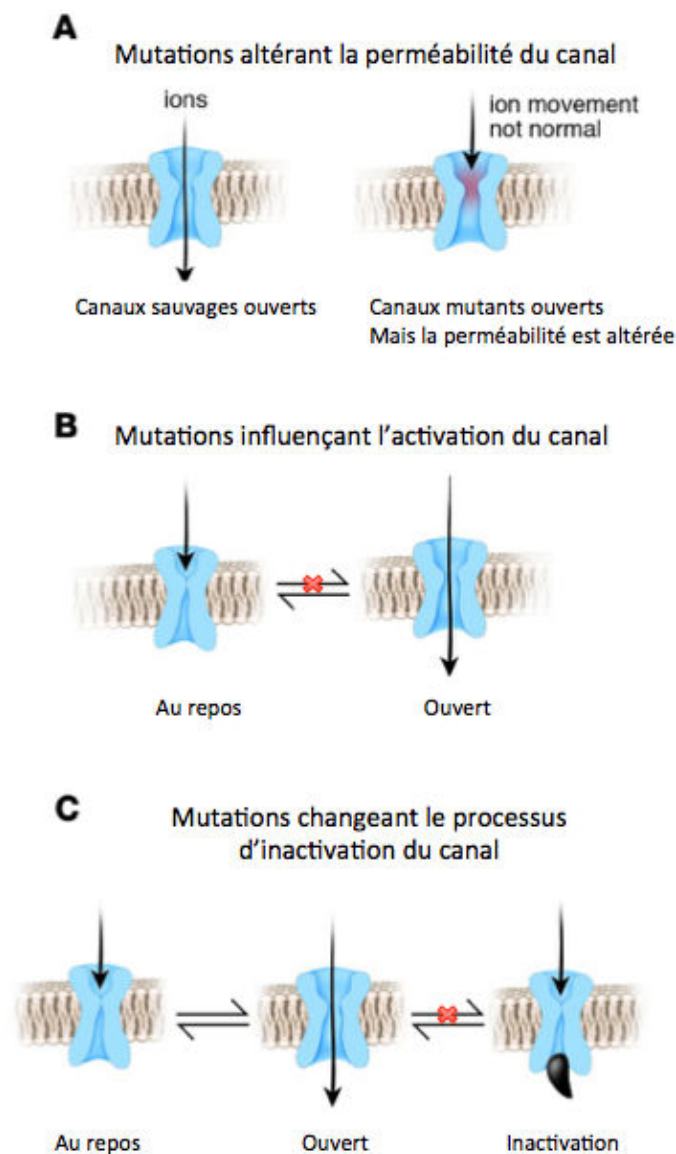


Figure 4 : Représentation schématique des différents niveaux d'altération d'un canal (D'après Kass, 2005)

(A) Les mutations peuvent influencer la perméabilité du canal en inhibant le mouvement des ions à travers le canal.

(B) Les mutations peuvent également déstabiliser le processus d'activation du canal.

(C) Les mutations peuvent empêcher le processus d'inactivation. Dans ce cas, ces mutations sont des gains de fonction.

II.2.4.2. Les défauts de neurotransmission

Les acteurs de la neurotransmission permettent le fonctionnement et la communication inter-neuronale. La neurotransmission s'effectue par le biais du relargage du contenu des vésicules à la membrane de la terminaison synaptique suite à une décharge neuronale provoquant une augmentation de calcium. Le relargage des vésicules synaptiques est réalisé sous la régulation d'un complexe protéique appelé SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor*). Ce complexe est essentiel pour la fusion des vésicules à la membrane plasmique. Les principales protéines appartenant au complexe SNARE sont la syntaxine 1A, la protéine SNAP25 (*Synaptosomal-associated protein 25*) et la protéine VAMP2 (*Vesicle-associated membrane protein*) (Rizo, 2008). Ces protéines permettent l'exocytose via la fusion des membranes de la vésicule et de la cellule (Figure 5A et B).

De nombreuses protéines vont interagir avec ce complexe et permettre la libération dans la fente synaptique de neurotransmetteurs (NT). Certains tissus épileptiques présentent une concentration extracellulaire de glutamate importante. Cette concentration pourrait être à l'origine d'une excitabilité anormale ainsi que d'une mort cellulaire neuronale (Seifert, 2010). Les NT vont ensuite agir à la membrane post-synaptique par le biais de récepteurs pour provoquer une stimulation. Ils sont ensuite dégradés ou recyclés par les astrocytes et par le neurone pré-synaptique. Cette recapture est à nouveau dépendante d'un complexe protéique permettant l'endocytose. Puis les NT sont métabolisés sous forme inactive dans les cellules par des enzymes spécifiques et peuvent être acheminés à nouveau vers le neurone où une synthèse des formes actives prêtes à être libérées a lieu.

Le glutamate a déjà été impliqué de nombreuses fois dans les épilepsies. Les mutations dans le gène *STXBP1* pourraient être à l'origine d'une protéine défectueuse ce qui serait un exemple de modification de la neurotransmission (Figure 5B). Des expériences sur la protéine *STXBP1* mutante ont montré une diminution de l'interaction de la protéine *STXBP1* avec la syntaxine-1 (protéine du complexe SNARE) et une diminution de la libération des neurotransmetteurs (Patzke, 2015). D'autres gènes codant pour des protéines intervenant dans le recyclage des vésicules ont été impliqués dans l'épilepsie. Entre autres, les protéines *DOCK7* et *Dynamine-1*, codées par les gènes *DOCK7* (*Dedicator*

of cytokines 7) et *DNM1*, font ainsi partie des complexes permettant la recapture de neurotransmetteurs et sont également impliquées dans l'épilepsie (Perrault, 2014 ; Hamdan, 2015 ; Nakashima, 2016).

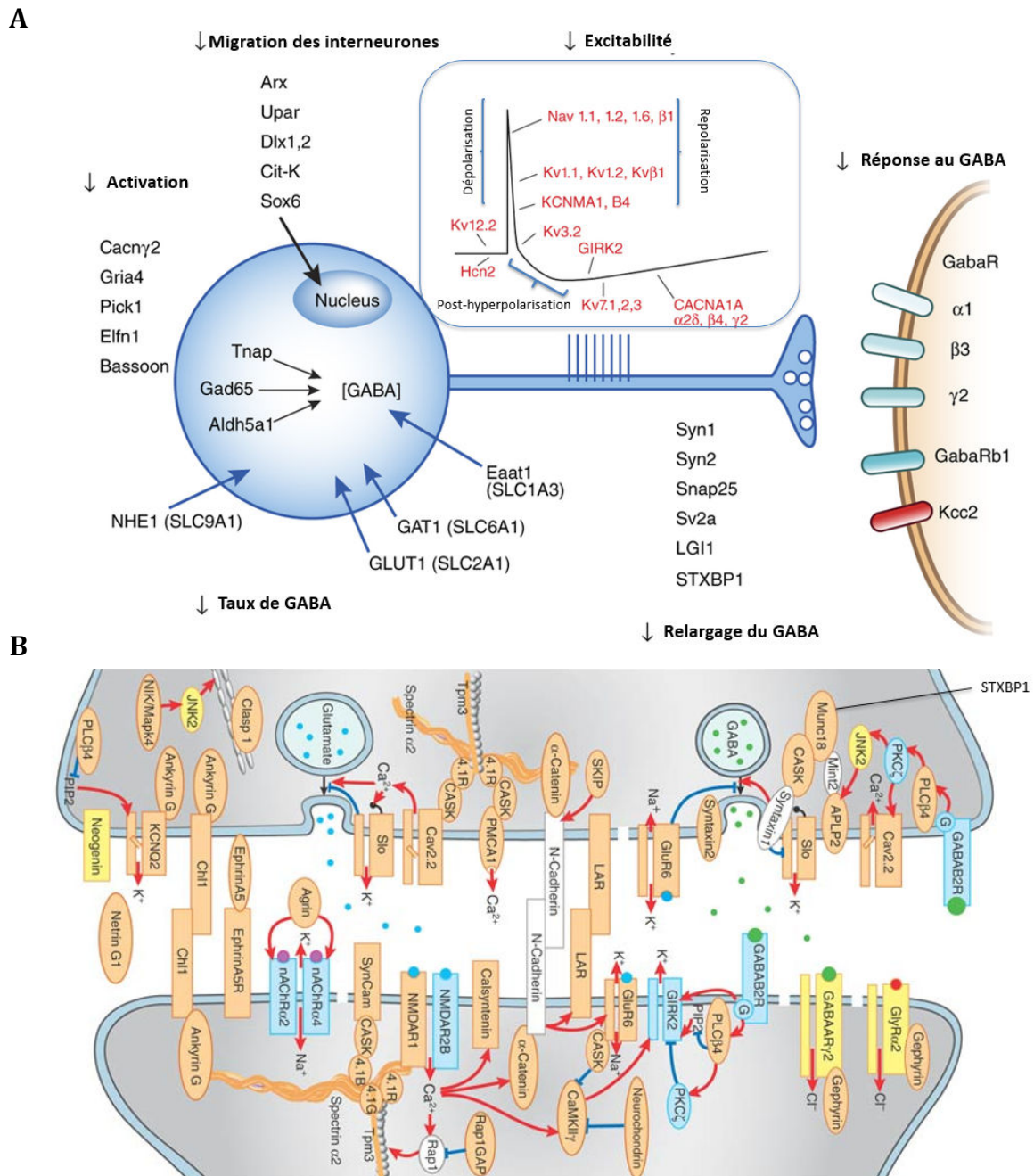


Figure 5 :

(A) Représentation schématique de différentes protéines impliquées dans les épilepsies

Les mutations dans les gènes impliqués dans les épilepsies peuvent être responsables d'une altération de la transmission synaptique inhibitrice à tous les niveaux cellulaires du développement précoce jusqu'à la maturation des neurones Gabaergiques adultes. Le schéma dans l'encadré bleu représente un potentiel d'action avec les 3 phases (dépolariation, repolarisation, post-hyperpolarisation) et les canaux impliqués dans ces phases qui ont été décrits dans les épilepsies. (D'après Noebels, 2015)

(B) Représentation schématique d'une fente synaptique. Les mutations peuvent altérer de nombreuses protéines synaptiques (Munc-18 représente la protéine STXBP1) (D'après Ule, 2005)

II.2.4.3. Dérégulation du métabolisme

Des mutations dans des gènes codant pour d'autres protéines telles que la sous-unité phosphatidylinositol N-acetyl glucosaminyltransferase A (gène *PIGA*) et la sous-unité phosphatidylinositol N-acetyl glucosaminyltransferase Q (gène *PIGQ*) sont impliquées dans les EEP (Kato, 2014 ; Martin, 2014). Ces deux protéines jouent un rôle dans les premières étapes de synthèse des glycolipides et surtout de l'ancre glycoposphatidyl inositol (GPI). Cette ancre glycolipidique est spécifique de certaines protéines qui ne sont pas ancrées à la membrane plasmique par des segments transmembranaires. Un défaut de ce métabolisme a été décrit dans des épilepsies avec hypotonies (Watanabe, 1998).

II.2.4.4. Défaut de régulation génique

Des facteurs de transcription peuvent également être à l'origine d'un déficit d'une population neuronale et provoquer une épilepsie. Le gène *ARX* code un facteur de transcription. Des mutations provoquant des expansions d'alanine dans ce gène sont à l'origine d'une augmentation de l'excitabilité neuronale suite à un réarrangement des réseaux neuronaux (Beguin, 2013) et d'épilepsie.

D'autres mécanismes cellulaires, comme la réparation de l'ADN peuvent intervenir dans l'épilepsie. Des mutations tronquantes dans le gène *PNKP* qui code la polynucléotide kinase 3'-phosphatase sont impliquées dans une épilepsie sévère et précoce (Shen, 2010 ; Reynolds, 2012). Cette kinase est centrale dans les mécanismes de réparation de l'ADN non-homologue après cassure double brin ou de la réparation par excision de base (Karimi-Busheri, 2007). Des défauts de ce mécanisme ont déjà été impliqués dans des syndromes avec une épilepsie (Takashima, 2002).

Du fait de l'hétérogénéité clinique et génétique des patients, la recherche de mutations impliquées dans les EEP repose à présent surtout sur des analyses à haut-débit permettant d'étudier plus de gènes sans cibler uniquement quelques voies. Cette variété complexifie également la recherche de molécules thérapeutiques. A l'heure actuelle, il existe peu de

traitements efficaces et les attentes des patients et de leurs familles restent très importantes. Il est donc essentiel de comprendre dans son ensemble les phénomènes physiopathologiques qui découlent des mutations, afin de pouvoir proposer un traitement adapté.

III. Etude du gène *KCNQ2*

Mon équipe a fait le choix d'étudier la physiopathologie des EEP. Notre étude s'est focalisée principalement sur le gène *KCNQ2* dont les mutations sont les plus représentées dans notre cohorte EEP. Ce gène code pour la sous-unité d'un canal potassique appelée Kv7.2.

III.1. BIOLOGIE DES CANAUX KV7 NEURONAUX

III.1.1. Les canaux potassiques dépendants du voltage

En terme de structure et de fonction, les canaux potassiques sont les plus diversifiés par rapport aux autres canaux dans le monde animal (Jentsch, 2000, Robbins 2001). Ils sont présents dans de nombreux types cellulaires différents, y compris les cellules non excitables. Les membres de cette famille régulent de nombreux mécanismes cellulaires tels que la signalisation intercellulaire via le relargage de neurotransmetteurs, l'excitabilité cardiaque, la sécrétion d'insuline et l'excitabilité neuronale (Shieh, 2000).

Il existe trois grandes familles de canaux potassiques : les canaux à deux passages transmembranaires (représentés majoritairement par les K_{ir}), les canaux à 4 passages transmembranaires avec deux pores et les canaux à 6 passages transmembranaires (Kv) (Miller, 2000). Les canaux *KCNQ* appartiennent à la famille des canaux Kv7, qui sont dépendants du voltage. Il existe 5 types différents de canaux Kv7.x numérotés de 1 à 5, chacun de ces canaux est composé de 4 sous-unités Kv codées chacune par les gènes *KCNQ1-5* correspondants.

Quatre de ces canaux (Kv7.1-4) sont impliqués dans des pathologies diverses en fonction de leur expression (Figure 6). Le canal Kv7.1 est exprimé majoritairement dans le cœur où il est responsable d'une arythmie cardiaque appelée syndrome du QT long lorsqu'il est muté (Wang, 1998). Les canaux Kv7.2-5 sont exprimés dans le système nerveux, le canal Kv7.4 est impliqué dans une surdité à transmission autosomale dominante (Kubish, 1999) et les mutations dans les gènes *KCNQ2* et *KCNQ3* sont décrites dans les épilepsies précoces

(Biervert, 1998 ; Weckhuysen, 2012 ; Soldovieri, 2011). Nous nous sommes intéressés à ces deux derniers gènes.

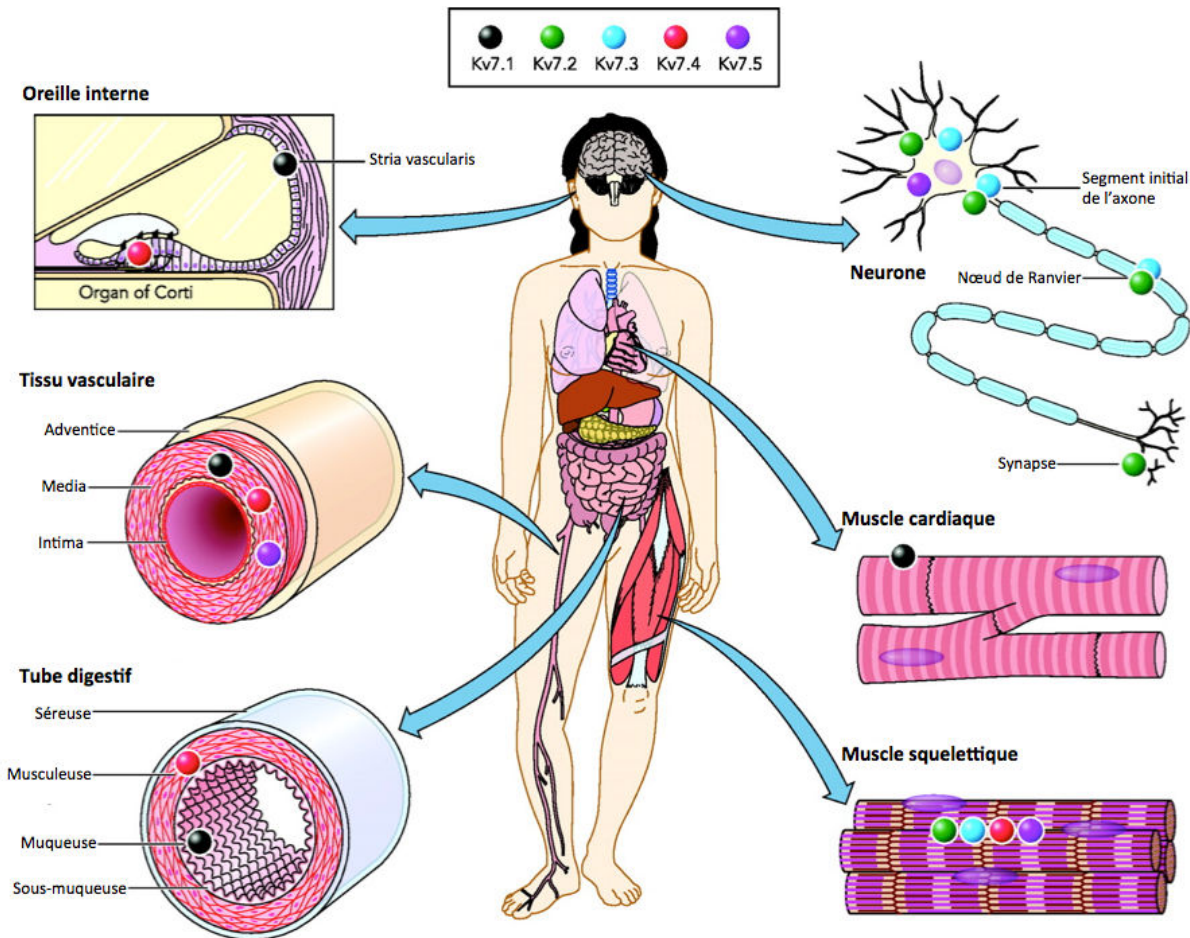


Figure 6 : Représentation simplifiée de l'expression des sous-unités Kv7 dans différents tissus (Soldovieri, 2011)

III.1.2. Rôle des canaux Kv7 neuronaux

Génération du courant I_M

Les canaux Kv7.2 et Kv7.3 permettent la génération d'un courant potassique appelé I_M (ou courant M ou KCNQ/M) car il est inhibé par l'activation des récepteurs muscariniques (Brown et Adams, 1980). Ces canaux potassiques KCNQ/M sont dépendants du voltage et ils vont répondre à une dépolarisation de la membrane plasmique. Ils s'ouvrent à partir de -60 mV, c'est à dire à un potentiel sous-liminaire (Yang, 1998). En conséquence, la particularité des canaux de type Kv7 est d'être activés très tôt au cours de la génération d'un PA. La dépendance au voltage et la cinétique du canal sont deux caractéristiques principales et essentielles pour le fonctionnement du courant M (Marrion, 1997). En

réponse à une variation de potentiel de membrane plus important, il y a augmentation de la probabilité d'ouverture du pore et le passage des ions potassium via leur gradient électrochimique de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. Ces canaux potassiques ont une cinétique lente avec une dépendance au potentiel de membrane (Figure 7), c'est à dire que la cinétique d'activation s'accélère avec la dépolarisation du PA (Brown, 2009). Contrairement à la plupart des canaux dépendants du voltage, ils ne s'inactivent pas, c'est-à-dire que les canaux Kv7 vont s'ouvrir et se fermer en fonction du potentiel sans période de latence. Ainsi, ces canaux Kv7 neuronaux ont la capacité de rester ouverts si le potentiel de membrane reste au-dessus du potentiel d'ouverture (-60 mV). Dès l'ouverture des canaux KCNQ/M, les ions potassium vont progressivement repolariser la membrane plasmique. La fermeture du canal est dépendante du voltage, elle va commencer dès la phase descendante du PA et finira longtemps après. Les canaux KCNQ/M sont à l'origine de l'hyperpolarisation post-potentiel d'action où le potentiel descend en dessous du potentiel de repos. Cette période réfractaire (aussi appelée *afterhyperpolarisation*, AHP) est nécessaire pour empêcher la survenue de PA successifs.

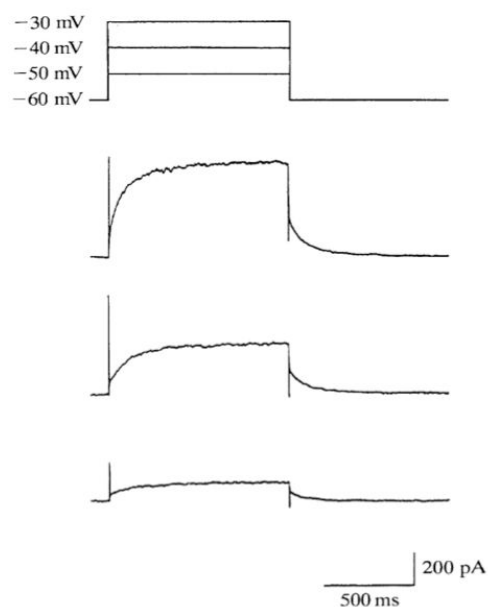


Figure 7: Profil d'un courant I_M enregistré dans les neurones sympathiques du ganglion cervical supérieur. Enregistrement par une électrode en configuration patch perforé sur une cellule dépolarisée de -60 mV à -30 mV avec des pas de potentiel de 10 mV (Brown, 2009)

Le courant M joue un rôle très important de régulateur de l'excitabilité neuronale au sein du SNC, notamment du fait de sa capacité à être actif rapidement à des potentiels bas et

proches du seuil d'initiation du PA (Marrion, 1997). De plus, cette propriété d'activation et de désactivation lente lui confère des propriétés très différentes de celles des canaux potassiques responsables de l'inactivation rapide du PA. Il n'atteindra pas son maximum d'activité au pic de PA mais dans la phase descendante qui s'en suit. Lors d'un stimulus exciteur dépolarisant le neurone, le canal KCNQ/M sera ouvert avant l'atteinte du seuil du potentiel d'action. Il n'agira donc pas tout de suite après le pic mais empêchera plutôt la survenue d'un PA successif au premier.

Rôle dans le potentiel de membrane et le seuil de genèse des PA

Les canaux Kv7 neuronaux ont un rôle régulateur dans l'activité des neurones. Des données ont montré que le blocage de l'adressage des canaux Kv7 provoquaient une dépolarisation des cellules et une décharge spontanée des neurones (Shah, 2008 ; Battefeld, 2014). La présence de I_M contrôle le potentiel de membrane et le seuil de genèse des PA. Ainsi, le potentiel de repos du neurone au niveau de l'axone serait stabilisé grâce à la présence des canaux Kv7 (Shah, 2008).

Rôle dans l'intégration synaptique

L'intégration synaptique est la capacité du neurone à réaliser une sommation à la fois temporelle et spatiale des potentiels post-synaptiques exciteurs (PPSE) ou inhibiteurs (PPSI) arrivant dans les dendrites (Figure 8). La présence de canaux Kv7 au niveau du soma va modifier l'intégration synaptique en réduisant la sommation temporelle des PPSE (Shah, 2011). Les canaux Kv7 somatiques ont un rôle pour modérer l'activité excitatrice.

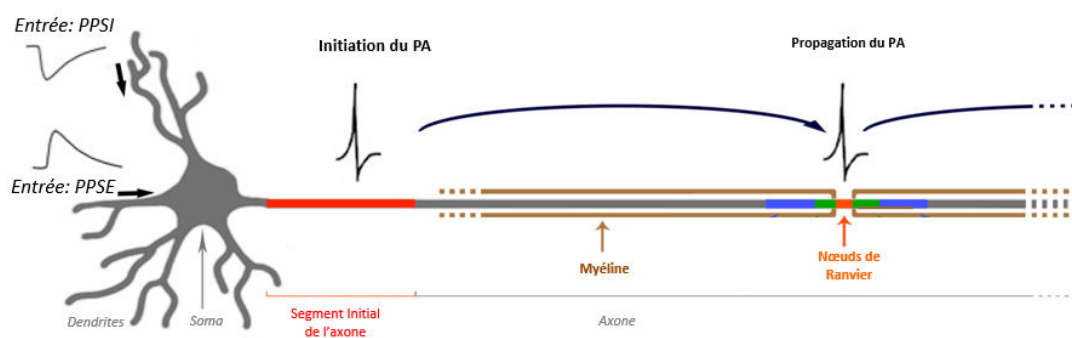


Figure 8 : Représentation schématique d'un neurone et de la propagation des potentiels (D'après Duflocq, 2011) PPSI : *post-potentiel d'action synaptique inhibiteur*, PPSE : *post-potentiel d'action synaptique exciteur*.

Contrôle de la configuration de la décharge

Dans le système nerveux, chaque PA est suivi par une phase d'hyperpolarisation post-potentiel d'action (AHP) qui existe pour des PA uniques ou pour des trains de potentiel d'action. Trois types de périodes se distinguent avec différentes cinétiques, elles sont nommées rapide (*fast*), moyenne (*medium*) et lente (*slow*) AHP en fonction de leur durée de persistance. Le courant I_M possède un rôle prédominant dans la *medium* AHP (ou mAHP) au niveau des cellules pyramidales du néocortex (Figure 9) (Gu, 2005).

La mAHP est un élément permettant le mécanisme d'adaptation des pics d'activité (ou *spikes*) suite à un train de PA. Il s'agit d'un mécanisme permettant une fréquence moins élevée des pics de potentiel lors d'une stimulation constante et soutenue (Yue et Yaari, 2004). En effet, après un premier pic de potentiel, le courant est actif et provoque une augmentation de la conductance de membrane et le canal KCNQ/M reste ouvert durant une période assez longue bien après que les autres canaux ioniques intervenant dans le potentiel d'action soient fermés. Le courant KCNQ/M permet de maintenir un courant sortant et de créer une hyperpolarisation post-potentiel d'action (Figure 9, Yue et Yaari, 2004 ; Zaika, 2006 ; Brown, 2009). Puis, ils vont se fermer ensuite progressivement lorsque le potentiel de membrane est hyperpolarisé ce qui permettra de rétablir le potentiel membranaire. Ce courant potassique sortant, qui persiste après un PA, va diminuer le potentiel membranaire et donc augmenter le seuil d'activation nécessaire pour la génération d'autres potentiels d'action ce qui aura pour effet de diminuer la durée et la fréquence des trains de potentiels d'action suite à une dépolarisation soutenue (Yue et Yaari, 2004).

Ce mécanisme existe dans de nombreux neurones, dont les neurones hippocampiques, sympathiques et certains neurones corticaux (Rogawski, 2000). Des souris transgéniques pour le gène *Kcnq2* exprimant une forme dominante-négative de la sous-unité Kv7.2, montrent une diminution dans le mécanisme d'adaptation des potentiels d'action (Peters, 2005) et une génération de trains de potentiels d'action plus importante.

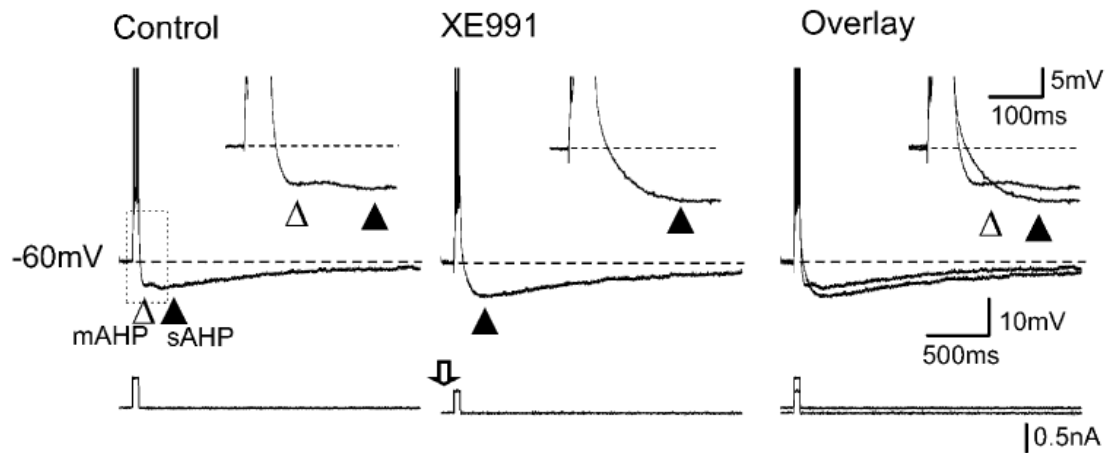


Figure 9 : Le blocage de I_M supprime l'hyperpolarisation post-potentielle d'action moyenne (mAHP) *sAHP* : hyperpolarisation post-potentielle d'action lente (D'après Gu, 2005)
Enregistrement en configuration cellule entière qui montre un blocage du courant M par 10 μ m de XE991 bloquant la mAHP des potentiels de membrane de -60 mV.

Rôle dans la neurotransmission

En absence d'acétylcholine agissant sur les récepteurs muscariniques, le courant M joue un rôle important en hyperpolarisant le potentiel de membrane. Il va donc participer à la régulation de l'activité des PA en abaissant le potentiel en dessous du seuil, en diminuant les propriétés de réponse des neurones mais également en diminuant les influx synaptiques dans certains neurones (Shieh, 2000). Lors du relargage d'acétylcholine, le courant M sera inhibé ce qui va permettre aux neurones de répondre aux signaux synaptiques et favorisera également les bursts de PA à l'excitation. Les canaux KCNQ/M pré-synaptiques dans l'hippocampe vont participer à l'hyperpolarisation de la membrane plasmique, ce qui provoque une diminution de l'influx des canaux calciques dépendants du voltage. Cette baisse de calcium entraîne alors une diminution du relargage des neurotransmetteurs comme la noradrénaline, le GABA et le D-aspartate (Martire, 2004 ; Peretz, 2007). Néanmoins, des données de la littérature montrent qu'au niveau pré-synaptique, les canaux KCNQ/M ne pourraient exercer un rôle que lorsque le neurone est déjà dépolarisé car leur ouverture serait trop longue en comparaison à l'arrivée d'un potentiel d'action (Vervaeke, 2006). Selon ce principe, le courant I_M ne pourrait participer au relargage de neurotransmetteurs que dans les conditions expérimentales utilisées où le potentiel de membrane du neurone est déjà dépolarisé.

III.1.3. Structure des canaux potassiques Kv7.2 et Kv7.3

Les sous-unités Kv possèdent 6 segments transmembranaires, numérotés de S1 à S6 (Figure 10). Ces 6 hélices s'organisent en 3 grandes parties structurales comprenant (1) un pore permettant le passage des ions, (2) un filtre sélectif restreignant la spécificité à une espèce ionique préférentielle, (3) un domaine de sensibilité au voltage (VSD, *voltage sensor domain*) permettant un mécanisme d'ouverture pour passer de l'état fermé à l'état ouvert (Shieh, 2000 ; Robbins, 2001).

Les sous-unités Kv7.2 et Kv7.3 ont ces trois grandes parties structurales qui sont transmembranaires. Le segment S4 constitue le VSD et contrôle ainsi l'ouverture du pore (Miller, 2000). Il contient des résidus chargés positivement, lysine ou arginine, toutes les trois positions (Shieh, 2000) qui vont se lier par interaction électrostatique à d'autres résidus chargés négativement dans les domaines S2 et S3, ce qui permet l'ouverture du canal. Les segments S5 à S6 sont reliés entre eux par une hélice alpha membranaire appelée boucle P. Les trois segments S5-boucle P- S6 forment le "core" du canal créant le pore pour le passage des ions (Figure 11). Chaque sous-unité possède dans sa boucle P une séquence consensus permettant la sélectivité à l'ion potassique : TMxTVGYG (Heginbotham, 1994 ; Shieh, 2000). S'ajoutent à cette partie transmembranaire du canal, une partie amino-terminale (N-terminale) et une partie carboxy-terminale (C-terminale) liant des protéines de régulation et permettant la liaison à d'autres sous-unités (Figure 10). La partie C-terminale est composée de plusieurs hélices alpha, notées de A à D. Ces hélices sont importantes pour la liaison de protéines interagtrices (A-B), mais également pour la dimérisation et la tétramérisation des sous-unités (Figure 10) (Tu et Deutsch, 1999 ; Schwake, 2006 ; Chung, 2014). Les hélices A et B forment un domaine appelé TCC1 (*tetramerizing coiled-coil 1*) et les hélices C et D un domaine appelé TCC2 (*tetramerizing coiled-coil 2*) ou SI (*subunit-interaction*) ou domaine A (Jenke, 2003 ; Schwake, 2003) (Figure 10).

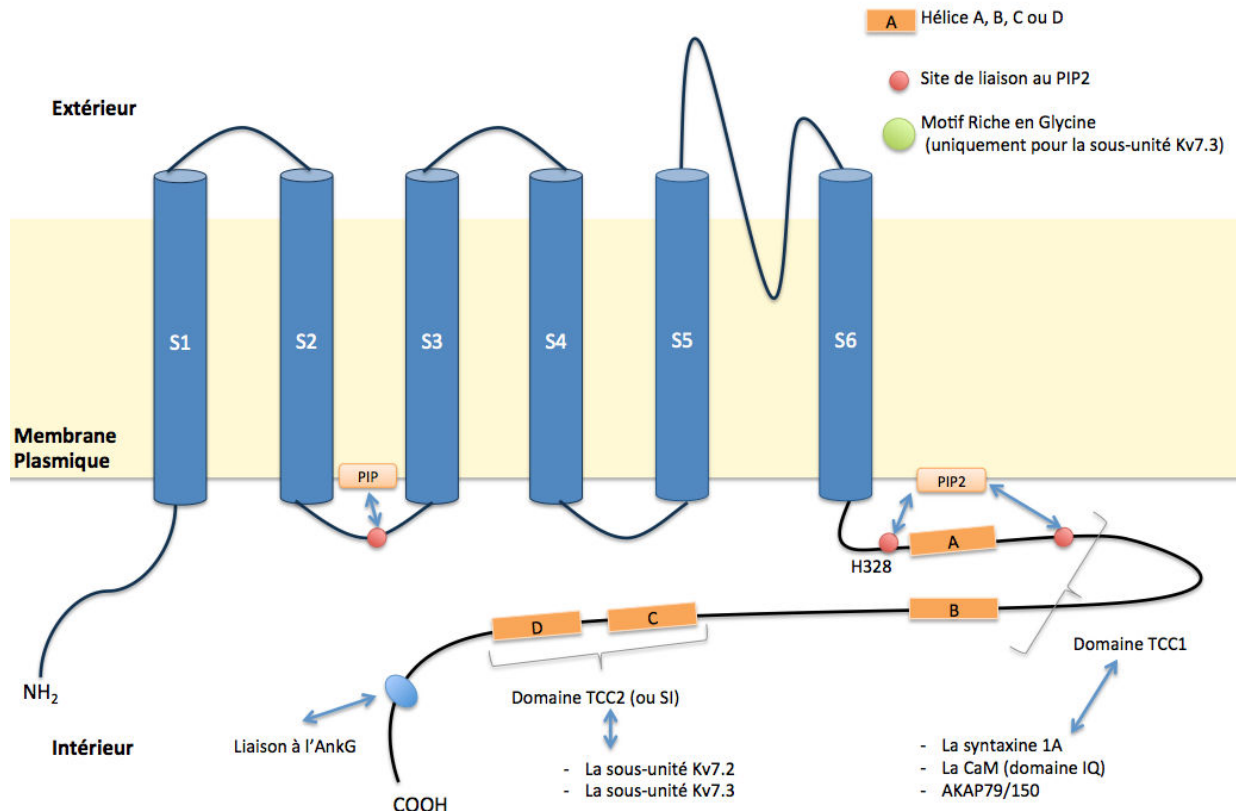


Figure 10 : Structure schématique d'une sous-unité Kv7.2 ou d'une sous-unité Kv7.3

Cette représentation schématique met en évidence les interactions des sous-unités Kv7.2 ou Kv7.3 avec des protéines partenaires.

III.1.4. Expression des canaux potassiques de type Kv7

III.1.4.1. Tétramérisation des canaux Kv7.2 et Kv7.3

Les sous-unités Kv7.2 et Kv7.3 vont s'associer entre elles, au niveau de la partie C-terminale, pour former un homotétramère ou un hétérotétramère (Figure 11) dans le réticulum endoplasmique (RE). Les canaux ioniques sont ensuite adressés à la membrane plasmique (Schwake, 2006). Les hélices C et D des sous-unités Kv7.2 et Kv7.3 permettent cette tétramérisation. La sous-unité Kv7.3 possède des acides aminés changeant la polarité du domaine SI et permettant l'hétéromérisation (Howard, 2007 ; Nakajo, 2008). Les sous-unités Kv7.2 ont une affinité préférentielle pour les sous-unités Kv7.3 plutôt que pour elles-mêmes, ce qui favorise l'hétéromérisation Kv7.2-Kv7.3 par rapport à l'homomérisation (Kv7.2 ou Kv7.3 seules) (Howard, 2007 ; Nakajo, 2008).

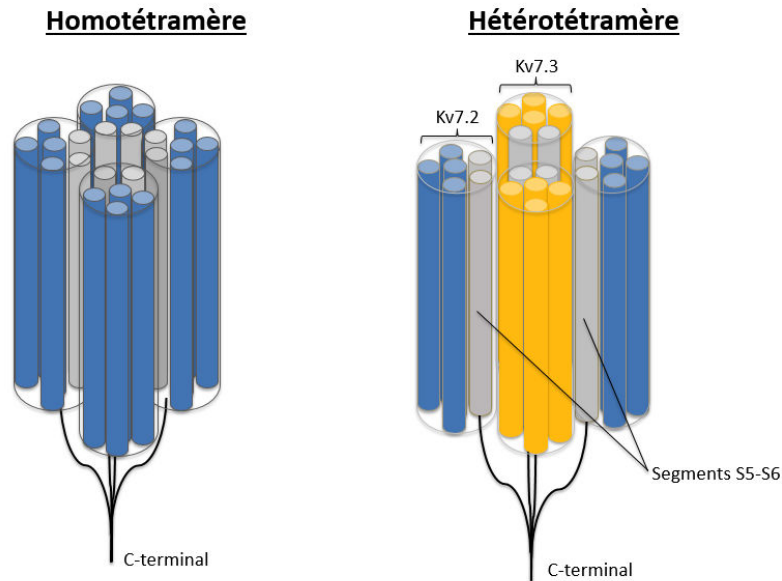


Figure 11 : Structure schématique représentant un homotétramère (Kv7.2) et un hétérotétramère (Kv7.2-Kv7.3). Les colonnes grises représentent le pore avec les segments S5-S6.

L'hétéromérisation des sous-unités Kv7.3 avec d'autres sous-unités est possible et dépendante de la localisation et de l'expression des autres protéines. Certains articles ont montré qu'une liaison de Kv7.3 à Kv7.5 (Schroeder, 2000) ou à Kv7.4 (Kubisch, 1999) était possible mais il n'existe pas de liaison de Kv7.2 à Kv7.4 ou à Kv7.5. Cet assemblage, Kv7.3-Kv7.5, pourrait réguler ainsi dans le cerveau la quantité d'hétéromères Kv7.2-Kv7.3 en limitant les quantités des sous-unités Kv7.2-Kv7.3 disponibles (Schroeder, 2000). L'expression différentielle des sous-unités dans le cerveau permettrait l'existence de plusieurs populations neuronales caractérisées par la présence d'un courant différent en fonction de la composition des hétérotétramères (Schroeder, 2000).

III.1.4.2. Protéines partenaires des sous-unités Kv7.2-Kv7.3

L'expression des canaux potassiques est régulée par de nombreuses protéines formant un complexe moléculaire. Le site majoritaire d'interaction de ces partenaires est situé dans le domaine C-terminal des sous-unités Kv7 (Figure 9). Les principales protéines intervenant dans la régulation de Kv7.2 sont présentées ci-dessous.

L'ankyrine G

Les ankyrines sont des protéines intracellulaires se liant à la fois aux protéines de la membrane plasmique et à différentes protéines du cytosquelette (Rubtsov, 2000). Elles ont une affinité particulière pour les spectrines. Elles contiennent des répétitions de vingt-quatre domaines ANK, un domaine ZU5, un domaine DEATH qui permettrait la liaison aux protéines impliquées dans l'apoptose et un domaine régulateur dans leur région C-terminale (Bennett et Healy, 2008). Les domaines ANK sont des super-hélices qui permettent la liaison à la membrane, tandis que le domaine ZU5 permet la liaison aux spectrines et l'ancrage au cytosquelette. Il existe trois types d'ankyrines : l'ankyrine B, l'ankyrine G (AnkG) et l'ankyrine R, elles sont codées par des gènes différents. L'AnkG est celle qui permet la localisation au segment initial de l'axone de nombreux canaux (Bennett et Healy, 2009). Elle est indispensable pour empêcher l'entrée dans l'axone de protéines spécifiquement localisées dans le compartiment somatodendritique telle que la protéine MAP2 (Hedstrom, 2008).

L'AnkG va se lier à un site d'interaction de 80 acides aminés appelé C3, situé dans le domaine C-terminal de chaque sous-unité Kv7.2 ou Kv7.3 (Figure 10). A l'intérieur de ce domaine C3, une séquence de 10 acides aminés est indispensable à la liaison spécifique de l'AnkG (Pan, 2006).

La syntaxine 1A

Les syntaxines sont des protéines membranaires appartenant au complexe moléculaire SNARE. Elles sont capables d'interagir avec de nombreux canaux au niveau de la fente synaptique et de les réguler ce qui a été très décrit pour les canaux Kv1.1, Kv2.1 et Kv7.2 (Mohapatra, 2007 ; Regev, 2009).

La syntaxine 1A est une protéine pouvant lier les canaux Kv7.2 et Kv7.3 homomériques ou hétéromériques, via l'hélice A du domaine C-terminal (Regev, 2009 ; Soldovieri, 2014). Lors de sa liaison, elle va diminuer la densité de courant, en diminuant la probabilité d'ouverture des canaux. Il a été montré que la syntaxine 1A agirait peu sur un courant issu de canaux hétéromériques (Regev, 2009). Les parties N-terminale et C-terminale d'une sous-unité Kv7 peuvent interagir ensemble et la syntaxine 1A semble inhiber le courant

KCNQ/M en interagissant avec le domaine N-terminal. Au contraire, la sous-unité Kv7.3 possède dans sa partie N-terminale, un motif GR pour "Glycine Rich", absent dans les sous-unités Kv7.2 (Figure 10). Cette partie distale GR empêche l'action de la syntaxine 1A en limitant l'accès à la partie N-terminale de la protéine ce qui explique la faible sensibilité des canaux hétéromériques à cette protéine (Etzioni, 2011).

L'inhibition du courant homomérique Kv7.2 au niveau du bouton présynaptique des neurones par la syntaxine 1A serait déterminante pour la libération des neurotransmetteurs. En effet, une inhibition des canaux Kv7.2 permettrait d'augmenter le relargage synaptique (Regev, 2009 ; Etzioni, 2011).

La calmoduline

La calmoduline (CaM) est une protéine qui permet la régulation du calcium intracellulaire (Jurado, 1999). Sa liaison au calcium lui permet de réguler des protéines, soit par changement de conformation et interaction directe avec d'autres protéines, soit par modulation du calcium intracellulaire. Cette protéine ubiquitaire interagit avec de nombreuses cibles protéiques centrales pour le fonctionnement de la cellule (telles que des kinases, des phosphatases, des pompes ATPases ou des protéines du métabolisme). Cette sensibilité au calcium est supportée par ses domaines à quatre mains EF. Ces structures sont composées de deux hélices alpha de 30 acides aminés reliées entre elles par une boucle, où va se lier une molécule de calcium. La calmoduline peut donc simultanément lier quatre molécules de calcium. Deux mains EF forment un domaine globulaire et pour la calmoduline, il existe donc deux domaines globulaires nommés lobes N- et C-, situés respectivement dans les domaines N- et C- terminaux (Chung, 2014). La calmoduline non liée au calcium est appelée apo-calmoduline (apoCaM) et celle liée au calcium est appelée holocalmoduline (holoCaM).

La partie N-terminale de la CaM va se lier sur la partie C-terminale des protéines. La liaison repose sur des structures spécifiques. Les domaines IQ sont des régions protéiques de 20-25 résidus souvent composées d'acides aminés hydrophobe : IQXXRGXXR (Rhoads, 1997 ; Bahler, 2002). Les domaines IQ des cibles de la CaM permettent de lier l'apoCaM (Jurado, 1999) tandis que des motifs sont spécifiques de la liaison à l'holoCaM. Ces motifs sont des séquences de 20 acides aminés contenant des résidus hydrophobes à des

positions spécifiques. Les deux principaux les plus décrits sont les motifs 1-5-10 (ou motif 1-10) et 1-8-14 (ou motif 1-14), numérotés selon la position de ces résidus hydrophobes conservés entre les protéines (Rhoads, 1997).

La calmoduline interagit avec les hélices alphas A (321 à 358) et B (536 à 567) des parties C-terminales des sous-unités Kv7.2 ou Kv7.3 (Figure 10 ; Wen et Levitan, 2002 ; Yus najera, 2002). Ces structures en hélices sont donc importantes puisque des mutations, changeant la polarité ou la conformation de ces sites, ont un effet sur la liaison de la calmoduline (Richards, 2004 ; Ambrosino, 2015). Le site A des sous-unités Kv7.2 et Kv7.3 possède un motif IQ, IQXXXR, spécifique pour la liaison à la calmoduline (Yus Najera, 2002) tandis que le site B contient un motif consensus 1-5-10 pouvant lier l'holocalmoduline (Rhoads et Friedberg, 1997 ; Xu, 2013). Pour les canaux Kv7, la liaison de la calmoduline est dépendante de la conformation apo-CaM ou holo-CaM. L'apoCaM pourrait se lier aux hélices A et B, via le domaine 1-5-10, tandis que l'holoCaM pourrait ne se lier qu'à l'hélice B (Alaimo, 2013 ; Xu, 2013).

Le rôle de la calmoduline sur les canaux Kv7 serait de (i) réguler l'assemblage des sous-unités, (ii) moduler les canaux en fonction de la concentration du calcium, (iii) faciliter l'interaction des canaux avec d'autres protéines de signalisation et (iv) réguler le trafic des canaux dans les neurones, par sortie du RE et expression à la membrane plasmique (pour revue voir Chung 2014). Elle facilite la tétramérisation des sous-unités au niveau du domaine C-terminal (Schwake, 2006). L'holocalmoduline contribue à la formation de canaux Kv7.2-Kv7.3 en se liant par des liaisons faibles au motif 1-5-10 situé dans l'hélice B de la sous-unité Kv7.3 ou Kv7.2 (Rasmussen, 2007 ; Liu, 2013). L'holocalmoduline aurait une affinité différente en fonction de la configuration homomérique ou hétéromérique des canaux (Kosenko, 2013). L'apocalmoduline se lierait, quant à elle, uniquement à la sous-unité Kv7.3 au niveau des domaines IQ avec une forte affinité et coordonnerait la formation préférentielle des complexes Kv7.2/3 (Liu et Devaux 2014). La calmoduline aurait un rôle crucial sur le courant I_M , et une diminution de la liaison de la calmoduline au canal entraîne une augmentation de l'excitabilité par réduction du courant I_M (Shahidullah, 2005).

Plusieurs publications (Huawen, 2002 ; Gomez posada, 2011 ; Kosenko, 2013 ; Liu et Devaux, 2014) ont montré un rôle important du calcium, via l'holoCaM, en tant qu'inhibiteur des canaux Kv7.2 (Gamper, 2003). Il est difficile de conclure aujourd'hui sur le rôle précis de la calmoduline sur les canaux Kv7 qui peut dépendre des modèles cellulaires utilisés ou de l'activité intrinsèque des cellules (Delmas, 2005 ; Shahidullah, 2005 ; Etzioni, 2011).

Le Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate et la protéine kinase C

Le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) est un composé essentiel de la membrane plasmique et il régule de nombreuses voies cellulaires, telles que les processus d'endocytose-exocytose et les voies métaboliques via son hydrolyse par la phospholipase C (PLC) en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP3). Le DAG activera la protéine kinase C (PKC) et les voies transcriptionnelles qu'elle contrôle ; l'IP3 va mobiliser les stocks calciques du RE et provoquer une augmentation du calcium intracellulaire qui va contribuer à l'activation de la PKC (Bruch, 1996). Il joue également un rôle dans la formation des microvilli et dans l'attachement des protéines membranaires au cytosquelette (Kosenko, 2012). Il agit en tant que cofacteur pour plusieurs types de canaux (Zhang, 2003).

La liaison du PIP2 aux canaux Kv7 pourrait se faire au niveau du domaine C-terminal. Pour Kv7.2, la liaison se fait sur l'histidine 328 située dans le site A (Figure 10 ; Zhang, 2003). Une liaison entre les sites A et B est également possible dans une région identifiée par analogie avec d'autres canaux possédant une séquence spécifique de liaison au PIP2 (Figure 10 ; Hernandez, 2008). Enfin une dernière étude suggère que l'interaction est dynamique et dépendante de l'état, ouvert-fermé du canal (Zhang, 2013).

Le PIP2 est essentiel pour l'activation des canaux Kv7, l'absence de PIP2 provoquant une inhibition du courant I_M (Zhang, 2003). L'hydrolyse de PIP2 via l'activation de la PLC serait ainsi un modulateur puissant du courant M. Cette déplétion est observée dans les neurones orthosympathiques, par hydrolyse du PIP2 suite à l'activation des récepteurs muscariniques (Brown, 2007). Le PIP2 aurait notamment besoin de la liaison de la calmoduline pour agir sur les canaux Kv7 (Kosenko, 2012). Il aurait donc également un rôle au niveau de la sensibilité de Kv7.2 à l'activation des récepteurs muscariniques M1 couplés aux protéines Gq. Lors de l'activation de la PLC et de la PKC par les récepteurs

muscariniques, la PKC va d'une part dissocier la calmoduline de Kv7.2 par phosphorylation au niveau de la sérine 541 (Kosenko, 2012) qui diminue la liaison CaM-Kv7.2 et d'autre part, la PLC va hydrolyser le PIP2 circulant en IP3 et DAG. La dissociation de la calmoduline et la diminution de PIP2 intracellulaire auront pour conséquence une association réduite du canal Kv7.2 – Kv7.3 aux PIP2 membranaires ce qui provoquera la fermeture du pore du canal (Hansen, 2011). Ceci pourrait expliquer pourquoi le courant I_M est inhibé par l'activation des récepteurs muscariniques. D'autres récepteurs couplés aux protéines Gq et localisés dans d'autres neurones vont également agir au niveau de Kv7.2, le récepteur AT1 sensible à l'angiotensine II (Zaika, 2006) au niveau des ganglions sympathiques en est un exemple. Ce récepteur va également provoquer la déplétion du PIP2 et provoquer l'inhibition du courant I_M .

Les protéines AKAP79/150 et la protéine kinase A

La protéine AKAP (*A Kinase Anchoring protein*) se lie aux protéines kinases A (PKA) et permet leur activation. Les PKA permettent la signalisation intracellulaire et régulent également de nombreuses voies cellulaires par la phosphorylation. Les protéines AKAP150 sont numérotées différemment en fonction de l'orthologue, chaque numéro correspondant à la taille de la protéine en kDa : AKAP79 chez l'humain, AKAP150 chez la souris/rat, AKAP75 chez la vache (Wong, 2004). L'AKAP79/150 forment un complexe avec la protéine PKA, mais est également capable de lier la PKC et les canaux Kv7 pour former un complexe moléculaire trimérique (Higashida, 2005).

La protéine AKAP79/150 s'associe au domaine C-terminal de la sous-unité Kv7.2 (Figure 10 ; Hoshi, 2003) et faciliterait ainsi l'interaction de Kv7.2 avec l'holo-CaM, en se liant à cette dernière (Kosenko, 2013). Un deuxième rôle de l'AKAP79/150 concerne la calcineurine qui pourrait se lier à l'AKAP79/150 lors d'une excitation neuronale suivie de l'augmentation calcique intracellulaire associée (Zhang, 2012). Cette association provoquerait une déphosphorylation de NFATc1 et NFATc2 (*Nuclear Factor Of Activated T-Cells, Cytoplasmic, Calcineurin-Dependent 1 et 2*) et leur translocation nucléaire. Ces deux acteurs agiraient en tant qu'activateur transcriptionnel de Kv7.2 (Zhang, 2012). Ainsi, la stimulation neuronale entraînerait une réponse modulatrice par l'augmentation de l'expression des canaux Kv7. Enfin l'AKAP79/150 serait impliquée directement dans l'inhibition muscarinique de Kv7.2.

En effet, la liaison de l'AKAP79/150 à la PKC et au récepteur muscarinique M1 faciliterait l'inhibition des canaux en les rapprochant des canaux Kv7 (Hoshi, 2005).

III.1.4.3. Expression membranaire de Kv7.2 et Kv7.3

Les canaux Kv7 sont exprimés à la surface de la cellule et permettent la sortie du courant potassique de l'intérieur vers l'extérieur, cette expression à la membrane s'effectue par le biais de protéines qui permettent le bon adressage des canaux. La tétramérisation des canaux Kv7 a lieu au niveau du RE et il sera empaqueté dans des vésicules qui vont ensuite être adressée avec les canaux à la membrane plasmique. La sortie des canaux du RE serait dépendante de la calmoduline, et ce mécanisme est majoritairement contrôlé par l'holocalmoduline (Etxeberria, 2008). Deux étapes d'activation seraient nécessaires à leur sortie : la première comprend la liaison de la calmoduline aux canaux, le second, un changement de conformation permettant la sortie du RE (Alaimo, 2009). L'holocalmoduline, en se liant au site A, aurait un rôle dans l'expression des canaux à la membrane plasmique en intervenant sur la sortie du RE (Etxeberria, 2008 ; Chung, 2014). Des mutations sur l'hélice B abolissent la liaison de la calmoduline, mais ne diminuent pas l'expression des canaux Kv7.2 à la membrane plasmique (Posada, 2011). Jusqu'à présent, la calmoduline reste la plus étudiée et l'unique candidate, en dehors des autres sous-unités, pour un rôle dans l'expression de Kv7.2 à la membrane plasmique.

La sous-unité Kv7.3 joue également un rôle important sur l'expression à la membrane plasmique des sous-unités Kv7.2. Ainsi, l'expression simultanée des sous-unités Kv7.2 et Kv7.3 permet un adressage à la membrane plasmique plus efficace que celui des deux sous-unités séparément et une stabilisation des canaux à la surface de la cellule (Schwake, 2000). Les canaux hétéromériques (Kv7.2-Kv7.3) génèrent alors un courant I_M plus important (jusqu'à 10 fois supérieur) à celui des canaux homomériques Kv7.2 (Schwake, 2000) sans que la probabilité d'ouverture ou la conductance du canal n'augmente. L'expression des canaux Kv7.3 homomériques à la membrane plasmique est très faible à cause de la présence d'une séquence de rétention du RE sur cette sous-unité. L'association

de Kv7.3 à Kv7.2 permettrait le masquage de cette séquence de rétention du RE et rendrait ainsi possible l'adressage à la membrane plasmique des sous-unités Kv7.3 (Nakajo, 2008).

III.1.4.4. Localisation subcellulaire des canaux Kv7.2-Kv7.3

Le segment initial de l'axone (AIS) est une structure importante, située au début de l'axone, il représente une barrière physique, au niveau membranaire et cytoplasmique, entre le compartiment somato-dendritique et l'axone (Figure 8; Song, 2009), permettant notamment un contrôle de la ségrégation entre ces deux compartiments. L'AIS permet l'intégration des potentiels post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs et la génération d'un potentiel d'action consécutif au signal reçu. Il constitue une plateforme protéique importante, avec notamment de nombreuses protéines membranaires dont la quantité est régulée de façon fine. Ces protéines sont ancrées à une "protéine échafaudage", l'AnkG, qui interagit avec une protéine du cytosquelette d'actine, la spectrine beta IV (spectrine β IV) (Wimmer, 2010). Les principaux canaux ioniques présents sont les canaux sodiques dépendant du voltage (Nav) permettant l'initiation du PA mais également de nombreux canaux potassiques (Kv), pour la régulation post-PA, et des canaux calciques (Figure 5A) (Wimmer, 2010).

Les canaux Kv7.2- Kv7.3 montrent une expression enrichie au niveau de l'AIS et aux nœuds de Ranvier grâce à leur ancrage par l'AnkG sur la spectrine β IV (Chung, 2006). Des canaux Kv7 sont également présents au niveau distal de l'axone et au niveau des terminaisons présynaptiques.

Les nœuds de Ranvier sont des structures du SNC et du SNP qui permettent la conduction saltatoire des potentiels d'action. Les nœuds se présentent architecturalement comme des espaces entre les gaines de myéline et sont enrichis de canaux sodiques et potassiques, avec une composition toutefois différente de celle de l'AIS (Debanne, 2011).

La localisation des canaux Kv7.2-Kv7.3 a été étudiée sur des neurones hippocampiques et montre que la localisation préférentielle des canaux est axonale (Chung, 2006). Comme mentionné précédemment, la CaM et l'AnkG sont des protéines importantes pour l'expression des canaux à l'AIS (Rasmussen 2007, Devaux 2010). La calmoduline permet

l'adressage des canaux au niveau de l'AIS (Cavaretta, 2014 ; Liu et Devaux, 2014) tandis que l'AnkG permet l'ancrage des canaux Kv7.2/Kv7.3 à l'AIS via la spectrine β IV (Chung, 2006 ; Pan, 2006). Le blocage des sites d'interaction des sous-unités Kv7.2-Kv7.3 à l'AnkG par un peptide nommé ABP, entraîne une augmentation de l'excitabilité neuronale (Shah, 2008). Ces données soulignent donc l'importance de l'ancrage par AnkG pour le fonctionnement des canaux à l'AIS. Les canaux homomériques sont, quant à eux, majoritairement exprimés au compartiment somatodendritique et au niveau synaptique (Liu et Devaux, 2014).

La plupart des nœuds de Ranvier expriment des canaux Kv7 hétéromériques mais quelques-uns exprimeraient uniquement des canaux homomériques (Devaux, 2004 ; Pan, 2006). Des expériences d'immunohistochimie ont montré que la sous-unité Kv7.2 pouvait être exprimée à la fois au niveau des nœuds de Ranvier dans le SNC mais également dans le SNP (Devaux, 2004; Pan, 2006). Les canaux Kv7 appartenant aux nœuds de Ranvier sont situés au niveau des nerfs sciatiques, de la corne ventrale de la moelle épinière, du cortex cérébelleux, de l'hippocampe et du cortex cérébral (Pan, 2006 ; Chung, 2006). Des expériences sur la spectrine β IV ont montré un rôle important du cytosquelette dans la localisation des canaux Kv7 au niveau des nœuds de Ranvier. Ainsi, un déficit en spectrine β IV provoque une diminution des canaux au niveau des nœuds de Ranvier mais une localisation conservée à l'AIS (Devaux, 2004).

Des modifications post-traductionnelles peuvent également modifier l'adressage, c'est le cas pour la phosphorylation de la sous-unité Kv7.2 par la caséine kinase CK2 qui augmente la liaison de l'AnkG et conduit donc à une augmentation de canaux Kv7 à l'AIS et aux niveau des nœuds de Ranvier (Xu et Cooper, 2015). L'expression aux nœuds de Ranvier est médiée par le domaine C-terminal de Kv7.2, celui-ci est situé dans la partie la plus proche de la membrane plasmique et dans le domaine A (Chung, 2006).

III.1.4.5. Localisation neuronale des canaux potassiques Kv7.2 et Kv7.3

Les études de localisation des sous-unités Kv7.2 et Kv7.3 ont été réalisées sur des coupes de cerveaux humains et murins, à partir du développement fœtal jusqu'à la période adulte.

Chez l'homme, l'expression de la sous-unité Kv7.2 commence dès 22 semaines de gestation dans l'hippocampe puis apparaît ensuite à 29 semaines de gestation dans le lobe temporal, la *medulla oblongata* et le cervelet (Kanaumi, 2008). L'expression de Kv7.2 augmente ensuite fortement à la naissance dans ces régions et également dans le cortex puis elle diminue ensuite fortement durant l'enfance et son expression reste très faible chez l'adulte (Cooper, 2000 ; Kanaumi, 2008). L'expression de la sous-unité Kv7.3 va quant à elle, apparaître tardivement à 36-39 semaines de gestation dans l'hippocampe, le lobe temporal et le cervelet. Elle apparaît à 29 semaines de gestation uniquement dans la *medulla oblongata*. Puis, l'expression de la sous-unité Kv7.3 augmente à la naissance et diminuera ensuite jusqu'à 8 ans. Elle disparaîtra complètement de la *medulla oblongata* (Kanaumi, 2008). Ces études ont montré que la forme majoritaire avant la naissance était celle des canaux Kv7.2 homomériques. Les sous-unités Kv7.2 et Kv7.3 sont exprimées de façon importante chez le nouveau-né et chez le nourrisson. Néanmoins, une étude sur des cerveaux adultes montre également une expression concomitante de Kv7.2 et Kv7.3 chez l'adulte dans le cortex et l'hippocampe (Cooper, 2000).

Chez le rat et la souris, l'expression des sous-unités Kv7.2 est importante au niveau de l'hippocampe, du thalamus et du mésencéphale tandis que l'expression est plus faible au niveau du cortex cérébral, de l'hypothalamus, des ganglions de la base, du pont et du cortex cérébelleux (Tinel, 1998 ; Cooper, 2001). Il existe également une expression des sous-unités Kv7.2 au niveau des ganglions sympathiques (Wang, 1998). L'expression de Kv7.2 n'est pas visible dans l'hippocampe chez la souris avant P8 et la quantité de protéine augmente progressivement entre P11 et P21 (Weber, 2006 ; Safiulina, 2008). Les sous-unités Kv7.3 sont exprimées dans le cortex, l'hippocampe, le thalamus, le cervelet et les ganglions sympathiques (Geiger, 2006; Wang, 1998). Les études d'expression de Kv7.3 donnent des résultats variables du fait de la présence de deux transcrits codant pour des protéines avec une partie amino-terminale différente et les expériences d'immunohistochimie qui ont été réalisées utilisent des anticorps ciblant la partie N-terminale (Figure 12 ; Geiger, 2006).

Au niveau des populations neuronales, l'expression des sous-unités Kv7.2 est mise en évidence dans de nombreux types de neurones. Elles sont exprimées dans les interneurones (neurones GABAergiques, neurones à parvalbumine et neurones

cholinergiques), dans les neurones dopaminergiques, dans les neurones pyramidaux et dans les cellules granulaires (Tinel, 1998 ; Cooper, 2001 ; Saganich, 2001 ; Shah, 2002 ; Rasmussen, 2007). Les canaux Kv7 seraient également présents dans les motoneurones inférieurs de la corne antérieure de la moelle épinière (Dedek, 2001).

Toutes ces études ont permis de montrer qu'il existe une expression différentielle de Kv7.2 et Kv7.3 chez l'homme et les modèles murins en fonction du développement. L'expression plus précoce de Kv7.2 pourrait expliquer la susceptibilité aux crises à la naissance (Safiulina, 2008 ; Kanaumi, 2008).

III.2. IMPLICATION DES GENES *KCNQ2* ET *KCNQ3* DANS LES EPILEPSIES

III.2.1. Les gènes *KCNQ2* et *KCNQ3*

Le gène *KCNQ2* (*potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily member 2*) a été découvert en 1998 par clonage positionnel (Biervert, 1998 ; Singh, 1998 ; Charlier, 1998). Il est localisé sur le chromosome 20q13.33 et code pour de nombreux transcrits dont la signification biologique n'a pas encore été totalement élucidée. Chez l'homme, il existe 5 transcrits majoritaires, chaque transcrit comporte les 7 premiers exons qui englobent toutes les régions membranaires du canal. Il existe un transcrit très court, codant pour une protéine de 393 acides aminés et 4 transcrits plus longs codant pour des protéines à partie C-terminale variable (Figure 12A). La forme courte est spécifique des neurones immatures et n'est pas fonctionnelle comme le montrent des expériences de transfection et de mesure du courant (Smith, 2001 ; Pan, 2001). Chez la souris et le rat, les transcrits de *Kcnq2* sont moins décrits.

Le gène *KCNQ3* (*potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily member 3*) est localisé sur le chromosome 8q24.22. Il code pour deux transcrits chez l'homme qui sont traduits en deux protéines de 872 et 752 acides aminés qui diffèrent entre elles par leur partie N-terminale (Figure 12B). Chez le rat, il existe également deux transcrits, contrairement à la souris où un seul transcrit est décrit jusqu'à présent (Rasmussen, 2007). Ces deux gènes sont impliqués dans des épilepsies néonatales : les épilepsies néonatales familiales bénignes et les EEP.

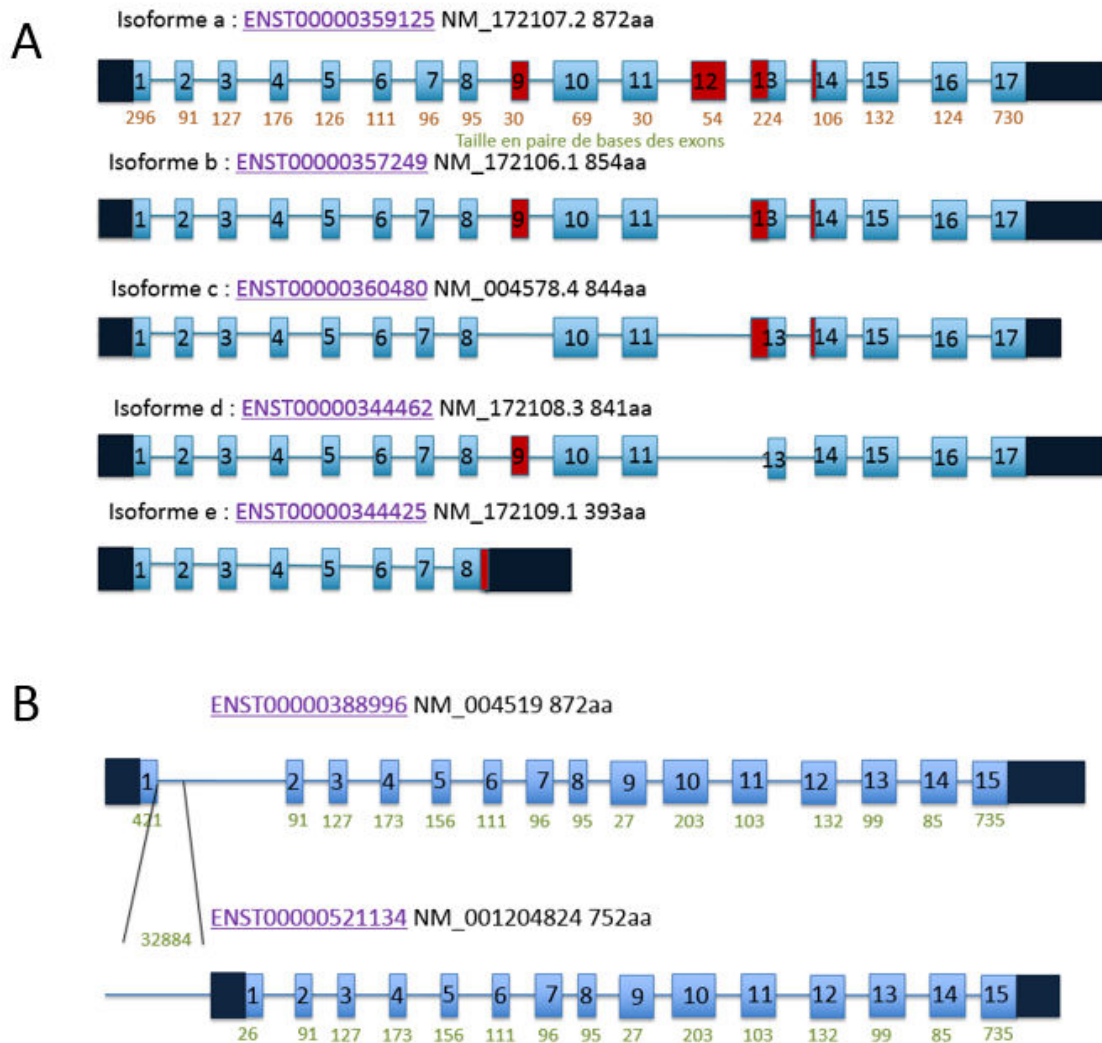


Figure 12 : Représentation schématique des transcrits des gènes *KCNQ2* (A) et *KCNQ3* (B)
Les parties alternatives sont notées *en rouge*.

III.2.2. Épilepsies néonatales familiales bénignes (BFNS)

Les mutations du gène *KCNQ2* ont d'abord été impliquées dans les épilepsies familiales bénignes du nourrisson (*Benign familial neonatal seizure*, BFNS). Les BFNS sont un type d'épilepsies rares et bénignes, avec une incidence de 1 pour 100 000 dans la population générale (Rogawski, 2000). Elles ont tout d'abord été décrites en 1964 par les médecins A. Rett et R. Teubel (Rett et Teubel, 1964 ; Plouin et Anderson, 2005). Les patients ont le plus souvent une histoire familiale d'épilepsie. Les BFNS sont des pathologies autosomiques dominantes avec une pénétrance de 85% (Bellini, 1993). Les crises débutent très tôt,

durant le premier mois de vie, et sont majoritairement de type tonique. Des crises cloniques ou myocloniques sont plus rarement observées (Soldovieri, 2011 ; Maljevic, 2008). Les crises sont souvent en série généralisées ou multifocales. Une rémission des crises a lieu rapidement, après quelques jours à quelques mois après leur début et les patients ont un développement neurologique normal. Il persiste toutefois une récurrence possible des crises plus tard dans la vie, qui concerne 15% des patients atteints de BFNS (Psenka et Holden, 1996 ; Singh, 1998).

Les mutations du gène *KCNQ2* dans les BFNS sont principalement des mutations faux-sens, mais d'autres mutations de type non-sens, décalage du cadre de lecture et duplication-délétion peuvent également être à l'origine de BFNS (Richards, 2004 ; Singh, 2003 ; Soldovieri, 2007). Tous ces variants sont principalement situés dans la partie responsable de la dépendance au voltage et dans la partie C-terminale de la protéine codée par le gène *KCNQ2*. Des mutations dans le gène *KCNQ2* ont également été décrites dans des myokimies qui sont des contractions involontaires de fibres musculaires (Dedek, 2001). Elles sont associées aux BFNS dans l'enfance mais les myokimies se déclarent plus tard dans la vie. La présence de Kv7 dans les axones des motoneurones (Dedek, 2001), pourrait expliquer l'effet pathogène de certaines mutations responsable de BFNS au niveau musculaire.

Quelques variants, décrits auparavant dans les BFNS, sont associés à d'autres symptômes cliniques plus sévères, tels qu'une déficience intellectuelle, une épilepsie résistante aux médicaments ou une épilepsie focale (Dedek, 2003 ; Borgatti, 2004 ; Schmitt, 2005 ; Steinlein, 2007). Ces variants ont été identifiés dans plusieurs familles et pourraient être responsable de BFNS « classique » et de BFNS accompagnée d'une déficience intellectuelle.

III.2.3. Encéphalopathies épileptiques précoces

L'implication de mutations du gène *KCNQ2* dans les EEP est une découverte récente (Weckhuysen, 2012 ; Saitsu, 2012 ; Milh, 2013). Ces mutations sont généralement *de novo* mais quelques cas de mosaïcisme parental sont décrits et peuvent parfois complexifier le diagnostic (Milh, 2015).

Les EEP liées au gène *KCNQ2* commencent de la même manière que les BFNS, les crises surviennent également dans la même période néonatale, au cours de la première semaine de vie et sont majoritairement de type tonique (Weckhuysen, 2012 ; Milh, 2013). Ces épilepsies sont résistantes aux traitements. L'EEG interictal montre un profil de suppression-burst chez de nombreux patients alors qu'il est normal dans les patients BFNS (Serino, 2013). Le bilan clinique de ces patients est assez similaire à celui d'un patient atteint du syndrome d'Ohtahara. En terme de pronostic clinique, les patients atteints d'EEP avec des mutations de *KCNQ2* ont un arrêt des crises après quelques mois à quelques années. De plus, pour l'un de ces patients atteint d'EEP et porteur de mutation dans le gène *KCNQ2*, des anomalies dans les ganglions de la base ont été mises en évidence post-mortem (Meurs-van der Schoor 2014).

Les mutations du gène *KCNQ2* impliquées dans les EEP se situent majoritairement dans le domaine du pore, S5-boucle P-S6, et dans la partie C-terminale (Figure 13). Pour les mutations responsables d'EEP, il y a toujours conservation de la partie à 6 domaines transmembranaires et jusqu'à présent aucune délétion du gène dans son ensemble n'a été décrite dans les EEP. On peut donc penser que des mutations entraînant une haploinsuffisance du gène, par délétion complète du gène ou mutation provoquant un arrêt précoce de la traduction, seraient uniquement responsables de BFNS (Jentsch, 2000 ; Lerche, 2005).

La présence de phénotypes plus sévères dans les BFNS (Dedek, 2003 ; Borgatti, 2004 ; Schmitt, 2005 ; Steinlein, 2007) suggère un continuum plutôt que l'existence de deux pathologies bien distinctes. Une majorité des patients appartient à l'un des deux groupes mais des patients atteints d'EEP peuvent présenter un profil clinique plus modéré. Ce continuum rend parfois difficile le pronostic clinique et l'étude fonctionnelle des mutations de *KCNQ2* est donc nécessaire pour comprendre la pathologie et les conséquences de ces mutations sur le fonctionnement des canaux Kv7.2-Kv7.3. Jusqu'à présent, on ne connaît aucune mutation identique qui soit responsable chez des patients différents d'une épilepsie de type BFNS et de type EEP.

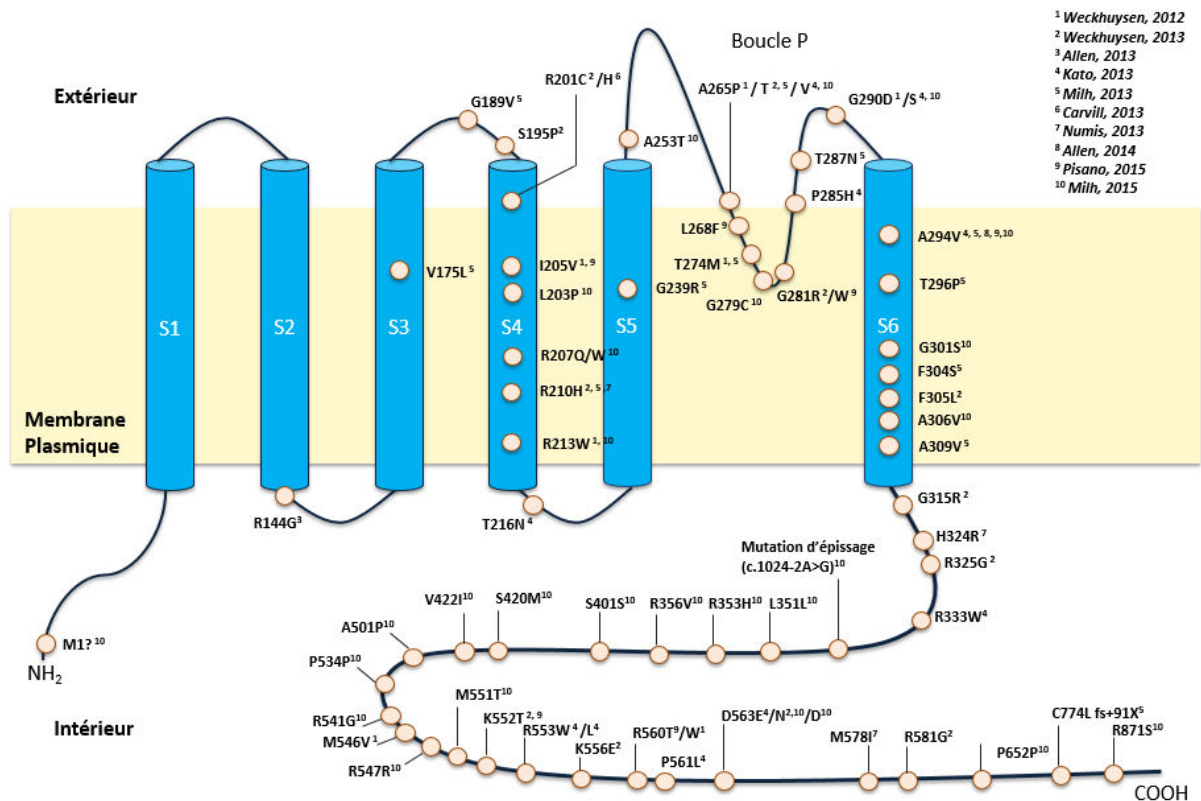


Figure 13 : Localisation des mutations de *KCNQ2* impliquées dans les EEP, décrites dans la littérature depuis 2012, sur une représentation schématique de la sous-unité Kv7.2

III.3. IMPACT DES MUTATIONS DANS LE GENE *KCNQ2*

III.3.1. Mécanismes physiopathologiques modifiant le courant M

Les mutations de *KCNQ2* et leurs conséquences sur le courant I_M sont étudiées depuis le début des années 2000. Les techniques d'étude utilisent la transfection de Kv7.2 dans des cellules en culture, telles que les oocytes de xénope (Orhan, 2014), les cellules ovariennes de hamster (CHO-K1) (Miceli, 2013), les cellules rénales de Cercopithecus Aethiops (COS7) (Su, 2011) et les cellules humaines rénales (HEK) (Volkers, 2009). Les cellules utilisées sont choisies parce qu'elles n'expriment que très peu de canaux ioniques endogènes pouvant influencer la mesure du courant I_M .

Ces modèles ont permis la détermination des propriétés intrinsèques du canal ionique telles que les propriétés de dépendance du voltage du canal, l'efficacité d'ouverture et de fermeture, les temps d'activation et d'inactivation. Les cellules transfectées sont étudiées

par technique de patch-clamp où le potentiel de repos est maintenu en dessous de celui d'ouverture du canal puis les cellules sont stimulées par des pas de potentiel croissant. Les propriétés intrinsèques des canaux sont ensuite analysées.

Défaut de densité de courant, défaut d'ouverture du canal

Les premières études sur les canaux Kv7.2 et Kv7.3 portaient sur des mutations impliquées dans les BFNS et ont montré une diminution de la densité de courant entre 20% et 25% en moyenne, valeur pouvant atteindre jusqu'à 50% dans les cas les plus extrêmes (Schroeder, 1998 ; Singh, 2003 ; Dedek, 2003). Une diminution de 20% pourrait donc être suffisante pour provoquer une épilepsie. Ces mutations sont situées dans le pore du canal ou la partie C-terminale et concernent plusieurs types de configuration avec ou sans la sous-unité Kv7.3. Des mutations entraînant un décalage du cadre de lecture sont décrites dans la littérature. Le canal formé par les sous-unités mutées génère un courant dont la densité est réduite. La première mutation BFNS décrite, p.Tyr562CysfsTer4, est un exemple de mutation entraînant un décalage du cadre de lecture, elle est localisée dans la partie C-terminale de la sous-unité Kv7.2 (Biervert, 1998) et entraîne une diminution de densité de courant de 50% en configuration Kv7.2-Kv7.2* (où Kv7.2* correspond à la sous-unité mutée). Le degré de diminution du courant pourrait être corrélé à la sévérité de la pathologie. En effet, un cas plus sévère est décrit dans les BFNS avec des myokimies. Ce patient présente une mutation p.R204T, qui aurait un effet dominant-négatif en réduisant la densité de courant de plus de 50% (Dedek, 2001).

Dans les EEP, des effets dominant-négatifs sont également mis en évidence, l'expression de la sous-unité mutée affectant les complexes Kv7.2-Kv7.3. Les mutations p.G290D et p.T274M entraînent dans les EEP des diminutions de densité de courant de l'ordre de 70-80% en configuration Kv7.2*-Kv7.2 et de l'ordre 60%-75% en configuration Kv7.2-Kv7.2*-Kv7.3 (Orhan, 2014). Cette diminution est donc plus importante pour les EEP et il y a un effet de la mutation sur la sous-unité sauvage.

Défaut dans la courbe d'activation du canal et la cinétique du canal

Les mutations entraînant un déplacement de la courbe de dépendance au voltage du canal Kv7.2 sont à l'origine d'un défaut d'activation du canal. Un décalage de la courbe d'activation ou de désactivation va entraîner un défaut dans la synchronisation des canaux Kv7 avec le potentiel d'action. Il en résultera une activité trop tardive du canal, ce qui est dû à une activation après le seuil du potentiel d'action, et/ou une désactivation plus rapide et donc une efficacité réduite du canal sur les trains de potentiels d'action. Ce retard va conduire à une hyperexcitabilité des réseaux neuronaux ce qui pourrait expliquer l'épilepsie. Les déplacements de la courbe d'activation sont observés par l'étude du courant et des phases d'activations-dépolarisations, ils varient en valeur absolue entre +10 mV et +30 mV (Soldovieri, 2007). Dans les BFNS, les mutations peuvent être localisées dans la partie C-terminale, comme pour la mutation p.K526N qui provoque un déplacement de la courbe d'activation de +12mV pour la configuration hétéromérique (Dedek, 2003 ; Singh, 2003 ; Borgatti, 2004). Il existe également des mutations localisées dans le segment S4, la mutation BFNS p.A196V entraîne un décalage de la courbe d'activation de +20 mV sans changer la polarité du domaine (Soldovieri, 2007). Un changement de polarité dans la protéine pourrait également être à l'origine d'un défaut de conformation et provoquer un décalage dans la courbe d'activation. Les mutations p.D212G (Miceli, 2009) localisée dans le segment S4 et p.S122L (Hunter, 2006) localisée dans le segment S2, sont responsables d'un tel changement et affectent la courbe d'activation en la décalant de +5 mV et +10 mV respectivement.

Des mutations dans les EEP sont également responsable de décalages de la courbe d'activation du courant (Orhan, 2014 ; Miceli, 2013). La comparaison entre la mutation p.R213W liée aux BFNS et la mutation p.R213Q liée aux EEP, suggère que l'effet de la mutation EEP est plus important (décalage de +16 mV pour une configuration hétéromérique avec les sous-unités Kv7.2 mutée et sauvage) que celui de la mutation BFNS (décalage de +9 mV) (Miceli, 2013). Dans ce cas, un acide aminé particulier entraîne des défauts spécifiques d'activation qui vont résulter en un spectre clinique différent. Des gains de fonction du courant I_M , avec un canal toujours actif ou s'activant très tôt, ont récemment été décrits dans les EEP (Miceli, 2015). Ils concernent les mutations p.R201C,

p.R201H localisées dans le segment S4 et p.R144Q localisée dans le segment S2. Les deux dernières mutations entraînent un décalage d'activation de -30 mV et -20 mV respectivement. La mutation p.R201C provoque une ouverture constante du canal (Miceli, 2015).

Les mutations provoquant un décalage dans la courbe d'activation du canal entraînent un défaut de cinétique, car ces deux mécanismes sont dépendants l'un de l'autre. Les canaux ne seront plus synchronisés avec le potentiel d'action et leur maximum d'ouverture aura lieu soit trop tard, soit trop tôt. Cette activité décalée aura des effets importants sur le mécanisme d'adaptation des pics de potentiel. Si la fermeture est affectée, elle peut être trop rapide et ne pas agir de manière assez efficace sur les potentiels d'action. Ces temps d'ouverture et de fermeture du canal potassique Kv7 sont primordiaux pour leur rôle sur la mAHP.

III.3.2. Défaut d'expression à la membrane plasmique et à l' AIS

Les mutations de Kv7.2 qui entraînent des défauts d'expression à la membrane plasmique provoquent une mauvaise conformation de la protéine ou une instabilité à certaines températures, qui peuvent conduire à une dégradation de la protéine. Un défaut d'expression à la membrane plasmique peut également être dû à un défaut de liaison à la calmoduline. Ainsi une étude de la mutation p.V710Sfs*219 de Kv7.2 chez un patient atteint de BFNS, a montré un défaut de stabilité qui provoque une diminution de la demi-vie de la protéine Kv7.2 et une dégradation accrue (Soldovieri, 2006). Il en résulte une diminution drastique de la densité de courant I_M (de l'ordre de 90%). Dans cette expérience, l'expression de la sous-unité Kv7.3 avec Kv7.2* permet le sauvetage partiel par stabilisation de la protéine. Une autre mutation chez un patient BFNS, p.N258S, située dans la boucle S5 de la protéine, entraîne les mêmes défauts et agit de façon dominant-négative sur les sous-unités sauvages (Maljevic, 2011). Une mutation BFNS, p.G848Afs*62 entraînant un décalage du cadre de lecture, provoque la création d'un signal de dégradation, RCXRG, conduisant à l'ubiquitination de celle-ci et une diminution de la

quantité de protéine (Su, 2011). Ces mutations vont donc être responsables d'un défaut d'expression à la membrane plasmique.

Des mutations BFNS peuvent provoquer un défaut d'expression de Kv7.2 dans l'axone distale et une localisation somato-dendritique augmentée, sans avoir d'effet sur la localisation normale à l'AIS. Ces mutations sont situées dans le segment S6 (p.Y284C, p.A306T) ou dans la partie C-terminale (p.K526N) de la sous-unité Kv7.2 (Chung, 2006).

III.3.3. Défauts d'interaction

De nombreux articles ont montré qu'un défaut de liaison à la calmoduline pouvait être à l'origine d'une rétention dans le RE (Soldovieri, 2006 ; Maljevic, 2011). Les deux mutations citées précédemment, p.V710Sfs*219 et p.N258S, diminuent l'interaction avec la calmoduline. Les mutations les plus couramment impliquées sont situées sur la partie C-terminale de liaison à la calmoduline (Richards, 2004 ; Soldovieri, 2006 ; Ambrosino, 2015). D'autres mutations BFNS peuvent également être à l'origine d'une diminution de courant par diminution de la liaison à la calmoduline (Chung, 2014 ; Ambrosino, 2015).

L'inhibition par la syntaxine 1A est un mécanisme qui peut également être affecté en présence de mutations dans le gène *KCNQ2*. Après interaction de la syntaxine 1A et des canaux Kv7.2, la densité de courant n'est que très peu réduite pour les mutations p.L351V, p.Y362C tandis que les mutations p.L351F et p.R553Q ont une résistance complète à l'effet de la syntaxine 1A (Soldovieri, 2014). Cette insensibilité des canaux pourrait être délétère sur leur rôle synaptique et provoquer une augmentation du relargage de neurotransmetteurs.

Ces deux derniers défauts décrits pour des mutations BFNS (Soldovieri, 2014 ; Ambrosino, 2015) élargissent les conséquences physiopathologiques des mutations sur *KCNQ2* et soulignent l'importance des études fonctionnelles pour chaque mutation, en particulier dans l'optique du développement d'approches pharmacologiques visant à corriger l'effet des mutations.

IV. Travail de thèse

Mon travail de thèse s'est focalisé sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine des EEP. Ce travail a ainsi consisté en l'élaboration de modèles afin de :

- 1- Confirmer la pathogénicité de nouvelles mutations découvertes par des techniques de séquençage haut-débit,
- 2- Etudier les bases physiopathologiques des EEP,
- 3- Proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

En ce qui concerne les travaux résultants des méthodes à haut débit, j'ai tout d'abord étudié une délétion chez un patient présentant un profil particulier d'EEP. Cette délétion couvre 19,6 kb et le projet s'est articulé autour d'un gène en particulier, le gène *WDR45*. J'ai étudié le profil clinique du patient qui présentait une autre pathologie neurologique, une neurodégénérescence avec dépôt de fer dans les ganglions de la base. Notre étude a permis d'élargir le spectre clinique de cette pathologie.

Au cours de ce travail de thèse, il est apparu que le gène *KCNQ2*, précédemment impliqué dans les BFNS, avait un rôle majeur dans les EEP. J'ai souhaité comprendre s'il existait une corrélation génotype-phénotype pour ces épilepsies. La deuxième partie de mon projet s'est donc focalisée sur l'identification et la caractérisation des mutations de *KCNQ2* chez les patients EEP de notre cohorte ainsi que sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent la sévérité variable de ces épilepsies liées au gène *KCNQ2*. J'ai étudié, dans un premier temps, le courant potassique I_M , et les conséquences de deux mutations sur les propriétés intrinsèques du canal, puis l'expression de la protéine Kv7.2 à la membrane plasmique et au segment initial de l'axone. Nous avons également, au cours de ces études, testé plusieurs molécules thérapeutiques à visée translationnelle.

La dernière partie de mon projet s'est orientée vers la création de modèles *in vitro* permettant l'identification de molécules à visée thérapeutique. D'une part, j'ai développé des lignées stables exprimant de façon constitutive *KCNQ2* et ses formes mutées qui permettront d'identifier des molécules normalisant les courants potassiques altérés. D'autre part, j'ai mis en place un modèle de neurones différenciés à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPS) issues de fibroblastes de patients, qui permettront de s'affranchir des biais rencontrés lors de l'utilisation des modèles transfectés.

MATERIELS ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. Biologie moléculaire

I.1. TECHNIQUE D'AMPLIFICATION EN CHAINE DE LA POLYMERASE (PCR)

I.1.1. PCR classique

Pour toutes les PCR, notamment pour la vérification des mutagenèses, l'enzyme polymérase Taq produite au sein du laboratoire est utilisée. La liste de toutes les amorces est disponible en Annexe 1. Le programme de PCR est adapté à la température d'hybridation de l'amorce utilisée. Les concentrations respectives de chaque réactif sont indiquées dans l'Annexe 2.

I.1.2. Réaction de séquençage

Elle s'effectue sur des produits de PCR ou directement sur ADN plasmidique préalablement purifiés. Le kit *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems)* est utilisé pour amplifier à nouveau les régions d'intérêt en présence des amorces choisies pour le séquençage (Annexe 1). Les réactions sont réalisées à partir de 300 ng d'ADN plasmidique purifié ou une concentration de 300 ng d'ADNc. Les concentrations respectives de chaque réactif sont indiquées en annexe 2. Le programme du thermocycleur utilisé (Veriti 96 Well Thermal Cycler, *Applied Biosystems*) est le suivant : dénaturation initiale à 96°C pendant 5 minutes, puis 25 cycles de dénaturation (96°C pendant 10 secondes) - hybridation (50°C pendant 5 secondes) – élongation (60°C pendant 4 minutes). Les fragments ainsi amplifiés sont ensuite déposés dans un séquenceur ADN qui utilise la technologie d'électrophorèse capillaire pour séparer les fragments d'ADN (*ABI3130XL Genetic Analyser, Applied Biosystems*).

I.2. EXTRACTION D'ARN PUIS TRANSCRIPTION INVERSE A PARTIR DE PROGENITEURS EN CULTURE

Extraction d'ARN

L'ARN des cellules est extrait à l'aide d'un kit commercial utilisant les différences d'adsorption des acides nucléiques sur une membrane de silice placée dans une colonne qui permettra la séparation par centrifugation. (*Perfect Pure RNA cell and tissue kit, 5'PRIME*). Pour se faire, les cellules sont resuspendues dans un tampon de lyse contenant du TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine), inhibiteur de RNase. Le volume de tampon ajouté est fonction du nombre de cellules à traiter afin qu'elles ne saturent pas la membrane de silice. Les cellules lysées sont déposées dans la colonne qui va retenir les ARN par affinité. Les étapes suivantes consistent ensuite en un traitement à la DNase, puis en lavages et en centrifugations successifs de la membrane puis la récupération des ARN s'effectue par passage d'une solution d'élution qui permet de détacher les ARN de la membrane.

Contrôle de la qualité et de la quantité des ARNs extraits

Afin de vérifier la qualité de l'ARN après extraction, l'échantillon est déposé sur gel d'agarose 0,8% contenant du Bromure d'Ethidium à une concentration de 1 µg/mL pour effectuer une électrophorèse (100V, 30 minutes) suivie d'une visualisation sous lumière UV. Les deux bandes d'ARN ribosomiaux (18S à 1,9 kb et 28S à 5 kb) doivent être présentes sans « smear » pouvant révéler une dégradation majeure. Pour la quantification, tous les ARN extraits sont dosés au Nanodrop (*Thermo Scientific*) qui mesure l'absorbance de l'échantillon à 260 nm pour vérifier la concentration et les rapports de densité optique 260/280 (pour observer la contamination par les protéines) et 260/230 (pour observer la contamination par les solvants).

Transcription inverse des ARN extraits en ADN complémentaire (ADNc)

1 µg d'ARN est dilué dans 10 µl d'eau purifiée, avec 1 µl d'amorces aléatoire N6 à une concentration de 250 ng/µl et 1 µl de dNTP à 10 mM puis incubé 5 minutes à 65°C pour dénaturer les ARN. Par la suite 4 µl de *buffer FS super script II* à 5X (*Invitrogen*), 2 µl de DTT

(dithiothréitol) à 0,1 M (*Invitrogen*) et 1 µl de RNase out à 40 U/µl (*Invitrogen*) sont ajoutés puis 1 µl de reverse transcriptase Super Script II à 200 U/µl (*Invitrogen*). Le programme suivant est utilisé : 10 minutes à 20°C, 50 minutes à 42°C, 15 minutes à 75°C. Les ADNc obtenus sont enfin testés par PCR classique pour vérifier leur intégrité.

I.3. PCR QUANTITATIVE OU EN TEMPS REEL

La PCR quantitative (qPCR) en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (« en temps réel ») le processus de PCR à l'aide d'une émission de fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant.

Elle peut s'effectuer soit sur de l'ADN génomique afin de déterminer le nombre copie d'un fragment d'intérêt, soit sur de l'ADN complémentaire pour doser l'expression d'un gène.

La méthode de calcul utilisée est celle des $\Delta\Delta C_t$ qui est une quantification relative normalisée par un gène référence ou calibrateur : ADORA2B-2 pour la qPCR génomique et GAPDH pour la qPCR d'expression. La qPCR est effectuée en triplicat sur un LightCycler 480 (*Roche*), thermocycleur couplé à un système optique (pour l'excitation et la détection de fluorophores : la *sybrgreen*) contenu dans le kit *Faststart Universal Reaction Mix* (*Roche*).

L'amplification est réalisée en utilisant 2 µl d'ADNc (dilution 1 :10) ou ADNg (5 ng/µl) avec 0,2 mM de chaque amorces spécifiques dans un volume final de 20 µl. Le programme inclut une dénaturation initiale de 5 mn à 95°C suivi par 43 cycles de 20 sec à 95°C, 45 sec à 60°C et 30 sec à 72°C. La liste des amorces utilisées en qPCR est consignée en annexe 1

I.4. MUTAGENESE ET PREPARATION DES PLASMIDES

I.4.1. Mutagenèse de plasmides

I.4.1.1. Plasmide *KCNQ2* -*KCNQ3*

Pour les expériences d'étude d'expression de *KCNQ2*, des plasmides ont été utilisés (Tableau 4). Les plasmides pcDNA3-*KCNQ2* (humain et étiqueté V5) et pcDNA-*KCNQ3* ont

été fournis par les Docteurs Pierre Delmas et Jérôme Devaux. Ceux-ci correspondent à l'isoforme NM_172108 pour *KCNQ2*, codant pour une protéine Kv7.2 de 841 acides aminés, et l'isoforme NM_004519.3 pour *KCNQ3* codant pour une protéine Kv7.3 de 872 acides aminés. La partie carboxy terminale de Kv7.2 est donc plus courte que les autres isoformes (Figure 12) tandis que la partie amino-terminale de Kv7.3 est plus longue que pour l'autre isoforme de Kv7.3. Ces isoformes sont fonctionnelles et permettent l'étude du courant potassique. Le gène *KCNQ3* est cloné dans le plasmide pCMV-hygro afin d'avoir un plasmide permettant de conférer aux cellules l'exprimant, la résistance à l'hygromycine. Ces plasmides permettent une expression importante et rapide de *KCNQ2* et de *KCNQ3* grâce au promoteur CMV.

Liste des plasmides
pcDNA3-KCNQ2
pcDNA3-KCNQ3
pcDNA3-KCNQ3 -tag HA
pcDNA3-KCNQ2 -tag V5
pcDNA3-KCNQ2 ^{V175L}
pcDNA3-KCNQ2 ^{L203P}
pcDNA3- KCNQ2 ^{G239R}
pcDNA3-KCNQ2 ^{T274M}
pcDNA3-KCNQ2 ^{T287N}
pcDNA3-KCNQ2 ^{A294V}
pcDNA3-KCNQ2 ^{A294G}
pcDNA3- KCNQ2 ^{C774Lf6*91x}
pCMVhygro-KCNQ3
pEGFP-C1

Tableau 4 Liste des plasmides utilisés au cours de cette thèse

I.4.1.2. Protocole de mutagenèse

Pour la mutagenèse, le kit *Quickchange mutagenesis II (Agilent)* est utilisé. Les amorces chevauchant la mutation et d'une longueur d'environ trente paires de bases sont générées à l'aide du logiciel Agilent « *Primer Design Program* ». Le principe de la mutagenèse est le suivant (Figure 14) :

- 1- Les plasmides sont amplifiés par PCR en utilisant les amorces contenant la mutation ainsi que les réactifs du kit selon le protocole suivant :

50 µl Volume final

5 µl de Buffer 10X

1 µl de dNTP mix

2,5 µl d'amorce sens à 50 ng/µl

2,5 µl d'amorce anti-sens à 50 ng/µl

1 µl Polymérase PfuUltraHF à 2,5 U/µl

2 µl d'ADN plasmidique à 10 ng/µl

36 µl d'H₂O purifiée**Cycles de PCR**

95°C 30 secondes

95°C 30 secondes

55°C 1 minutes

68°C 7 secondes

18 cycles

2- L'ADN parental est digéré en ajoutant 1 µl de l'enzyme DpnI à 10 U/µl à chaque tube. Puis, la réaction est incubée à 37°C pendant 1 heure dans un thermocycleur. Cet enzyme coupe les brins contenant la séquence GATC méthylée sur l'adénine et dégrade donc le plasmide parental extrait de bactéries dam+.

3- Puis, un volume de 1 µl de chaque réaction est ajouté à un volume de 50 µl de bactéries *XL1-Blue Competent Cells (Agilent)*. La réaction est incubée dans la glace 30 minutes. Un choc thermique permettant la transformation bactérienne est réalisé à 42°C pendant 45 secondes, les tubes contenant les cellules sont incubés sur glace 2 minutes. Puis, 500 µl de SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) préchauffé à 42°C est ajouté aux cellules et les tubes sont incubés 1 heure à 37°C sous agitation à 225-250rpm. Un volume de 100 µl de bactéries est ensuite étalé sur boîte de LB- agar (*Luria Broth*) + Ampicilline (50 µg/ml) et incubées à 37°C pendant 16 heures.

Les amorces de mutagenèse utilisées sont listées en Annexe 1. Les plasmides étiquetés V5 ont été réalisés quant à eux, en collaboration avec le Centre de Recherche en Neurobiologie et Neurophysiologie (CRN2M) de Marseille.

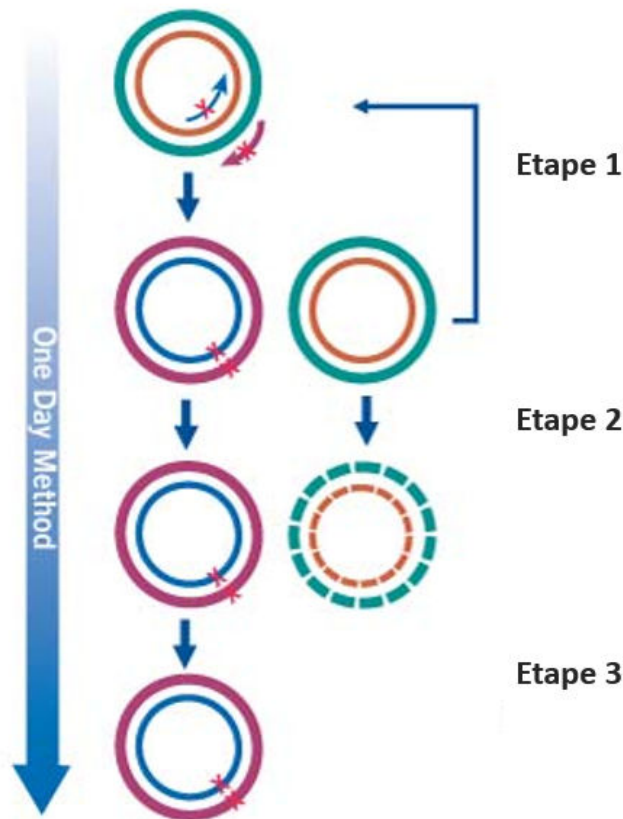


Figure 14 : Principales étapes de la mutagenèse dirigée avec digestion du brin parental. L'étape 1 correspond à l'amplification de l'ADN parentale ainsi que celle de l'ADN synthétisé après le premier cycle de PCR. L'étape 2 correspond à la digestion de l'ADN parental par l'enzyme DpnI. L'étape 3 correspond à une représentation des plasmides produits qui vont être ensuite transformés dans les bactéries. (D'après QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies - *Instruction Manual 2010*)

I.5. AMPLIFICATION DES PLASMIDES

I.5.1. Transformation bactérienne

Pour l'amplification des plasmides en dehors de l'utilisation du kit Quickchange mutagenesis II (Agilent), les bactéries *Escherichia Coli* thermocompétentes TOP10 (produites au sein du laboratoire) sont utilisées. Les bactéries sont transformées par choc thermique selon la technique suivante :

Les bactéries sont mises en présence d'1 µl de plasmide à 10 ng/µl puis incubées 30 minutes à 4°C. Un choc thermique est réalisé à 42°C pendant 45 secondes, puis 5 minutes à 4°C. Les bactéries sont incubées 1 heure à 37°C sous agitation en présence de 500 µl de S.O.C. pour

permettre la reconstitution de leur membrane. Les bactéries sont étalées sur milieu LB Agar (*Lysogeny Broth*) + Ampicilline (50 µg/ml) et incubées à 37°C pendant 16 heures.

I.5.2. Culture bactérienne

Afin de sélectionner les colonies contenant le plasmide d'intérêt, l'ADN plasmidique est analysé par PCR classique. Les colonies positives sont alors mises en cultures pour l'amplification du plasmide. Chaque colonie est piquée avec un cône de pipette qui est ensuite trempé dans 500 µl de milieu LB + Ampicilline 50 µg/ml (pour préculture) puis trempé dans 10 ml d'H₂O (pour PCR). Les PCR sont réalisées après lyse bactérienne de la solution aqueuse (5 minutes à 95°C), 5 µl de cette préparation sont utilisés pour une PCR classique. La préculture des colonies bactériennes est réalisée pendant 6 heures à 37°C sous agitation.

Les colonies possédant le plasmide d'intérêt sont cultivées dans 100 mL de milieu LB + Ampicilline (50 µg/ml) sur la nuit à 37°C.

I.5.3. Purification de l'ADN plasmidique

Les cultures des colonies sélectionnées précédemment sont centrifugées à 6000g pendant 15 minutes à 15°C. L'ADN plasmidique est alors extrait à partir de ces culots par lyse alcaline :

- soit grâce au kit NucleoSpin® Plasmid (*Macherey Nagel*) lorsque ces plasmides devaient être utilisés pour séquençage Sanger.
- soit grâce au kit NucleoBond® Xtra Midi EF / Maxi EF (*Macherey Nagel*) lorsque les plasmides doivent être utilisés pour transférer des cellules en culture. En effet, l'utilisation de ce kit permet l'élimination des endotoxines bactériennes qui peuvent entraîner une mortalité des cellules eucaryotes.

II. Biologie cellulaire

II.1. CULTURE CELLULAIRE

II.1.1. Culture de neurones primaires de rats

Les neurones primaires sont préparés en collaboration avec le centre de recherche en neurobiologie et neurophysiologie (CRN2M) de Marseille suivant le protocole de Liu et al. (2014). Brièvement, les neurones sont obtenus par dissociation mécanique d'hippocampes d'embryons de rat à E18.5 en utilisant des pipettes en verre. Après 7 jours de culture *in vitro* (DIV), les neurones sont transfectés par les plasmides d'intérêt en utilisant la lipofectamine 2000 (*Life technologies*). Deux jours après transfection, les neurones sont fixés par une solution de 2% paraformaldéhyde-PBS et utilisés pour les marquages d'immunocytochimie.

II.1.2. Cellules Chinese Hamster Ovary (CHO)

Les cellules CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary, #CCL-61, *LGC-standards*) ont été utilisées pour les expériences d'électrophysiologie et d'immunoblot. Ces cellules adhérentes ont été cultivées en milieu Ham's F12 (*Ham's F12 Nutrient Mixture de Gibco*) contenant 10% de sérum de veau fœtal (*Gibco, Life technologies*), 2 mM de glutamine (*Gibco, Life technologies*) et Pénicilline-streptomycine 1X (*Gibco, Life technologies*). Elles ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

II.1.2.1. Expériences d'immunoblot

Après trypsinisation, les cellules CHO-K1 sontensemencées (3×10^6 cellules/boîte de culture 10 cm \varnothing) et incubées 24 heures avant d'être transfectées grâce au kit jetPEI[®]DNA transfection (*Polyplus*) selon le protocole fourni par la compagnie. Brièvement, 40 μ l de jetPEI et 15 μ g de plasmide total (5 μ g de plasmide contrôle exprimant l'EGFP ou « *enhanced green fluorescent protein* » et 10 μ g de pcDNA3-KCNQ2 et/ou KCNQ3) sont dilués séparément dans une solution de NaCl 150 mM avant d'être incubés ensemble pour 20min

afin de permettre la formation des complexes JetPEI-ADN. Le mélange est ajouté dans chaque boîte de culture et les cellules sont incubées 48 heures avant d'être utilisées pour les expériences d'immunoblot.

II.1.2.2. Expériences d'électrophysiologie

La transfection des cellules CHO-K1 ci-dessous a été réalisée dans le laboratoire de l'équipe de Laurent Aniksztejn à l'Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED).

Les cellules CHO-K1 sont transfectées par électroporation grâce au système Néon (*Life technologies*). Après trypsinisation, les cellules sont comptées sur un compteur de cellules (*Scepter™ 2.0 Cell Counter - EMD Millipore*), et 2×10^5 sont prélevées et rincées une fois dans du PBS. Après centrifugation (5 minutes à 400g), les cellules sont resuspendues dans 10 μ l de tampon « electro R » et électroporées en utilisant les paramètres suivants : 1400V, 1 pulse, 20 millisecondes.

Les cellules sontensemencées dans 500 μ l de milieu F12 sans antibiotique sur des lamelles préalablement recouvertes d'une matrice de polyéthylèneimine. Les lamelles sont incubées 48 heures avant d'être utilisées pour les expériences d'électrophysiologie.

II.1.2.3. Création de lignées stables exprimant Kv7.2 et Kv7.3

Dans un premier temps, la résistance à chaque antibiotique des cellules CHO-K1 non transfectées a été testée. Pour ce faire, les cellules CHO-K1 ont étéensemencées en concentration décroissante dans des plaques 96 puits (Figure 15) et des dilutions sériées de chaque antibiotique ont été testées afin de déterminer les concentrations optimales d'antibiotique (0,8 mg/ml pour la G418 (Néomycine) et 0,3 mg/ml pour l'hygromycine).

Après trypsinisation, les cellules CHO-K1 sontensemencées dans des plaques 6 puits à une concentration de 8×10^4 cellules/puits. Vingt-quatre heures après ensemencement, les cellules sont transfectées avec les plasmides pcDNA-KCNQ2 et/ou pCMV-KCNQ3, contenant respectivement une cassette de résistance à la néomycine ou à l'hygromycine (Figure 16). Comme précédemment mentionné, les plasmides (3 μ g) sont dilués dans une solution de

NaCl 250mM et sont co-incubés avec 4 µl de jetPEI pendant 20 minutes avant d'être ajouté dans chaque puits. Après 48 heures de transfection, le milieu des cellules est remplacé par un milieu contenant soit 0,8 mg/ml de Néomycine soit 0,4 mg/ml d'hygromycine ou les deux antibiotiques à la fois.

Les cellules sont ensuite cultivées durant 4 jours avant d'être réensemencées sur plaque 96 puits (50 µl/puits) en utilisant la méthode de dilution limite. Les puits ne contenant qu'une cellule sont sélectionnés et amplifiés. Une fois la confluence atteinte en boîte de 25 cm², les clones ont été congelés (1-3x10⁶ cellules par ml de Synth-a-Freeze, Life technologies) et maintenus à -80°C jusqu'à leur caractérisation. Les clones qui ont survécu après les nombreux passages sur plaque 96 puits, doivent avoir intégré l'ADNc de *KCNQ2* et de *KCNQ3*, ce que l'on vérifie en utilisant la PCR classique sur l'ADN génomique des cellules CHO et l'immunoblot.

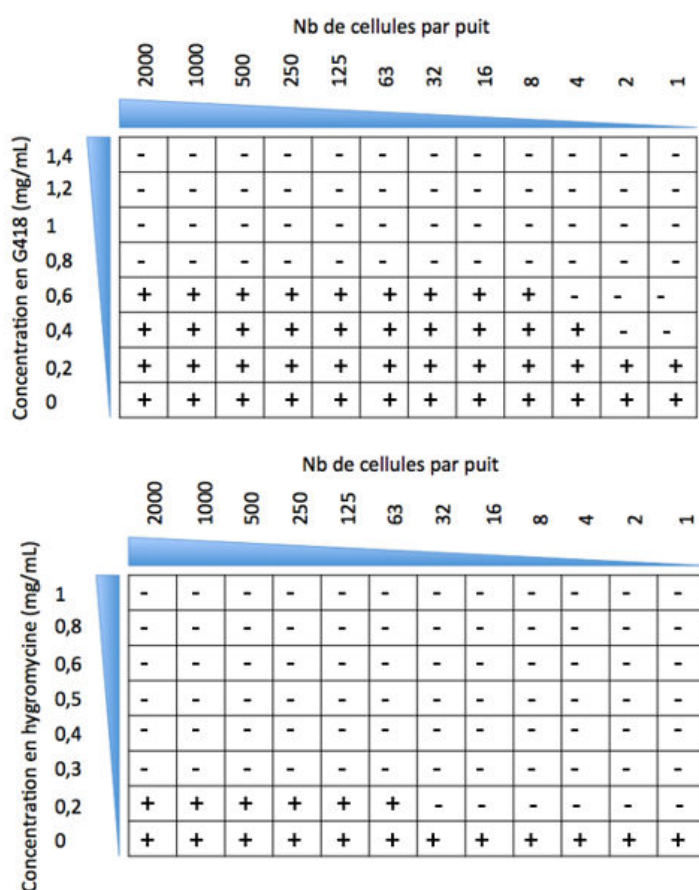


Figure 15 : Etude de la concentration minimale des antibiotiques Néomycine (G418) et Hygromycine entraînant une mortalité rapide des cellules CHO

L'image est une représentation de la plaque 96 puits obtenus après 3 jours en culture. Le signe négatif indique une mortalité rapide des cellules (inférieure à 3 jours).

3µg pKCNQ2 (G418)	3µg pKCNQ2 T287N (G418)	3µg pKCNQ2 T274M (G418)
3µg pKCNQ2 + pKCNQ3 (G418/hygromycine)	3µg pKCNQ2 T287N + pKCNQ3 (G418/hygromycine)	3µg pKCNQ2 T274M + pKCNQ3 (G418/hygromycine)
Non transfecté (G418)	Non transfecté (hygromycine)	Non transfecté (G418/hygromycine)
pKCNQ3 (hygromycine)	Non transfecté	Non transfecté

Figure 16 : Représentation schématique des transfections réalisées pour la sélection des lignées stables en plaque 6 puits. Les abréviations sont les suivantes : pKCNQ2 (pcDNA3-KCNQ2) et pKCNQ3 (pCMV-KCNQ3 hygro).

II.2. DIFFERENCIATION DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES (iPS)

Reprogrammation des fibroblastes issus de patients en cellules iPS

Notre unité de Génétique Médicale et Génomique Fonctionnelle est équipé d'une plateforme spécialisée dans la reprogrammation de cellules souches pluripotentes induites (iPS). Brièvement, la reprogrammation des fibroblastes de patients en cellules iPS a été réalisée par quatre grandes étapes :

- Amplification des fibroblastes issus du patient
- Reprogrammation après infection par le virus de Sendai (*Cytotune*)
- Stabilisation et sauvegarde des clones apparus
- Caractérisation des clones

Différenciation des IPS en progéniteurs neuronaux

Le milieu de différenciation utilisé au cours de ces expériences est le milieu Neurobasal A 1X (*Life technologies*) 500 ml de ce milieu est complété par 5 ml de supplément B27 à 50X (*Life Technologies*), 5 ml de Insulin Transferrin Selenum A à 100X (*Life Technologies*), 5 ml de N-2 supplement à 100X (*Life Technologies*) et 5 ml de Glutamax à 100X (*Life Technologies*).

Ce milieu est nommé N-. Pour la différenciation, des facteurs de croissance sont ajoutés, le FGF à une concentration de 10 µg/ml et l'EGF à une concentration de 100 µg/ml (*Peprotech*), le milieu est alors appelé N+.

D'une boîte contenant des cellules iPS en culture sont prélevées 10 colonies à l'aide d'une pipette. Celles-ci sont déposées dans une boîte B3 (préalablement traités avec du matrigel, *Life technologies*) contenant 2 ml de milieu N+ et 2% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Les boîtes contenant les cellules sont remises dans l'incubateur à 37°C sous 5% de CO₂. Le milieu des cellules iPS en voie de différenciation est remplacé tous les jours, ce qui permet de conserver l'intégrité des facteurs de croissance.

Traitement pour produire la matrice des boîtes de différenciation :

Pour le premier traitement, les boîtes sont d'abord recouvertes d'une matrice avec de la Poly-D lysine (*Sigma Aldrich*) à 10 µg/ml dans du PBS 1X, 1 heure à 37°C. Elles sont ensuite lavées 3 fois avec 2 ml de PBS 1X (*Life technologies*). Le 2ème traitement s'effectue avec de la fibronectine (*Sigma Aldrich*) à 10 µg/ml dans du PBS 1X, 30 minutes à 37°C. La fibronectine est remplacée par 5 ml de PBS 1X.

Passage des cellules en cours de différenciation

Deux enzymes peuvent être utilisées pour le passage des progéniteurs neuronaux : la dispase (*Sigma Aldrich*) et l'acutase (*ThermoFisher*). Le protocole est le même pour ces deux enzymes. Lorsque les cellules arrivent à confluence, le milieu est aspiré et les cellules sont détachées avec 1 ml d'enzyme pendant 5 minutes à 37°C. L'enzyme est inactivée avec 5 ml de milieu N-. Les cellules sont transvasées dans un tube qui est centrifugé 5 minutes à 1000 tours / minutes. Un second lavage est réalisé, uniquement pour la dispase, avec 5 ml de milieu N-. Les culots cellulaires sont remis en solution dans 4 ml de milieu N+ et transvasés dans une boîte préalablement recouverte de poly-D-lysine et de fibronectine. Les boîtes contenant les cellules sont remises dans l'incubateur à 37°C sous 5% de CO₂

II.1. IMMUNOHISTOCHIMIE

II.1.1. Sur neurones en culture

Les marquages utilisant la technique d'immunocytochimie ont été réalisés au CRN2M par Jérôme Devaux. L'anticorps anti-ankyrine G permet de visualiser la localisation du segment initial de l'axone.

II.1.2. Sur les cellules souches pluripotentes induites

Pour cette technique, les cellules progénitrices sont ensemencées à une densité de 25 000 cellules /puits sur des lames de verre contenant 4 puits (*Labtech*) préalablement recouverte d'une matrice de Poly-D lysine et de Fibronectine. Les cellules sont laissées une nuit dans l'incubateur sous 5% de CO₂ et à 37°C. Le lendemain, les cellules sont lavées avec 500 µl de PBS 1X (Gibco, Life technologies). Elles sont incubées 20 minutes dans 500 µl de solution de PBS contenant 4% paraformaldéhyde sous hotte. Les cellules sont lavées à nouveau avec 500 µl de PBS 1X. Une perméabilisation est réalisée pendant 20 minutes dans une solution de PBS 1X contenant 0.1% de Triton sous agitation. Puis les cellules sont incubées durant 30 minutes avec une solution de blocage contenant 0,5% d'albumine de sérum bovin et 0,1% de Triton dans du PBS 1X sous agitation. Les cellules sont lavées 3 fois au PBS 1X puis elles sont incubées avec l'anticorps primaire (concentration en Annexe 4) pendant une nuit à 4°C sous agitation avec une solution de blocage contenant 0,5% de BSA et 0,1% de Triton dans du PBS 1X sous agitation. L'anticorps secondaire (concentration en Annexe 4) est incubé pendant 2 heures à température ambiante avec une solution de blocage contenant 0,5% de BSA et 0,1% de Triton dans du PBS 1X sous agitation à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées trois fois au PBS 1X contenant 0.1% de Triton sous agitation pendant 5, 10 puis 15 minutes. Les noyaux des cellules sont mis en évidence en utilisant un marquage avec une solution de 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) à 1 mg/mL à une dilution au 1 :2000 dans une solution de PBS 1X pendant 10 minutes à température ambiante sous agitation et à l'obscurité. Les cellules sont lavées trois fois au PBS 1X pendant 5, 10 et 15 minutes. Les lames sont montées avec 20 µl d'immunomount (Shandon, *ThermoScientific*) par lamelles et elles sont laissées à température ambiante jusqu'à polymérisation (environ 2 heures). Les images sont acquises

sur un microscope Zeiss équipé avec le système Apotome (Zeiss) puis elles sont assemblées avec le logiciel ImageJ.

III. Biochimie

III.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS

La liste des anticorps utilisés pour les immunoblots est disponible en Annexe 3.

Extraction de protéines totales

Après transfection, les cellules CHO sont lavées avec du PBS 1X à 4°C, deux fois sous agitation. Les cellules sont lysées pendant 30 minutes à 4°C sous agitation avec 200 µl de tampon de lyse (pour une boîte de 75 cm²) contenant : 1% Triton-X100 (*Sigma Aldrich*), 140 mM NaCl (*Sigma Aldrich*), 20 mM Tris HCl (*Sigma Aldrich*), 2 mM EDTA pH 7.4 (*ThermoFisher*) et des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (*ThermoFisher*). Ce tampon permet une extraction des protéines membranaires et cytoplasmiques. Les lysats sont récoltés à l'aide d'un grattoir puis centrifugés à 13 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est récupéré dans un nouveau tube de 1.5 mL tandis que le culot contenant les noyaux est éliminé.

Les protéines sont ensuite dosées par colorimétrie utilisant une solution de BCA à une concentration de 50 :1 d'acide bicinchoninic et d'acide de cuivre II (*Thermofisher*). Chaque réaction de dosage contient 200 µL de BCA et 1 µL d'échantillon ou de la gamme étalon (l'albumine de sérum bovin ou BSA à 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL). Après 30 minutes d'incubation à 37°C, l'absorbance à 562nm est mesurée grâce à un luminomètre (*GloMax[®] 96 Microplate Luminometer*) et la concentration est calculée en utilisant la loi de Beer Lambert ($A = k \times c$ où c est la concentration de l'échantillon et k la constante dépendant de la longueur d'onde et de l'absorbance du récipient). Les protéines extraites sont stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

Précipitation de protéines membranaires par la technique de biotine-streptavidine

Le kit Sulfo-NHS-LC-biotin (*ThermoFisher*) a été utilisé pour le marquage à la biotine et la précipitation des protéines de surface. Cette biotine a la particularité de ne pas passer la membrane plasmique et permet donc de marquer les protéines membranaires. Afin d'éviter la perte des protéines biotinylées, toutes les manipulations sont faites sur glace et tous les lavages utilisent du PBS 1X pH=8. Quarante-huit heures après transfection, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS avant d'être incubées avec 1 mL de biotine à 1 mg/mL ou 1 mL de PBS (contrôle négatif) pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS. Afin d'éliminer la biotine résiduelle, les cellules sont incubées avec 1 mL de glycine 100 mM (*Sigma Aldrich*) pendant 10 minutes avant d'être lavées 2 fois au PBS. Les protéines sont enfin extraites et dosées suivant le protocole expliqué plus haut (partie III.2).

La précipitation des protéines membranaires est effectuée grâce aux billes de streptavidin-agarose (*Millipore*) préalablement rincées dans du tampon de lyse (2 rinçages dans 1 mL de tampon de lyse suivi par une centrifugation de 5 minutes à 13 000g à 4°C). Les billes de streptavidine-agarose (40 µL) sont incubées avec 50 µg d'échantillons protéique sous agitation constante toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les billes complexées aux protéines biotinylées sont récupérées par centrifugation 5 minutes à 13 000g avant d'être lavées 2 fois avec du tampon de lyse et centrifugé à chaque fois 5 minutes à 13 000g. Après la dernière centrifugation, les billes sont resuspendues dans 15 µL de tampon de dénaturation Laemmli 4X (la composition est en Annexe 4), dénaturées à 95°C pendant 2 minutes et utilisées en immunoblot (partie III.2.).

Dénaturation des échantillons

Pour tous les échantillons (totaux ou biotinylés), un volume de 15 µL de tampon de dénaturation Laemmli de concentration 4X contenant 10% de béta-mercaptoéthanol (la composition est en Annexe 4) est ajouté à l'échantillon. Une dénaturation est réalisée à 95°C pendant 2 minutes dans un bain sec. Les échantillons contenant les billes sont centrifugés 5 minutes à 13000g tandis que les échantillons de protéines totales sont conservés sur glace. Le surnageant est déposé dans des puits d'un gel d'acrylamide.

III.2. TECHNIQUES D'IMMUNOBLOTS

Pour les expériences d'immunoblots, 50 µg de protéines resuspendues dans du Laemmli 4X contenant 10% de béta-mercaptoéthanol sont dénaturées (95°C pendant 2-5 minutes) avant d'être déposées sur gel d'acrylamide à 7,5 % (Annexe 4). Après migration (15 minutes à 75 V puis 1h15 à 110V dans du tampon Laemmli 1X), les protéines sont transférées en milieu humide (tampon de transfert 1X, Annexe 4) sur une membrane de nitrocellulose (porosité 45 µm, *GE Healthcare*) pendant 1h30 à 250 mA.

La membrane est brièvement rincée avant d'être incubée dans une solution de blocage (5% de lait-TBS Tris Buffer Saline). Cette incubation permet de saturer la membrane en protéine pour éviter à l'anticorps primaire de se lier de manière non spécifique à celle-ci. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire (Annexe 3) dilué dans le tampon de blocage pendant toute la nuit à 4°C. Le lendemain, la membrane est lavée trois fois pendant 5 minutes dans une solution de TBS 1X contenant 0,05% de Tween (*Sigma Aldrich*) ou TBST. Elle est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à l'enzyme HRP ou *Horseradish peroxidase* dilué dans une solution de TBS 1X pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Les membranes sont lavées à nouveau trois fois pendant 5 minutes dans du TBST. La protéine d'intérêt est révélée par chimioluminescence (*Luminata Forte, Millipore*) et visualisées grâce un appareil *ChemiDoc XRS System (Biorad)*.

IV. Electrophysiologie

IV.1. ENREGISTREMENT DE CELLULES CHO PAR LA TECHNIQUE DE PATCH CLAMP EN CONFIGURATION CELLULE ENTIERE

Les expériences suivantes ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de Laurent Aniksztejn à l'Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED). Les enregistrements de cellules ont été réalisés en utilisant la technique de *patch-clamp* en configuration cellule-entière. Les cellules sont transfectées par la technique d'électroporation Néon (*Life technologies*). Après 48h post-transfection, les lamelles où les cellules ont étéensemencées sont déposées dans une solution de KRBH, *Krebs Ringer Bicarbonate solution* contenant 135 mM de NaCl, 3.5 mM de KCl, 5 mM de NaHCO₃, 0.5 mM de NaH₂PO₄, 1 mM de MgCl₂, 1.5 mM de CaCl₂, 10 mM de tampon HEPES et 10 mM de glucose à pH=7,3. La perfusion est réalisée à 1-2 mL/minutes avec cette solution.

Les expériences d'enregistrement en configuration cellule-entière sont réalisées en utilisant des microélectrodes de verre (capillaires en borosilicate GC 150F-15, *Harvard apparatus*) préalablement remplie de solution de patch contenant 135 mM de KCl, 0.1 mM de CaCl₂, 1.1 mM d'EGTA, 10 mM d'HEPES, 3 mM de Mg²⁺ATP, 0.3 mM de Na⁺GTP et 4 mM de phosphocréatinine à pH7,3 ajusté avec une solution de KOH. Les microélectrodes doivent avoir une résistance de 4-6 MOhms. Les données ont été échantillonnées à 10 Hz et filtré avec un cut-off d'une fréquence de 3kHz en utilisant un amplificateur EPC-9 (*HEKA elektronik*). La capacitance de la cellule est déterminée par la capacitance de la cellule entière compensée par le circuit de l'amplificateur EPC-9. Les valeurs moyennes de la capacitance sont de 31,6 pF +/- 1,72 pF pour la totalité des cellules. Les cellules sont stimulées avec des pas de voltage d'incrément de 10 mV durant 2 secondes à partir d'un potentiel de repos de -85 mV (pour les mutations p.A294) et de -105 mV (pour la mutation p.V175L) jusqu'à +45 mV. Un pas de potentiel à -65 mV est réalisé pendant 1 seconde.

Les analyses sont réalisées sur les données après soustraction du bruit de fond. Le potentiel de membrane est corrigé par le potentiel de jonction liquide (- 5 mV). Pour l'analyse de la conductance au voltage (G) du canal ionique (relation G-V), les valeurs de G sont relevées en mesurant l'amplitude maximale du courant et en divisant ces valeurs par le gradient

électrochimique des ions potassiums $E_k = -93$ mV. Une fonction de Boltzmann est appliquée aux points obtenus : $G/G_{max} = 1 / [1 + \exp((V_{1/2} - V_m) / k)]$. Cette fonction nous permet de relever le $V_{1/2}$ qui est la valeur où le voltage d'activation atteint la moitié de son maximum et le facteur k qui permet de voir l'efficacité d'ouverture du canal. Pour l'étude de la cinétique du canal, une fonction à une ou deux exponentielles a été appliquée sur les points de la courbe : $y = A_{rapide} \exp(-\tau / \tau_{rapide}) + A_{lent} \exp(-\tau / \tau_{lent})$ où τ_{rapide} et τ_{lent} sont les constantes rapide et lente du canal. La constante de temps de canal représentée la moyenne pondérée des constantes rapide et lentes de l'activation et de la désactivation du canal a été calculée avec l'équation suivante : $\tau = (\tau_{rapide} A_{rapide} + A_{lent} \tau_{lent}) / (A_{rapide} + A_{lent})$. Les courants sont analysés en utilisant le logiciel Origin 8.0 (*OriginLab*).

IV.2. ANALYSES STATISTIQUES DES RESULTATS D'ELECTROPHYSIOLOGIE

Les données sont exprimées en moyenne \pm ES (erreur standard). Lorsque le test de normalité est validé, les moyennes de deux groupes sont comparées en utilisant le test t de Student ou le test d'ANOVA à un facteur suivi par un test de Bonferroni. Quand la distribution n'était pas normale, un test de Mann Whitney (non paramétrique) est utilisé pour la comparaison de deux échantillons indépendants. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel *Graphpad Prism*.

RESULTATS

RESULTATS

Nous avons constitué une cohorte de 402 patients atteints d'EEP diagnostiqués avant l'âge de trois mois et ne présentant aucune anomalie structurale ou métabolique associée. Dans le but d'obtenir un diagnostic génétique (Figure 17), les échantillons d'ADN sont tout d'abord analysés à l'Hôpital de la Timone pour la détection de mutations dans les gènes *KCNQ2* et *STXBP1*. Les patients ne présentant pas de mutations dans ces deux gènes, sont alors transférés dans notre cohorte dites de « recherche » afin de permettre la poursuite de la caractérisation moléculaire. La stratégie utilisée pour la cohorte de recherche est la suivante :

1- L'ADN de tous les patients est étudié à l'aide de la technique d'hybridation génomique comparative ou CGH (Comparative genomic hybridization) en utilisant des puces de type haute résolution commercialisées par *Roche NimbleGen* (format 720K) ou *Agilent* (format 1M). La technique de CGH utilise l'hybridation entre l'ADN du patient à étudier et un ADN témoin pour rechercher les variations du nombre de copies (CNV). Des quantités identiques des deux ADN sont marquées à l'aide de fluorochromes différents qui permettent de les reconnaître. Ils sont ensuite hybridés à une puce à ADN, la quantité de matériel génétique d'un ADN par rapport à un autre pouvant être visualisée en fonction de l'intensité du fluorochrome. La résolution dépend du nombre de sondes présentes sur la puce. Pour la puce 720k, la résolution moyenne est de 2,5 kb et pour la puce 1M, la résolution moyenne est de 2,1 kb.

Cette technique est réalisée en routine au sein de notre équipe et nous avons mis en évidence chez nos patients de nombreux CNV (*copy number variant*) de signification inconnue pouvant être responsables de l'épilepsie chez les patients EEP (Tableau 5A). Ces anomalies sont ensuite vérifiées de manière individuelle par qPCR sur l'ADN du patient et de ses parents.

2- En parallèle, l'ADN de certains patients est également étudié à l'aide de la technique du séquençage d'exome. Cette technique permet le séquençage de toutes les parties codantes

du génome. Nous avons choisi pour cette étude de réaliser un séquençage en utilisant la stratégie des trios qui consiste à comparer l'ADN du patient à celui de ses parents, ce qui permet de sélectionner les mutations *de novo* (Tableau 5B). Elle n'a pas été réalisée sur toute la cohorte, pour des raisons de coût et de temps, mais uniquement sur 10 familles et 4 patients individuels.

3- Les deux techniques précédentes permettent de rechercher des mutations sur l'ensemble du génome. Afin de les compléter, nous avons réalisé un séquençage à moyen-débit et ciblé sur des gènes connus pour être impliqués dans la pathologie. Nous avons sélectionné les gènes dont les mutations sont peu décrites dans la littérature ou ceux présentant des anomalies mises en évidence par les deux techniques précédentes.

Les résultats du génotypage de notre cohorte sont présentés dans le tableau 5B.

4- Des études fonctionnelles sont réalisées pour étudier le caractère pathogène de certaines des mutations ou CNV qui ont été mises en évidence en utilisant les techniques précédentes. Dans un premier temps, nous avons utilisé les modèles cellulaires transfectés avec des plasmides codant soit pour une forme mutée de la protéine, soit pour des ARN en épingle à cheveux (shRNA, *small hairpin RNA*) qui permettent de supprimer l'expression d'un gène de façon ciblée.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai choisi d'étudier la délétion Xp11:48809279-48829265 (Xp11.23) et les conséquences fonctionnelles des mutations du gène *KCNQ2*.

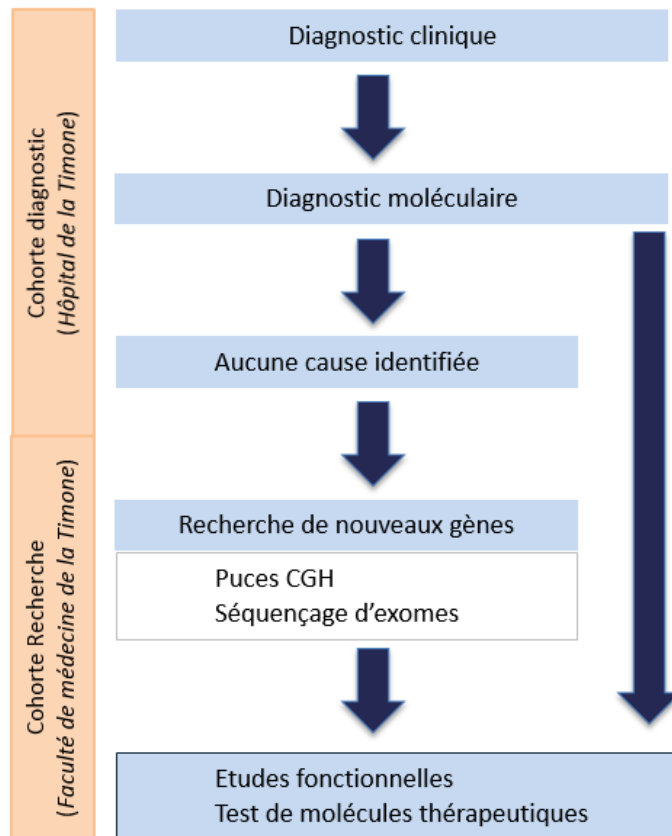


Figure 17 : Schéma représentant la stratégie utilisée pour la recherche à visée diagnostique et thérapeutique

Tableau 5 : Liste des anomalies génétiques retrouvées chez les patients de notre cohorte

(A) Anomalies du nombre de copies trouvées dans notre cohorte

(B) Mutations représentées dans notre cohorte

A- Anomalies du nombre de copie					
Localisation chromosomique	Taille	Gain/Perte	Sexe	Gènes impliqués	Héritabilité
5q14 :88153930-88161952	8 kb	Perte	F	MEF2C	de novo
Xq28 :148491732-148525120	33 kb	Gain	F	TMEM185A	de novo
Xp11 :48809279-48829265	20 kb	Perte	M	WDR45, PRAF2, CCDC120	de novo
16q23 :80418853-80498685	80 kb	Perte	F	PLCG2	de novo
6p24 :13240010-13375390	135 kb	Perte	M	PHACTR1	de novo
15q26 :90971875-90982991	11 kb	Perte	M	FAM174B	de novo
15q11q13 :21180572-26051141	5 Mb	Gain	M	15 gènes	de novo
15q11q13 :21144837-26551276	5,4 Mb	Perte	F	15 gènes	de novo
9q34 :129467315-129478092	10 kb	Perte	F	STXBP1	de novo
4q21 :81005430-84974311	4 Mb	Perte	F	27 gènes	de novo
2q27 :164702135-166860592	2 Mb	Perte	F	SCN2A (et 11 autres gènes)	de novo

B- Mutations représentées dans notre cohorte		
Localisation chromosomique	Gènes impliqués	Nombre de patients
20q13.33	KCNQ2	34
9q34.11	STXBP1	21 (+ 1 avec une délétion en CGH)
12q13.13	SCN8A	5
9q34.3	KCNT1	5
16p13.3	TBC1D24	2
9q34.3	GRIN1	2
16p13.2	GRIN2A	2
Autres gènes mutés moins de deux fois dans notre cohorte (KCNQ3, SLC13A5, GABRG2 , ARX, CDKL5, ALGT11, ALG13, WWOX...)		10
Total de patients avec une mutation		81

Article 1 :

Early-onset epileptic encephalopathy as the initial clinical presentation of *WDR45* deletion in a male patient.

Abidi A, Mignon-Ravix C, Cacciagli P, Girard N, Milh M, Villard L.
European Journal of Human Genetics, 2015.

SHORT REPORT

Early-onset epileptic encephalopathy as the initial clinical presentation of *WDR45* deletion in a male patient

Affef Abidi^{1,2}, Cécile Mignon-Ravix^{1,2}, Pierre Cacciagli^{1,2,3}, Nadine Girard⁴, Mathieu Milh^{1,2,5} and Laurent Villard^{*,1,2}

Variants in the WD repeat 45 (*WDR45*) gene in human Xp11.23 have recently been identified in patients suffering from neurodegeneration with brain iron accumulation, a genetically and phenotypically heterogeneous condition. *WDR45* variants cause a childhood-onset encephalopathy accompanied by neurodegeneration in adulthood and iron accumulation in the basal ganglia. They have been almost exclusively found in females, and male lethality was suggested. Here we describe a male patient suffering from a severe and early neurological phenotype, initially presenting early-onset epileptic spasms in clusters associated with an abnormal interictal electroencephalography showing slow background activity, large amplitude asynchronous spikes and abnormal neurological development. This patient is a carrier of a 19.9-kb microdeletion in Xp11.23 containing three genes, including *WDR45*. These findings reveal that males with *WDR45* deletions are viable, and can present with early-onset epileptic encephalopathy without brain iron accumulation.

European Journal of Human Genetics advance online publication, 15 July 2015; doi:10.1038/ejhg.2015.159

INTRODUCTION

Variants in the WD repeat 45 (*WDR45*) gene have recently been identified in patients suffering from neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). NBIA is a genetically and phenotypically heterogeneous condition.¹ Among all NBIA forms, beta propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN) syndrome affects a subgroup of patient characterized by childhood-onset encephalopathy accompanied by neurodegeneration in adulthood and iron accumulation in the basal ganglia, notably in the globus pallidus or the substantia nigra.² *WDR45* variants associated with BPAN syndrome have been almost exclusively found in females and only three male cases have been described to date.³ This low incidence of male cases has been attributed to male lethality and the existence of a few male carriers to somatic mosaicism.² Among published cases, 70% of patients suffered from epileptic seizures beginning after 3 months of age.^{3,4}

Early-onset epileptic encephalopathies (EOEE) form a group of severe epilepsies occurring in the first 3 months of life. Clinical signs include stormy seizures associated with an altered interictal electroencephalographic (EEG) pattern and abnormal neurological development. They can be classified according to interictal/ictal EEG pattern, type of seizures and age at onset. These epileptic disorders are highly heterogeneous in terms of aetiology as they can be symptomatic (eg, cortical malformation or stroke), or have a metabolic or genetic origin. Variants in several genes were shown to cause EOEE.⁵

During the genetic characterization of a large cohort of patients suffering from various forms of EOEE, we identified a *de novo* deletion of the *WDR45* gene in a male patient. This patient suffers from a more severe and earlier form of BPAN syndrome. Our unexpected findings

reveal that alterations of the *WDR45* gene region in Xp11 are viable in male patients and can initially present as EOEE.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

A cohort of 352 EOEE patients was studied. The inclusion criteria were onset of epilepsy within the first 3 months of life, absence of any metabolic or obvious structural cause, abnormal interictal EEG and severe seizures that resisted to antiepileptic drugs. All patients with a normal karyotype were screened, using Sanger sequencing, for the presence of a variant in the most frequently mutated EOEE genes (ARX, KCNQ2, STXBP1, SCN2A, SCN8A) and, using array comparative genomic hybridization (array-CGH), to detect submicroscopic deletions/insertions. This project was approved by the local ethics committee (CPP Sud Méditerranée I, PHRC 2011/27).

Array-CGH and quantitative PCR

Array-CGH was performed using genomic DNA isolated from blood lymphocytes by standard methods. Array-CGH was performed using NimbleGen 3 × 720 K Whole Genome arrays (Roche NimbleGen, Madison, WI), providing an average resolution of 2.5 kb. Microarrays were hybridized, scanned and analysed according to the manufacturer's instructions using a Roche Nimblegen microarray analysis platform. Regions showing abnormal dosage were compared with regions already known to represent non-pathogenic copy-number variations listed in the database of genomic variants (<http://projects.tcag.ca/cgi-bin/variation/gbrowse/hg18>). Quantitative PCR (qPCR) was performed using FastStart Universal SYBR Green Master (Rox; Roche). The Xp11.23 variant was submitted to ClinVar with accession number SCV000223701 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>).

¹Inserm, UMR_S 910, Faculté de Médecine de La Timone, Marseille, France; ²Aix Marseille Université, GMGF, Marseille, France; ³Département de Génétique Médicale, Hôpital d'Enfants de La Timone, Marseille, France; ⁴Département de Neuroradiologie, Hôpital d'Adultes de La Timone, Marseille, France; ⁵Service de Neurologie Pédiatrique, Hôpital d'Enfants de La Timone, Marseille, France

*Correspondence: Dr L Villard, Inserm, UMR_S 910, Faculté de Médecine de La Timone, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France. Tel: +33 (0) 4 91 32 49 03; Fax: +33 (0) 4 91 80 43 19; E-mail: laurent.villard@univ-amu.fr

Received 23 March 2015; revised 27 May 2015; accepted 11 June 2015

RESULTS

Clinical phenotype

The patient was referred to our centre at the age of 3 months with epileptic spasms associated with focal seizures. He was born to healthy parents after normal delivery and he adapted well initially. Neurological examination, at 3 months of age, was very abnormal – no head control, no eye contact in a hypokinetic patient with global hypotonia. He had cortical blindness and ophthalmologic examination was normal (retina and anterior chamber). EEG showed high amplitude slow waves with multifocal spikes. A cluster of asymmetric spasms was recorded. At 7 months of age, brain MRI revealed a global loss of brain volume including supra and infratentorial areas, T2 hyperintensity of the posterior fossa (bilateral dentate nuclei) and lipid accumulation on spectroscopy (white matter, not shown). This slight peak of lipids at 1.3 p.p.m. was present within the white matter only at the initial MRI assessment. No iron accumulation could be detected at this age, though no gradient echo sequence and no susceptibility weighted images were performed (Figure 1). The evolution was marked by the absence of motor or sensory acquisitions. His neurological examination showed dystonic and spastic quadriplegia, a motionless child without spontaneous movement, bedridden with very poor eye contact. Head circumference remained normal throughout follow-up. At 19 months of age, brain MRI showed increased global brain atrophy with T2 hyperintensity of the white matter. Iron accumulation was only detected at 5 years of age, using a susceptibility weighted imaging (SWI) sequence, in striata, red nuclei and substantia nigra (Figure 1). Interestingly, conventional sequences (T1, T2) failed to detect iron accumulation at this stage (Figure 1). Blood (NH₄, glycemia, amino-acid chromatography, lactates, pyruvates, biotinidase

activity, pipercolic acid, transaminases, acid hydrolases), urine (chromatography of organic acids, muco/oligopolysaccharids, lactates) and cerebrospinal fluid (neurotransmitter profil, amino-acid chromatography, lactates, pyruvates) analyses were normal. Study of the mitochondrial respiratory complex on muscle was normal.

Molecular characterization of an Xp11.23 *de novo* microdeletion

High-resolution array-CGH analysis detected a 19.9-kb deletion in Xp11.23 hg18 chrX:g.(48 802 381_48 809 279)_(48 829 265_48 854-335)del (Figure 2a). Using parental DNAs, we found that this deletion occurred *de novo*. The deleted region contains three genes – *WDR45*, coiled-coil domain containing 120 (*CCDC120*) and prenylated rab acceptor 1 domain family member 2 (*PRAF2*; Figure 2b). The deletion was confirmed using qPCR and was not in a mosaic status in the patient (Figure 2c). Only one study reported a variation of Xp11.23 in the database of genomic variants (see Subjects and methods above) but no information is available for the patient gender.

DISCUSSION

The patient described here is the first male case presenting a constitutional *WDR45* deletion in the context of EOEE. Several brain MRIs failed to detect signs of iron accumulation using conventional sequences, even several years after the symptoms onset, because no SWI or gradient echo sequences were acquired until 5 years of age. Consecutively, SWI/GRE should be included when imaging a child with unexpected dystonia. Early images rather revealed global brain atrophy, a nonspecific finding in many cases of EOEE. This patient thus presented a peculiar form of BPAN beginning with severe epilepsy and cortical blindness. In BPAN, the vast majority of

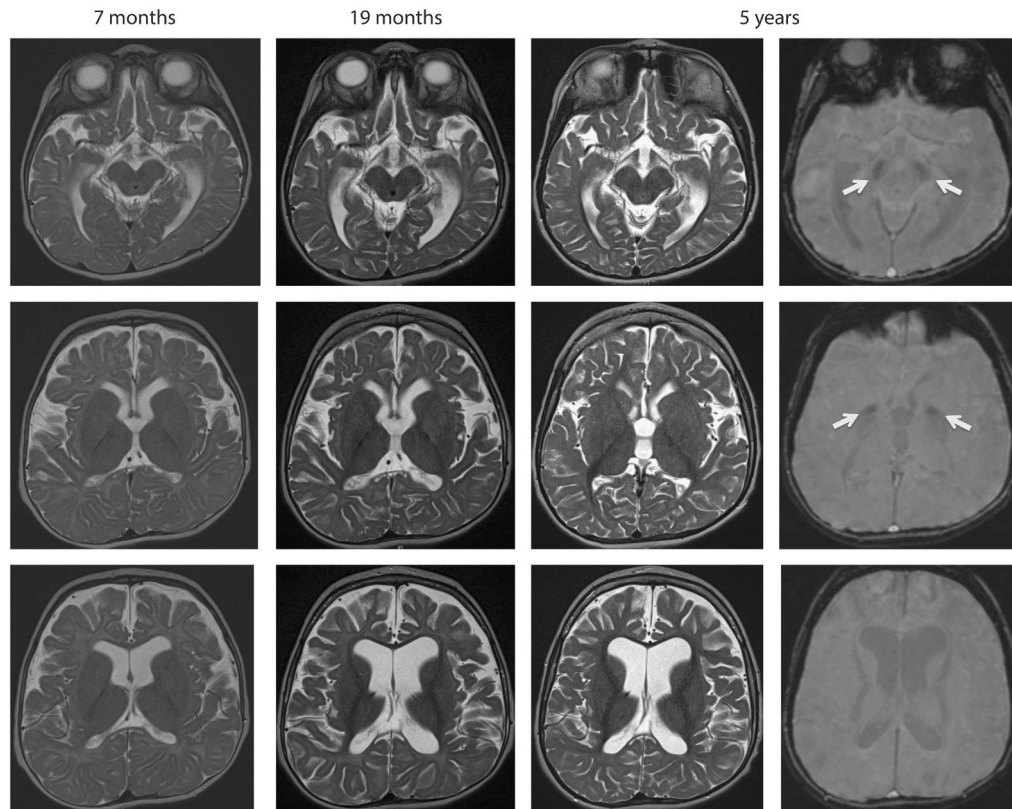


Figure 1 Brain MRI performed at 7 months, 19 months and 5 years of age. Axial T2 sequences at different ages failed to detect iron accumulation. SWI sequence (right image) reveals an hyposignal in the basal ganglia at the level of globus pallidus and substantia nigra (white arrows), bilaterally (red nuclei are not shown).

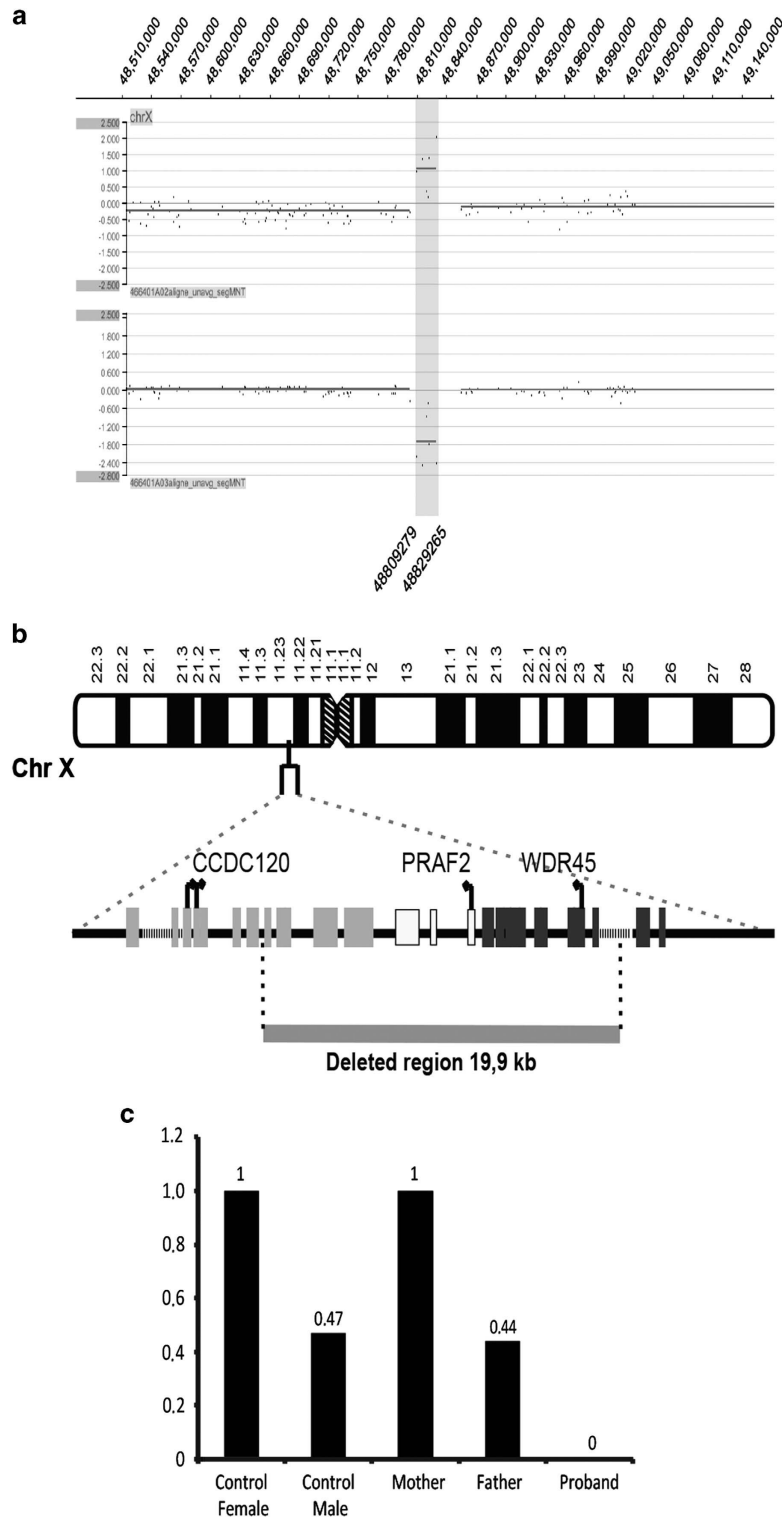


Figure 2 Characterization of the deletion (a). Detection of a 19.9-kb deletion on the X chromosome using array-CGH. The grey box shows the position of the deleted region extending from 48809279 to 48829265 pb (NCBI36/Hg18). The experiment was performed using dye swap and the results of Cy5 labelling (upper tracks) and Cy3 labelling (lower tracks) are shown for the same patient. (b) Schematic representation of the Xp11.23 region showing the deletion identified in the BPAN patient. The grey bar shows the deleted region. Exons are represented as black, grey or white boxes for *WDR45*, *CCDC120* and *PRAF2* genes respectively. Arrows indicate the orientation of the transcription and the position of the translation initiation codon. (c) Quantification of *WDR45* genomic DNA targets using qPCR. The control female DNA was arbitrarily set at 1 and each experiment was performed in triplicate. The mean of the three experiments is provided as a number above each condition.

published cases are females, with only three reported male patients. It has been hypothesized that the gender bias was due to *WDR45* variants lethality in males.³ Along the same line, somatic mosaicism would explain the similar phenotype between the few affected males and female patients. Indeed, Haack *et al*² have confirmed the presence of somatic mosaicism in a male patient. However, the presence of a mosaic variant was not demonstrated but simply inferred for the two other males. The patient described in this report is not mosaic, at least in his lymphoblasts, and this could explain the early disease onset. We hypothesize that the initial clinical presentation of a *WDR45* deletion is an EOEE-like syndrome, followed a few years later by a more severe BPAN syndrome. Interestingly, despite full *WDR45* deletion, iron accumulation was only detected at 5 years of age. By comparison, the youngest female in whom iron accumulation was first detected was 11 years old⁶ suggesting that non-mosaic males have a much earlier phenotype of iron deposition.

We cannot exclude the involvement of the two additional deleted genes and this peculiar clinical presentation could be due to a contiguous gene syndrome. In fact, the *PRAF2* gene encodes a member of the PRA1 domain-containing protein family. This family is already involved in the regulation of glutamate transport^{7,8} whose defects are implicated in epilepsy.⁹ The function of *PRAF2* is unknown, and the corresponding protein has a brain expression and is enriched in synaptic vesicles.¹⁰ *CCDC120* mediates neurites' outgrowth via the regulation of cytohesin-2.¹¹ Hence, *CCDC120* deletion could also be an additional mechanism as abnormal formation of the neuronal network may contribute to intellectual deficiency or the abnormal motor and sensory acquisitions in this patient. The role of *PRAF2* and *CCDC120* during brain development and in genetic diseases remains to be investigated. Nonetheless, whatever their function is, our work reveals that males with deletions of *WDR45* are viable, and can present with EOEE.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the patient and his family for their participation in this study. This work was supported by Programme Hospitalier de Recherche Clinique 2011, Inserm and Aix Marseille University. We thank the Centre de Ressources Biologiques of La Timone Children's Hospital (Karine Bertaux, Cécile Mouradian and Andrée Robaglia-Schlupp) for assistance with the samples used in this study.

- 1 Gregory A, Hayflick SJ: Genetics of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2011; **11**: 254–261.
- 2 Haack TB, Hogarth P, Kruer MC *et al*: Exome sequencing reveals de novo *WDR45* mutations causing a phenotypically distinct, X-linked dominant form of NBIA. *Am J Hum Genet* 2012; **91**: 1144–1149.
- 3 Hayflick SJ, Kruer MC, Gregory A *et al*: β -Propeller protein-associated neurodegeneration: a new X-linked dominant disorder with brain iron accumulation. *Brain* 2013; **136**: 1708–1717.
- 4 Saitsu H, Nishimura T, Muramatsu K *et al*: De novo mutations in the autophagy gene *WDR45* cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat Genet* 2013; **45**: 445–449.
- 5 Lin CL, Orlov I, Ruggiero AM *et al*: Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18. *Nature* 2001; **410**: 84–88.
- 6 Ohba C, Nabatame S, Iijima Y *et al*: De novo *WDR45* mutation in a patient showing clinically Rett syndrome with childhood iron deposition in brain. *J Hum Genet* 2014; **59**: 292–295.
- 7 Mastrangelo M, Leuzzi V: Genes of early-onset epileptic encephalopathies: from genotype to phenotype. *Pediatr Neurol* 2012; **46**: 24–31.
- 8 Liu Y, Vidensky S, Ruggiero AM, Maier S, Sitte HH, Rothstein JD: Reticulon RTN2B regulates trafficking and function of neuronal glutamate transporter EAAC1. *J Biol Chem* 2008; **283**: 6561–6571.
- 9 Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG: Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res* 1999; **36**: 189–204.
- 10 Koomoa D-LT, Go RCV, Wester K, Bachmann AS: Expression profile of *PRAF2* in the human brain and enrichment in synaptic vesicles. *Neurosci Lett* 2008; **436**: 171–176.
- 11 Torii T, Miyamoto Y, Tago K *et al*: Arf6 guanine nucleotide exchange factor cytohesin-2 binds to *CCDC120* and is transported along neurites to mediate neurite growth. *J Biol Chem* 2014; **289**: 33887–33903.

I. Etude d'une délétion Xp11.23 (Article 1 : Abidi et al, 2015)

Identification d'anomalies du nombre de copies

L'ADN préparé à partir des lymphocytes du patient a été analysé en utilisant une puce d'hybridation génomique comparative *Roche Nimblegen* format 720K. Cette analyse a permis de mettre en évidence 23 CNVs « connus » (CNV déjà décrits dans la base de données *Database of Genomic Variants* (DGV) sur des témoins), ces CNV sont supposés non pathogènes, et 6 CNVs « inconnus » (non décrits dans la base de données DGV). Sur ces 6 CNVs, nous avons exclu ceux qui ne contenaient aucun gène. Ainsi, deux CNVs potentiellement pathogènes ont pu être identifiés :

- Perte de 5q34 :159993374-160031252 (37 878 paire de bases). Le CNV localisé en 5q34, contient un gène *ATP10B* (*Probable phospholipid-transporting ATPase VB*). Le rôle de ce gène est peu connu et la délétion n'emporte qu'une copie de ce gène.

- Perte de Xp11:48809279-48829265 (19 986 paire de bases). Le CNV contient les gènes *CCDC120* (coiled-coil domain containing 120), *PRAF2* (prenylated Rab acceptor 1 domain family member 2) et *WDR45* (WD repeat 45). Cette délétion est localisée sur le chromosome X chez un patient de sexe masculin.

Pour notre étude, nous avons choisi de nous intéresser à la délétion Xp11.23, car le patient n'a plus aucune copie de ces 3 gènes. Cette délétion Xp11.23 est une meilleure candidate pour expliquer l'épilepsie que la délétion d'un seul gène sur un autosome.

Phénotype clinique du patient porteur de la délétion Xp11.23

Le diagnostic clinique initial du patient porteur de la délétion Xp11.23 a montré une EEP sévère qui a débuté à l'âge de trois mois. À cet âge, l'EEG initial montrait des pics multifocaux accompagnés de vagues lentes d'amplitude élevée. Aucune anomalie cérébrale n'était visible sur l'IRM à sept mois. De plus, le bilan métabolique et le caryotype de ce patient étaient normaux.

Caractérisation moléculaire de la délétion Xp11.23

Mon équipe a confirmé le caractère *de novo* de cette délétion à l'aide de la technique de PCR quantitative (qPCR) en étudiant l'ADN génomique extrait de lymphocytes du patient et de ses parents. La délétion chromosomique de 19,9 kilobases implique 3 gènes : *CCDC120*, *PRAF2* et *WDR45*. Nous avons extrait des ARN à partir des lymphocytes du patient et de ses parents, afin de vérifier l'absence de transcrits de ces gènes chez le patient. Nous avons utilisé la technique de transcription inverse pour transformer ces ARN en ADN complémentaire (ADNc). Puis, nous avons réalisé une qPCR sur les ADNc du patient et de ses parents. Cette qPCR a permis de confirmer l'absence de transcrits pour ces trois gènes (Figure 18).

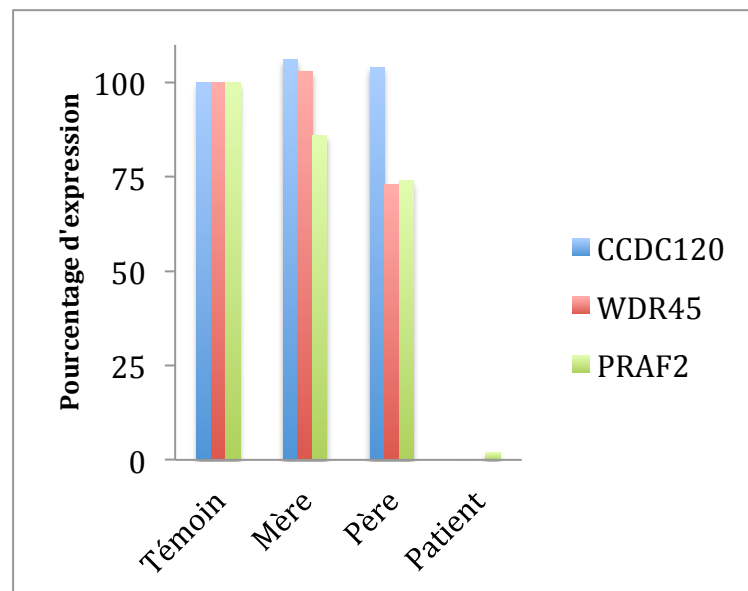


Figure 18 : Etude par RT-PCR quantitative de l'expression des gènes *CCDC120*, *WDR45* et *PRAF2* chez le patient porteur de la délétion Xp11.23 et ses parents.

L'expérience a été réalisée sur l'ADNc provenant de la transcription inverse d'ARN issus de lymphocytes du patient, de ses parents et d'un témoin. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin.

Au début de cette étude, seul le gène *PRAF2* avait fait l'objet de publications. En ce qui concerne les deux autres gènes, nous n'avions que quelques informations succinctes principalement basées sur la prédiction de leur structure protéique :

- La protéine *CCDC120* n'était pas décrite dans la littérature. Elle appartient à la famille des protéines à domaines superhélices.

- La protéine WDR45 n'avait aucun rôle décrit dans la littérature. Elle appartient à une famille de protéine à répétitions de motifs tryptophane-acide aspartique.

- le rôle de la protéine PRAF2 n'était pas connu également. Un article a montré que la protéine PRAF2 est exprimée au niveau des vésicules synaptiques du cervelet, du cortex cérébral, de l'hippocampe et des ventricules latéraux chez l'homme (Koomoa, 2008). Cette protéine appartient à une famille à domaine PRA1 qui est impliquée dans la recapture du glutamate et le trafic des vésicules. Cette famille comporte 3 membres PRAF1-3 (Fo, 2006).

La protéine PRAF1 (YIP3 ou RABAC1) est une protéine vésiculaire de l'appareil de Golgi et co-localise avec le complexe SNARE. Elle permet la régulation du transport des vésicules du réticulum endoplasmique (RE) au Golgi (Fenster, 2000).

La protéine PRAF3 (GTRAP3-18, ARL6IP5) est une protéine du RE se liant au transporteur EAAC1 qui permet la recapture du glutamate. Lorsque la protéine PRAF3 est surexprimé, il y aurait inhibition de la sortie du RE de EAAC1. Cette inhibition entraîne une diminution de la recapture du glutamate, neurotransmetteur exciteur essentiel du système nerveux central (Liu, 2008 ; Ruggiero, 2008).

Nous avons choisi une protéine candidate, parmi ces trois protéines, pour débiter notre étude. En se basant sur les connaissances que nous avons des trois protéines impliquées dans la délétion, notre sélection s'est portée sur la protéine PRAF2. En effet, notre hypothèse est que cette protéine aurait un rôle dans la recapture du glutamate, et que son absence serait responsable de l'épilepsie chez cet enfant. Afin d'identifier des mutations du gène *PRAF2* chez d'autres patients de notre cohorte, mon équipe a génotypé 64 patients EEP à l'aide du séquençage selon la technique de Sanger (correspondant au nombre total de patients de la cohorte en 2012). Malheureusement, aucune mutation du gène *PRAF2* n'a pu être mise en évidence chez ces patients.

Implication du gène *WDR45* dans une pathologie neurologique conduisant à une neurodégénérescence

Durant mon étude de la délétion Xp11.23 d'un patient EEP, un article impliquant des mutations *de novo* du gène *WDR45* dans une neurodégénérescence associée à une protéine beta-protéine a été publié (BPAN) (Haack, 2012). Cette pathologie provoque une

encéphalopathie dans la petite enfance accompagnée d'une neurodégénérescence chez l'adulte. Une accumulation de fer dans les ganglions de la base, caractéristique de cette pathologie, apparaît à l'adolescence et est visible à l'IRM (Haack, 2012). Le diagnostic de BPAN est accompagné d'un retard important de langage et d'une déficience intellectuelle (Hayflick, 2013). De plus, une épilepsie survenant durant l'enfance est présente chez 70% des patients atteints de BPAN (Hayflick, 2013 ; Saitsu, 2013 ; Verhoeven, 2014). La majorité des patients décrits avec des mutations du gène *WDR45* sont des filles (seulement 3 cas de garçons ont été décrit pour plus de 30 filles affectées) et le phénotype est similaire entre les filles et les garçons. Il existe donc un biais de sex-ratio pour cette pathologie (Haack, 2012 ; Hayflick, 2013 ; Saitsu, 2013; Verhoeven, 2014). Ce gène étant localisé sur le chromosome X, il est possible que les mutations de *WDR45* soient létales chez le patient mâle par absence protéine fonctionnelle (Haack, 2012 ; Hayflick, 2013). Le peu de cas de garçon et l'absence de différence de phénotype clinique entre les deux sexes pourrait être expliqué par un mosaïcisme somatique chez les garçons ce qui a été confirmé pour l'un des trois patients de sexe masculin décrits dans la littérature. Ce mosaïcisme a été très fortement soupçonné pour les deux autres patients (Haack, 2012).

Notre patient est un garçon avec une délétion complète et non mosaïque du gène *WDR45* (Figure 18), aucun transcrit trouvé en utilisant la technique de qRT-PCR à partir d'ADNc issus de lymphocytes). Il présentait initialement un phénotype EEP sans aucune anomalie de dépôt de fer dans les ganglions de la base à 7 mois. À l'âge de cinq ans, ce patient est revenu à nouveau à l'hôpital afin de réaliser une IRM accompagnée d'une séquence de susceptibilité magnétique (SWI), ce qui permet de rechercher de façon spécifique des dépôts de fer. Grâce à cet examen, nous avons observé un dépôt de fer précoce dans le striatum, les noyaux rouges du tronc cérébral, et le *globus pallidus* confirmant ainsi le diagnostic de BPAN chez ce patient.

Comparaison du patient porteur de la délétion avec les autres patients présentant des mutations dans le gène *WDR45*

Nous avons donc comparé le phénotype clinique de notre patient avec celui des autres patients BPAN :

- Tout d'abord, son phénotype est beaucoup plus précoce en ce qui concerne l'âge d'apparition des signes cliniques. Il débute à l'âge de trois mois tandis que le diagnostic initial de retard de développement est posé dans l'enfance (entre 1 et 3 ans) pour les patients atteints de BPAN (Hayflick, 2013). Cependant, il existe une patiente BPAN présentant un phénotype plus précoce avec une apparition à l'âge de dix mois d'un retard de développement et une épilepsie plus tardive après un an (Okamoto, 2014). Cette patiente pourrait présenter un défaut d'inactivation du chromosome X. Ce défaut pourrait conduire à une inactivation du chromosome X portant la copie normale du gène *WDR45*, ce qui conduirait à une expression de la forme mutée de la protéine *WDR45* uniquement. Cette anomalie d'inactivation reste à démontrer et pourrait expliquer la précocité des signes clinique chez cette patiente. Une seule étude a montré un biais d'inactivation en faveur du chromosome avec la copie mutée de *WDR45* (Saito, 2013). Chez ces patientes, ce biais pourrait reproduire ce que l'on observe chez notre patient mais le phénotype clinique n'est pas aussi précoce et sévère.

- Le deuxième élément qui diffère de la clinique classique des BPAN est l'épilepsie précoce chez notre patient qui est apparue comme le symptôme principal. Bien que l'épilepsie soit présente pour deux tiers des patientes décrites, les crises ne surviennent pas précocement comme chez notre patient, mais plus tard dans la petite enfance. Dans les BPAN, les manifestations épileptiques les plus précoces ont été décrites à quatorze mois (Van Goethem, 2014).

Nous avons donc conclu qu'une délétion germinale du gène *WDR45* chez un garçon peut être responsable d'un phénotype BPAN plus précoce. De plus, le phénotype semble être plus sévère et apparaître initialement comme une EEP.

II. Etude fonctionnelle de mutations dans le gène *KCNQ2*

II.1. HYPOTHESE PREALABLE

Nous avons recherché des mutations du gène *KCNQ2* à l'aide du séquençage selon la technique de Sanger chez les 402 patients EEP de notre cohorte. Nous avons identifié 34 mutations positionnées sur la sous-unité protéique Kv7.2 (Figure 19), avec une présence majoritaire de celles-ci au niveau des segments transmembranaires. Aucune mutation dans le domaine N-terminal ou le segment S1 n'a été décrite dans les EEP et n'est retrouvée chez nos patients.

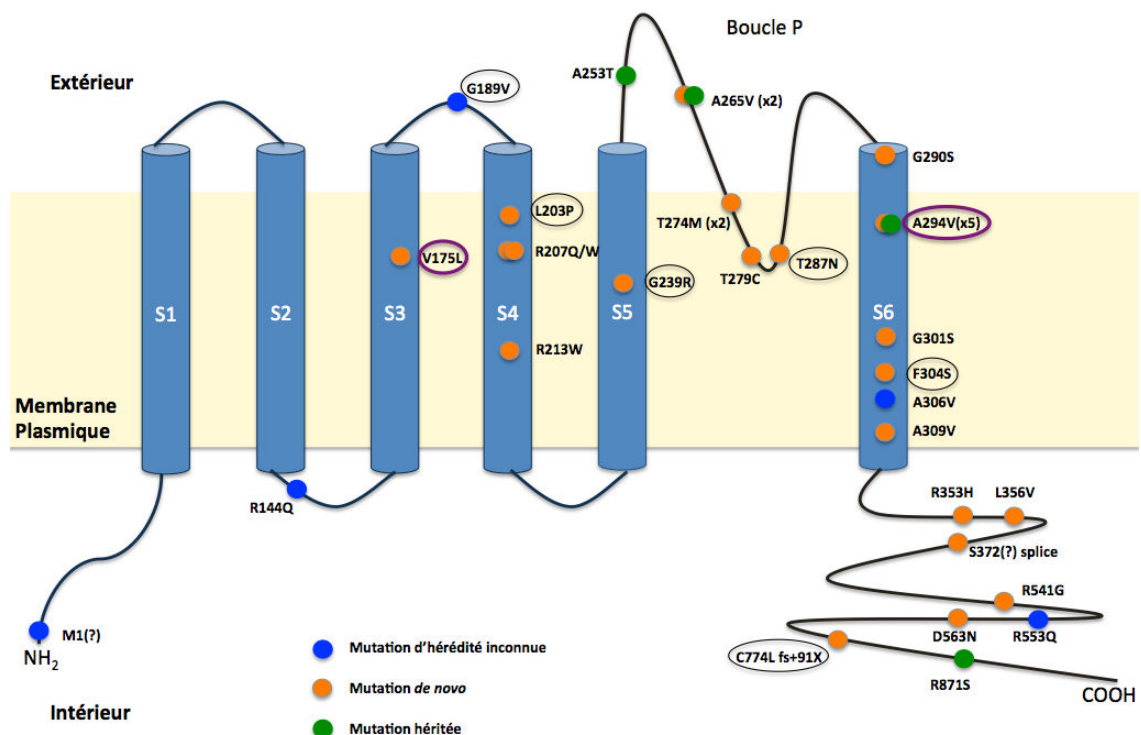


Figure 19 : Localisation des mutations du gène *KCNQ2* dans notre cohorte sur une représentation schématique de la sous-unité Kv7.2

Toutes les mutations *entourées* sont celles que nous avons choisies pour les études d'électrophysiologie. Les mutations entourées *en violet* sont celles que nous avons étudiées de façon détaillée.

Au vu du nombre important de mutations identifiées, nous avons initié une étude fonctionnelle pour plusieurs de celles-ci. J'ai sélectionné sept de ces mutations (Figure 19) sur la base de critères de localisation au niveau protéique. J'ai ainsi choisi des mutations localisées dans des segments différents de la protéine (Tableau 6). J'ai également sélectionné les mutations sur des critères de fréquence et/ou de sévérité de la pathologie.

Tableau 6 : Liste des mutations choisies pour l'étude électrophysiologique du courant M

Mutation	Raison du choix de la mutation
p.V175L c.523G>T	Mutation atypique en S3
p.L203P c.608T>C	Mutation en S4
p.G239R c.715G>C	Mutation en S5
p.T287N c.860C>A	Mutation dans la boucle P Phénotype clinique le plus sévère
p.A294V c.881C>T	Mutation en S6 Mutation récurrente (n=7)
p.F304S c.911T>C	Mutation en S6 Phénotype clinique très sévère
pC774L fs+91X c.2318insG	Mutation dans le domaine C-terminal Phénotype clinique le moins sévère

II.2. PRESENTATION DES RESULTATS OBTENUS POUR L'ETUDE DES MUTATIONS DE *KCNQ2*

Nous avons utilisé le plasmide pcDNA3-KCNQ2 où l'ADNc est placé sous le contrôle du promoteur du cytomegalovirus ce qui permet une expression transitoire, rapide et importante. Tout d'abord, j'ai inséré les mutations p.V175L (c.523G>T), p.L203P (c.608T>C), p.G239R (c.715G>C), p.T287N (c.860C>A), p.A294V (c.881C>T), p.F304S (c.911T>C) et pC774L fs+91X (c.2318insG) dans le plasmide pcDNA3-KCNQ2 en utilisant la technique de mutagenèse dirigée. Nous avons également utilisé le plasmide pcDNA3-KCNQ3 permettant l'expression de Kv7.3 dans les études de co-expression. Nous avons choisi un modèle de lignée cellulaire, les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) qui sont couramment utilisées dans la littérature (Miceli, 2013). Ces cellules expriment peu de canaux ioniques à la membrane plasmique et permettent ainsi l'étude du courant potassique en s'affranchissant de courants ioniques pouvant parasiter l'étude électrophysiologique. De plus, la facilité de culture et de transfection de ces cellules en fait un bon modèle pour une étude de routine.

Les cellules CHO ont été co-transfectées avec un plasmide pEGFP et les plasmides pcDNA3-KCNQ2 sauvages ou mutés, avec ou sans le plasmide pcDNA3-KCNQ3. Nous avons mesuré le courant I_M des cellules transfectées en utilisant la technique de voltage-clamp en configuration cellule-entière (Figure 20). Ces expériences d'électrophysiologie ont été réalisées à l'Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED) dans le laboratoire du Docteur Laurent Aniksztejn. Au départ, nous avons stabilisé les cellules à un potentiel de repos, de l'ordre de - 85 mV à - 105 mV en fonction de la mutation. Nous stimulons les cellules par des pas de voltage croissants de + 10 mV durant 2 secondes avant de redescendre le voltage à un potentiel de - 65 mV durant 1 seconde, ce qui nous permet d'observer la phase de désactivation du courant. Grâce à cette technique, nous étudions les propriétés intrinsèques du canal ionique Kv7.2 qui sont la dépendance au voltage, la densité et la cinétique du courant.

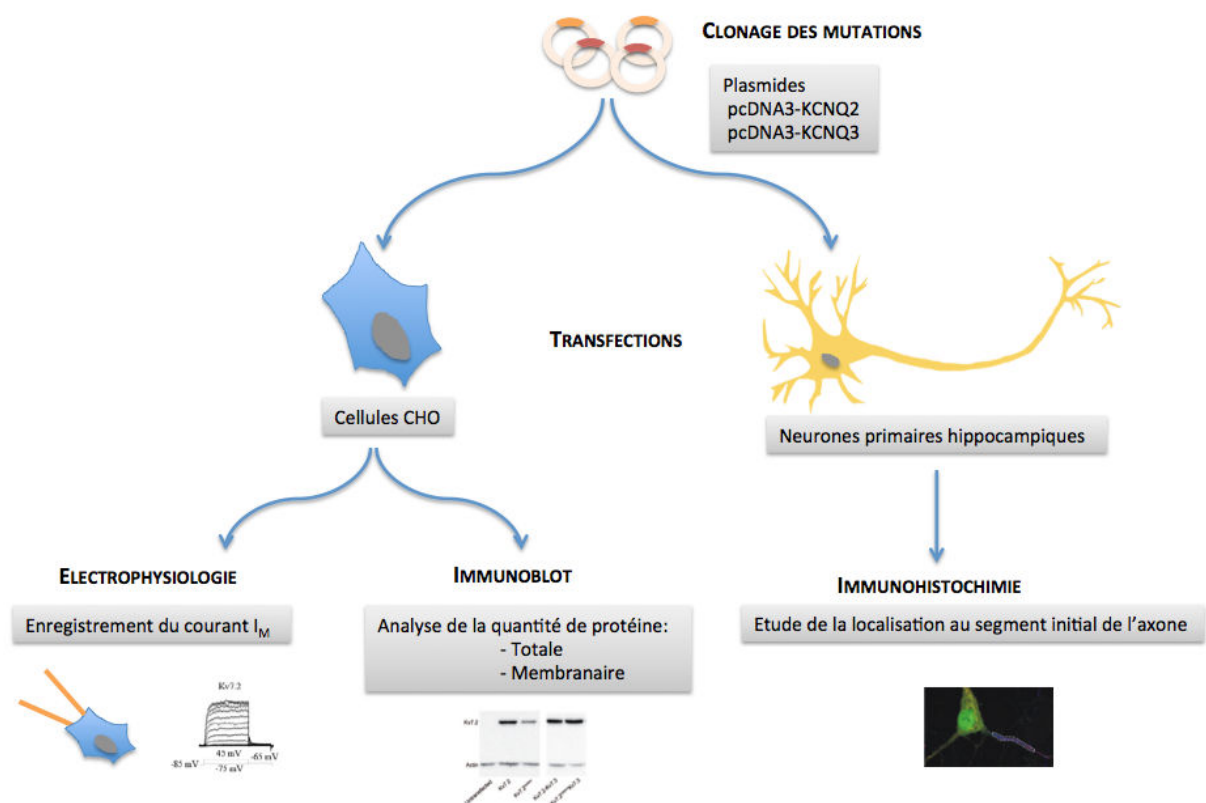


Figure 20 : Stratégie utilisée pour l'étude des mutations de KCNQ2 sur cellules CHO et sur neurones primaires d'hippocampe d'embryon de rats à E18

En parallèle, des études d'expression des protéines mutées ont été réalisées. Nous avons transfecté des cellules CHO par les plasmides pcDNA3-KCNQ2 sauvages ou mutés, avec ou sans pcDNA3-KCNQ3. Nous avons ensuite étudié la quantité de protéines totales des cellules CHO transfectées en utilisant la technique d'immunoblot. D'autre part, pour l'étude de l'expression de ces protéines à la membrane plasmique, les protéines de surface ont été marquées à la biotine. Nous avons ensuite précipité les protéines biotinylées à l'aide de billes de streptavidine. Cette technique permet de séparer la fraction membranaire de la fraction totale. Nous avons ensuite analysé la quantité de sous-unités Kv7.2 et/ou Kv7.3 membranaires à l'aide de la technique d'immunoblot.

En collaboration avec le Centre de Recherche en Neurobiologie et Neurophysiologie de Marseille (CRN2M) dans le laboratoire du Docteur Jérôme Devaux, nous avons également étudié la localisation cellulaire des canaux Kv7. Des neurones primaires hippocampiques de rat à E18.5 ont été transfectés par des plasmides codant pour des sous-unités Kv7.2 sauvages ou mutées et marquées avec une étiquette V5. Des marquages ont permis d'observer la localisation des protéines sauvages et mutantes en utilisant des anticorps spécifiques anti-Ankyrine G (protéine de l'AIS) et anti-V5. Les deux études suivantes présentent les résultats obtenus pour la caractérisation de deux mutations d'intérêt.

Au cours de cette thèse, j'ai réalisé une étude du courant M sur 4 mutations (Tableau 7). Il apparait que les défauts du courant provoqués par les mutations de notre cohorte sont fortement variables. Cette variabilité est décrite dans la littérature (Miceli, 2013 ; Orhan, 2014, Miceli, 2015). Dans ce manuscrit, je présenterai les résultats que j'ai obtenu pour deux de ces mutations, p.A294V et p.V175L parce qu'elles sont atypiques.

Tableau 7 : Récapitulatif des effets des mutations après étude du courant M dans des cellules transfectées
Ce tableau répertorie les effets des mutations observés sur l'enregistrement du courant M. * : *mutation*

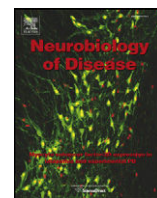
Mutation	Kv7.2*	Kv7.2* ^{WT} Kv7.2	Kv7.2* Kv7.3	Kv7.2* ^{WT} Kv7.2 Kv7.3
T287N	Pas de courant	Pas de courant	Pas de courant	A tester
A294V	Article 2	Article 2	Article 2	Article 2
V175L	Article 3	Article 3	Article 3	Article 3
C774L fs+91X	Courant similaire au sauvage	Courant similaire au sauvage	Courant similaire au sauvage	A tester

Article 2 :

A recurrent KCNQ2 pore mutation causing early onset epileptic encephalopathy has a moderate effect on M current but alters subcellular localization of Kv7 channels.

Abidi A, Devaux JJ, Molinari F, Alcaraz G, Michon FX, Sutura-Sardo J, Becq H, Lacoste C, Altuzarra C, Afenjar A, Mignot C, Doummar D, Isidor B, Guyen SN, Colin E, De La Vaissière S, Haye D, Trauffer A, Badens C, Prieur F, Lesca G, Villard L, Milh M, Aniksztejn L.

Neurobiology of Disease, 2015.



A recurrent *KCNQ2* pore mutation causing early onset epileptic encephalopathy has a moderate effect on M current but alters subcellular localization of Kv7 channels



Affef Abidi^{a,b}, Jérôme J. Devaux^c, Florence Molinari^{d,e}, Gisèle Alcaraz^{a,b}, François-Xavier Michon^{d,e}, Julie Sutura-Sardo^{a,b,f}, Hélène Becq^{d,e}, Caroline Lacoste^{a,b,bb}, Cécilia Altuzarra^g, Alexandra Afenjarⁱⁱ, Cyril Mignot^{hi}, Diane Doummarⁱⁱ, Bertrand Isidor^j, Sylvie N. Guyen^k, Estelle Colin^l, Sabine De La Vaissière^m, Damien Hayeⁿ, Adeline Trauffer^o, Catherine Badens^{a,b,bb}, Fabienne Prieur^p, Gaetan Lesca^q, Laurent Villard^{a,b}, Mathieu Milh^{a,b,f,*}, Laurent Aniksztejn^{d,e,**}

^a Aix-Marseille Université, GMGF, Marseille, France

^b INSERM, UMR_S 910, Marseille, France

^{bb} APHM, Hôpital d'enfants de la Timone, Département de génétique médicale et de biologie cellulaire, Marseille France

^c Aix-Marseille Université, CNRS, CRN2M-UMR7286, Marseille, France

^d Aix-Marseille Université, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED), Marseille, France

^e INSERM, UMR_S 901, Marseille, France

^f APHM, Hôpital d'Enfants de la Timone, Service de neurologie pédiatrique, Marseille, France

^g CHU Besançon, Service de génétique et neuropédiatrie, Besançon, France

^h APHP, Service de Génétique Médicale et Centre de Références « Déficiences Intellectuelles de Causes Rares », Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

ⁱ Université Pierre et Marie Curie, Groupe de Recherche Clinique « Déficiences Intellectuelles de Causes Rares », Paris, France

ⁱⁱ APHP, service de neurologie pédiatrique, Hôpital Trousseau, Paris, France

^j CHU de Nantes, Service de génétique médicale, Nantes, France

^k CHU d'Angers, Service de neurologie pédiatrique, Angers, France

^l CHU d'Angers, Département de Biochimie et Génétique, Angers, France

^m CHU de Tours, Service de neurologie pédiatrique, Tours, France

ⁿ CHU de Tours, Service de génétique, Tours, France

^o CHU de Lille, Service de neurologie pédiatrique, Lille, France

^p CHU de Saint Etienne, Service de génétique médicale, France

^q Hospices Civils de Lyon, Service de génétique, Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2014

Revised 28 March 2015

Accepted 15 April 2015

Available online 22 May 2015

Keywords:

Early epileptic encephalopathy

Kv7 channels

M-current

p.A294V mutation

p.A294G mutation

Subcellular channel expression

ABSTRACT

Mutations in the *KCNQ2* gene encoding the voltage-dependent potassium M channel Kv7.2 subunit cause either benign epilepsy or early onset epileptic encephalopathy (EOEE). It has been proposed that the disease severity rests on the inhibitory impact of mutations on M current density. Here, we have analyzed the phenotype of 7 patients carrying the p.A294V mutation located on the S6 segment of the Kv7.2 pore domain (Kv7.2^{A294V}). We investigated the functional and subcellular consequences of this mutation and compared it to another mutation (Kv7.2^{A294G}) associated with a benign epilepsy and affecting the same residue. We report that all the patients carrying the p.A294V mutation presented the clinical and EEG characteristics of EOEE. In CHO cells, the total expression of Kv7.2^{A294V} alone, assessed by western blotting, was only 20% compared to wild-type. No measurable current was recorded in CHO cells expressing Kv7.2^{A294V} channel alone. Although the total Kv7.2^{A294V} expression was rescued to wild-type levels in cells co-expressing the Kv7.3 subunit, the global current density was still reduced by 83% compared to wild-type heteromeric channel. In a configuration mimicking the patients' heterozygous genotype i.e., Kv7.2^{A294V}/Kv7.2/Kv7.3, the global current density was reduced by 30%. In contrast to Kv7.2^{A294V}, the current density of homomeric Kv7.2^{A294G} was not significantly changed compared to wild-type Kv7.2. However, the current density of Kv7.2^{A294G}/Kv7.2/Kv7.3 and Kv7.2^{A294G}/Kv7.3 channels were reduced by 30% and 50% respectively, compared to wild-type Kv7.2/Kv7.3. In neurons, the p.A294V mutation induced a mislocalization of heteromeric mutant channels to the somato-dendritic compartment, while the p.A294G mutation did not affect the localization of the heteromeric channels to the axon initial segment. We conclude that this

* Correspondence to: M. Milh, APHM, Hôpital d'Enfants de la Timone, Service de neurologie pédiatrique, rue St Pierre, 13005 Marseille, France.

** Correspondence to: L. Aniksztejn, INMED-INSERM U901, parc Scientifique de Luminy, 13273 Marseille cedex 09, France.

E-mail addresses: mathieu.milh@ap-hm.fr (M. Milh), laurent.aniksztejn@inserm.fr (L. Aniksztejn).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

position is a hotspot of mutation that can give rise to a severe or a benign epilepsy. The p.A294V mutation does not exert a dominant-negative effect on wild-type subunits but alters the preferential axonal targeting of heteromeric Kv7 channels. Our data suggest that the disease severity is not necessarily a consequence of a strong inhibition of M current and that additional mechanisms such as abnormal subcellular distribution of Kv7 channels could be determinant.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Kv7.2-5/*KCNQ2*-5 channels are slow activating and non-inactivating voltage-gated potassium channels expressed in several neuronal populations (Jentsch, 2000; Brown and Passmore, 2009). Each subunit consists of intracellular N and C terminal domains and 6 transmembrane segments forming a voltage-sensing (S1–S4) and a pore (S5–P–S6) domains. Functional channels are formed by the homomeric or heteromeric assemblies of 4 subunits including Kv7.2 and Kv7.3, the two principal subunits underlying M current in many neurons (Wang et al., 1998; Battefeld et al., 2014; but see also Soh et al., 2014). Recent reports indicate that Kv7.2/Kv7.3 channels are selectively localized at the axonal initial segments (AIS) and at nodes of Ranvier in central and peripheral nervous systems where they are co-clustered with Nav channels (Devaux et al., 2004; Pan et al., 2006; Rasmussen et al., 2007; Battefeld et al., 2014). At these positions, Kv7 channels play a crucial role in controlling neuronal excitability (Yue and Yaari, 2006; Hu et al., 2007; Shah et al., 2008; Battefeld et al., 2014; Soh et al., 2014).

Previously, mutations in *KCNQ2* have only been reported in benign familial neonatal seizures (BFNS) (Biervert et al., 1998; Singh et al., 1998; Charlier et al., 1998). More recently, *de novo* mutations in *KCNQ2* were described in a severe form of neonatal epilepsy (early onset epileptic encephalopathy, EOEE), characterized by an early neonatal onset (first week) of stormy motor seizures, without any structural abnormality (but see Dalen Meurs-van der Schoor et al., 2014) and with variable outcome (Weckhuysen et al., 2012; Kato et al., 2013; Milh et al., 2013; Allen et al., 2014). Indeed, despite relatively similar early clinical features, the prognosis of *KCNQ2*-related epilepsies is highly variable. To date, there appears to be a broad separation between mutations of *KCNQ2* causing severe versus benign epilepsies but exceptions do exist (Borgatti et al., 2004; Steinlein et al., 2007). It was therefore proposed that the clinical variability of the *KCNQ2*-related epilepsy could be related to the functional consequence of mutations on M

current and could thus be predictive of the neurological prognosis, a notion that was recently supported by two different studies (Miceli et al., 2013; Orhan et al., 2014).

Here, we investigated the early electro-clinical features and clinical evolution of 7 patients carrying a Kv7.2-p.A294V (Kv7.2^{A294V}) mutation located within the S6 pore domain and compared the functional consequences of this mutation to an inherited mutation associated with BFNS (Kv7.2^{A294G}, Steinlein et al., 2007). In those patients, the p.A294V mutation was always associated with severe forms of neonatal epilepsy. Both mutations had the same functional impact on M current, and modestly reduced the global current density by ~30% as measured in Chinese hamster ovary cells (CHO) in the configuration mimicking the situation found in patients. However, the p.A294V but not the p.A294G mutation induced a redistribution of Kv7 channels to the somato-dendritic compartment of neurons. Thus, our data indicate that the severity of the disease is not necessarily associated with strong inhibition of M current and we postulate that additional mechanisms such as abnormal subcellular distribution of Kv7 channels could be determinant.

Patients and methods

Patients

KCNQ2 screening was performed for diagnosis purpose at the “Département de Génétique Médicale” of the Timone Children’s Hospital in Marseille and in the Hôpital Femme-Mère-Enfant in Lyon. We received a total of 237 patient’s DNA having an early onset epileptic encephalopathy (EOEE, n = 208) or benign familial neonatal seizures (BFNS, n = 29). We found *KCNQ2* mutations in 46 patients; 23 presenting EOEE (see Fig. 1) and 23 presenting BFNS. Some of the EOEE and BFNS-related mutations have already been published (Milh et al., 2013; Soldovieri et al., 2014). We found 7 patients (5 in Marseille and 2 in Lyon) carrying the same mutation in the *KCNQ2* gene, c.881C>T/p.A294V (NM_172107.2), and presenting an EOEE (see the

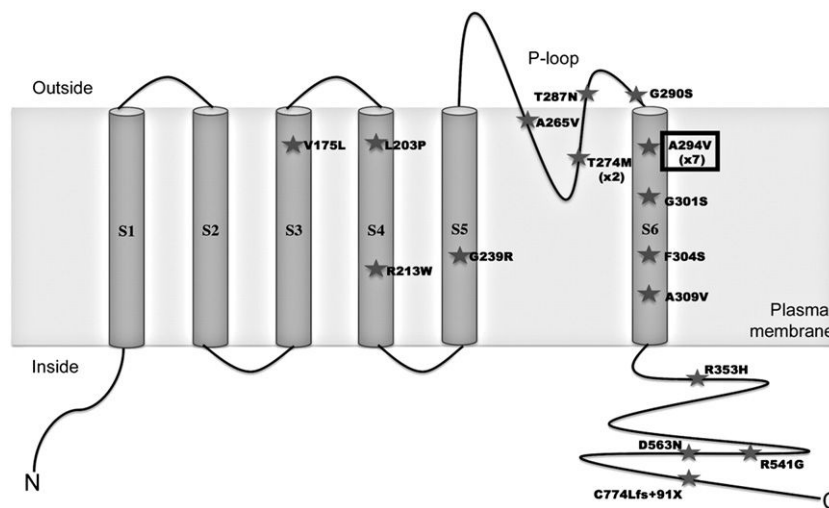


Fig. 1. Schematic presentation of the Kv7.2 subunit with the location of the different mutations associated with EOEE identified at the Timone Hospital in Marseille and in the Hôpital Femme-Mère-Enfant in Lyon. We analyzed the functional consequences and subcellular distribution of the Kv7.2 channel carrying the pore p.A294V mutation identified in 7 patients of our cohort.

Results section). The mutation p.A294V was never observed in the BFNS patient's DNA. All blood samples were obtained after receiving informed consent.

The pediatric neurologist ensuring the patients follow-up and the coordinator of the clinical study examined the phenotype of each patient, studied the retrospective clinical history and performed additional neurological examination. We paid a specific attention to epileptic seizures, MRI, development, evolution of head growth, age at seizure onset, type of seizure, electroencephalographic (EEG) aspects (suppression-burst, polymorph partial seizure), and antiepileptic drug response. This study was approved by local ethical committee (CPP Sud Méditerranée).

Molecular biology

Human cDNAs encoding Kv7.2 (# NM_172108.3) and Kv7.3 (# NM_004519.3) were subcloned into pcDNA3. We introduced the c.881C>T/p.Ala294Val and c.881C>G/p.Ala294Gly mutation (according to NM_172107.2) using the QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) and verified the presence of the mutation using Sanger sequencing.

The hKv7.2-V5, hKv7.2^{A294V}-V5 and hKv7.2^{A294G}-V5 plasmids were constructed using standard PCR techniques and subsequently cloned into the pcDNA3.1/V5-His-TOPO vector for expression in mammalian cells. The V5 tag was inserted at the C-terminus of Kv7.2 without linker as previously described (Wen and Levitan, 2002).

Antibodies

A 21 amino acid peptide sequence (AGDEERKVLAPGDVEQVTLA), corresponding to amino acids 36–57 from the N-terminal region of KCNQ3 was synthesized (Pan et al., 2006), conjugated to keyhole limpet hemocyanin, and two rabbits were immunized. The antisera were collected and purified against the peptide immunogen (Eurogentec, Seraing, Belgium). These antisera stained cells that were transfected with a cDNA encoding Kv7.3 but not Kv7.2 (data not shown). The rabbit antiserum against Kv7.2 was previously characterized (Lonigro and Devaux, 2009).

Cell culture and transfections

Chinese hamster ovary (CHO) cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ with a Gibco® F-12 Nutrient Mixture (Life Technologies) supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum) and 100 units/mL antibiotics/antimycotics (Life Technologies).

These cells were transfected using the Neon® Transfection System (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 100 000 cells in suspension were transfected with a total amount of 1 µg of DNA containing a reporter plasmid with the RFP gene (1:5) and cDNA constructs as followed: Kv7.2 (1); Kv7.2^{A294V} (1); Kv7.3 (1); Kv7.2 + Kv7.2^{A294V} (1:1); Kv7.2 + Kv7.3 (1:1); Kv7.3 + Kv7.2^{A294V} (1:1); Kv7.2 + Kv7.2^{A294V} + Kv7.3 (1:1:2); Kv7.2^{A294G} (1); Kv7.2 + Kv7.2^{A294G} (1:1); Kv7.3 + Kv7.2^{A294G} (1:1);

Table 1
Clinical features of patients carrying the Kv7.2-p.A294V mutation.

	HC at birth (cm)	Seizure onset (days)	Initial seizure type	Mode of beginning	Seizure offset: yes/no (age, treatment)	EEG: first week	Development at last evaluation (age of evaluation)
Patient 1	35	3	Tonic asymmetric: left or right head deviation, tonic extension of the four limbs	Stormy	Yes: 2 m, PHT	Suppression-burst until 3rd week. 3 weeks to 2 m: continuous traces, bilateral frontal and temporal spikes. >2 m: progressive decrease in spikes frequency. Normal sleep organization.	Unable to sit. Poor communication (1 y).
Patient 2 (Milh et al., 2013, patient 6)	34.5	2	Left and right clonic jerks, facial cyanosis	Subtle	Yes: 3 m, ND	Suppression-burst.	Poor head control, unable to sit, no voluntary movement, no language (2 y).
Patient 3 (Milh et al., 2013, patient 7)	36	1	Tonic contractions of one or several limbs, cyanosis	Stormy	No: 7 m, epileptic spasms 2–9 y, seizure free >9 y, monthly GTC seizures	Suppression-burst.	Establishes eye contact. Strabismus. Unable to sit, no speech (11 y).
Patient 4 (Milh et al., 2013, patient 15)	29 (30 weeks GA at birth)	8	Myoclonic jerks, multiple seizures daily	Stormy	Yes: 3 m, VPA	Suppression-burst.	Unable to sit. Unable to walk. Uses a few words (2–3 words). Understands simple orders. Strabismus, nystagmus (3 y). NA
Patient 5	35	1	Prolonged dystonic posture (opisthotonos), then tonic asymmetric seizures. Paucisymptomatic seizures (EEG recordings only)	Stormy	Unknown, death at 6 weeks	Discontinuous, then suppression-burst until death.	
Patient 6	37	1	Tonic asymmetric and tonic-clonic	Stormy	Yes: 3 weeks, VPA	Slow background activity. Bilateral paroxysmal discharges. One tonic seizure.	Walk with aid. No language (16 m).
Patient 7	37	3	Tonic seizures	Stormy	Yes: 4 m, TPM + LVT	Suppression-burst. Bilateral paroxysmal discharges predominantly in the right fronto-temporal region.	Severe global delay harmonious. Unable to sit. Poor hand use (16 m).

EEG: electro-encephalogram; GA: gestational age; GTC: generalized tonic-clonic seizures; HC: head circumference; LVT: levetiracetam; m: months; NA: not available; ND: not determined; PHT: phenytoin; TPM: topiramate; VPA: valproic acid; y: year.

Table 2

Major clinical features in patients with the p.A294V mutation.

Normal HC at birth	7/7
Seizure onset before day 4	6/7
Predominant initial seizure type: tonic asymmetric	5/7
Initial EEG: suppression-burst	6/7
Seizure withdrawal before 6 months	5/7 (1 death)
Developmental delay	7/7
Walk with aid	1/7
Normal HC at the end of the follow up	7/7

EEG: electro-encephalogram; HC: head circumference.

and $Kv7.2 + Kv7.2^{A294G} + Kv7.3$ (1:1:2). Electroporation configuration was: 1400 V, 1 pulse, 20 ms. Following electroporation, cells were cultured on pre-coated glass coverslips and maintained at 37 °C and 5% CO₂ with a complete medium for 2 days before recordings.

Electrophysiology

The electrophysiological analysis of each of the p.A294V and p.A294G mutant channels was performed on the same day than the analysis of the wild-type control channels (Kv7.2 and Kv7.2 + Kv7.3) with the same batch of CHO cells. Cells were perfused at 1–2 ml/min with a solution of the following composition (in mM): 135 NaCl, 3.5 KCl, 5 NaHCO₃, 0.5 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 1.5 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucose, and pH 7.3 adjusted with NaOH. Whole-cell patch-clamp recordings were performed with microelectrodes (borosilicate glass capillaries GC 150F-15, Harvard apparatus) filled with a solution containing (in mM): 135 KCl, 0.1 CaCl₂, 1.1 EGTA, 10 HEPES, 3 Mg²⁺+ATP, 0.3 Na⁺GTP, 4 phosphocreatinine, pH 7.3 adjusted with KOH and a resistance of 4–6 MΩ. Data were sampled at 10 kHz and filtered with a cut-off frequency of 3 kHz using an EPC-9 amplifier (HEKA Elektronik). Cell capacitance was determined with the whole cell capacitance compensation circuit of the EPC-9 amplifier. Overall, the mean value

was 31.6 ± 1.72 pF (n = 242 cells). Voltage steps of 10 mV increment during 2 s from holding potential of –85 mV (or –105 mV in retigabine experiments) and up to +45 mV followed by a pulse to –65 mV for 1 s were applied to the cells in order to analyze the conductance–voltage (G–V) relationships and the kinetics of activation and deactivation of the channels. G values were obtained from peak amplitudes of the slow outward current divided by the driving force for K⁺ ions with $E_K \sim -93$ mV, a value close to that measured in our electrophysiological recordings (see Fig. 4D) and normalized to the maximal conductance. Plotted points were fitted with a Boltzmann function: $G/G_{max} = 1 / [1 + \exp((V_{1/2} - V_m) / k)]$ to yield the voltage for half-maximum activation ($V_{1/2}$) and the slope factor (k) values. To measure the channel kinetics, current traces were fitted with a single or a double exponential function of the following form: $y = A_{fast} \exp(\tau / \tau_{fast}) + A_{slow} \exp(\tau / \tau_{slow})$ (where A_{fast} and A_{slow} are the fractions of the fast and slow component of the current and τ_{fast} and τ_{slow} are the respective fast and slow time constant). The time constant representing the weighted average of the fast and slow components of current activation or deactivation was calculated with the following equation: $\tau = (\tau_{fast} A_{fast} + \tau_{slow} A_{slow}) / (A_{fast} + A_{slow})$. Currents were analyzed using Origin 8.0 software. Analyses were performed after offline leak current subtraction. Membrane potentials were corrected for liquid junction potential (~5 mV).

Western blotting

One million CHO cells were transfected with 5 μg of pcDNA3-Kv7.2 (Kv7.2), pcDNA3-Kv7.2-p.A294V (Kv7.2^{A294V}), pcDNA3-Kv7.2-p.A294G (Kv7.2^{A294G}) or pcDNA3-Kv7.3 (Kv7.3) plasmids using the jetPEI® transfection reagent (Polyplus-transfection™) in 6 wells plate, according to the manufacturer's instructions. Forty-eight hours post-transfection, cells were washed three times with cold phosphate-buffered saline (PBS), then lysed with a lysis buffer containing 1% Triton-X100, 140 mM NaCl, 20 mM Tris, 2 mM EDTA pH 7.4, protease

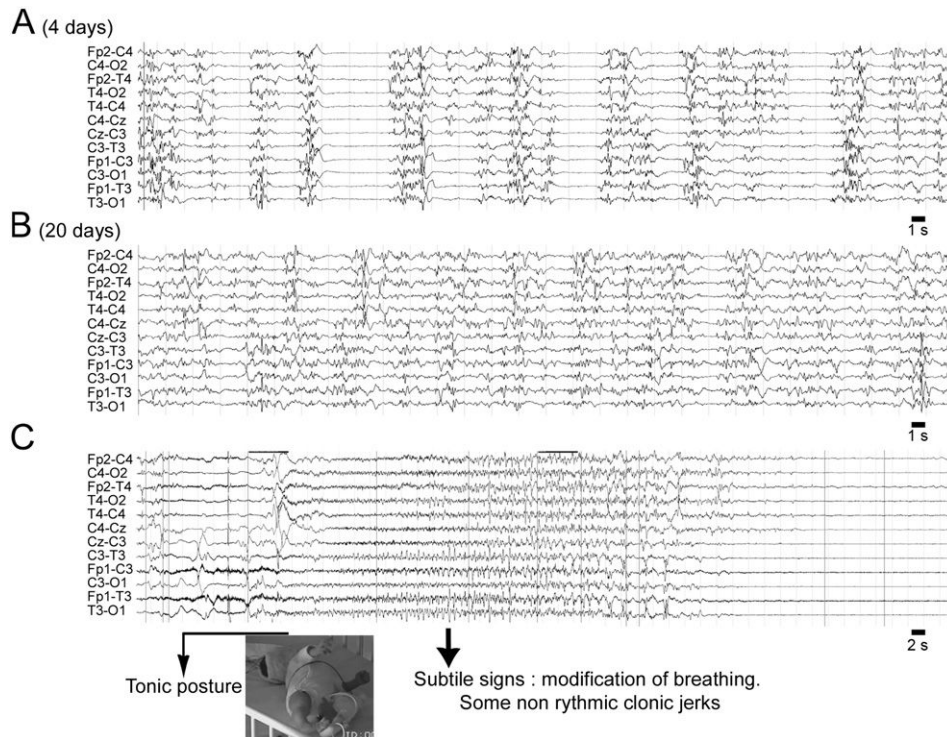


Fig. 2. Representative epileptic features during the neonatal period. A) First interictal EEG of patient 5 showing a suppression-burst pattern with bursts of activity that lasted longer than the silent periods, in average. The majority of the bursts was generalized to all the electrodes and was not associated with any movement. B) The interictal EEG tend to be more continuous, but still abnormal. C) Typical seizure recorded at day 5 (patient 5), with initial asymmetric tonic posture, while EEG shows generalized tonic discharge that seems to begin in the left hemisphere. Seizure was followed by a global flattening of the traces.

and phosphatase inhibitors (Pierce), for 30 min at 4 °C under agitation. Cells were then harvested and centrifuged at 13,000 g for 30 min. Denatured samples were loaded on a SDS-PAGE tris-glycine gel. After migration, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane. Blots were saturated for 1 h in 5% non-fat milk in Tris-buffered saline (TBS) + Tween 0.05% and incubated overnight with a rabbit antisera against Kv7.2 (1:2000; Lonigro and Devaux, 2009), a rabbit antisera against Kv7.3 (1:2000), or anti-actin antibodies (1/2000; Sigma-Aldrich, ref. A5060). We washed the membranes three times with TBS + tween 0.05% and incubated the membranes for 1 h with 1:10,000 HRP conjugated secondary antibodies. Blots were revealed with Luminata forte (Millipore) and visualized with a Bio-Rad XRS system.

Hippocampal cell culture

Primary hippocampal cell cultures were prepared as previously described (Liu and Devaux, 2014). Neurons were transfected using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) at 7 days in vitro (DIV) with V5-tagged Kv7.2 constructs together with hKv7.3 and pEGFP. For immunostaining, cells were fixed at DIV9 with 2% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature. Cells were washed three times in PBS, permeabilized with a solution containing 5% fish skin gelatin and

0.1% Triton X-100 in PBS for 30 min, then incubated for 1 h with rabbit antibodies against V5 (1:1000; V8137, Sigma-Aldrich) and mouse monoclonal antibodies against ankyrin-G (1:100; UC Davis/NINDS/NIMH NeuroMab Facility). The cells were then washed and revealed with the appropriate Alexa conjugated secondary antibodies (1:500; Jackson ImmunoResearch) for 30 min. After several washes in PBS, cells were stained with DAPI, and mounted with Mowiol plus 4% DABCO (Sigma-Aldrich). Confocal image acquisition was performed on a Zeiss LSM780 laser scanning microscope equipped with a 63× (1.4 n.a.) oil immersion lens. Measurements were made on gray-scale confocal sections (8-bit) using ImageJ version 1.43u software (National Institutes of Health). Using the images of ankyrin-G staining, 20–30 μm long segments (“freehand” selection) were traced along the AIS then transferred to the images of V5 labeling for intensity measurements. Using GFP staining, regions of interest were manually selected in the middle of the soma (50 μm² square selection) or along proximal dendrites (20–30 μm long “freehand” selection) and were reported on the V5 staining for intensity measurements at soma and dendrites, respectively. Black pixels were eliminated (fluorescence = 0), and the mean pixel intensity per unit area was measured for each AIS, soma, and dendrite. Fluorescence ratios were calculated in 29 to 36 neurons for each construct. Digital images were processed into figures with Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.).

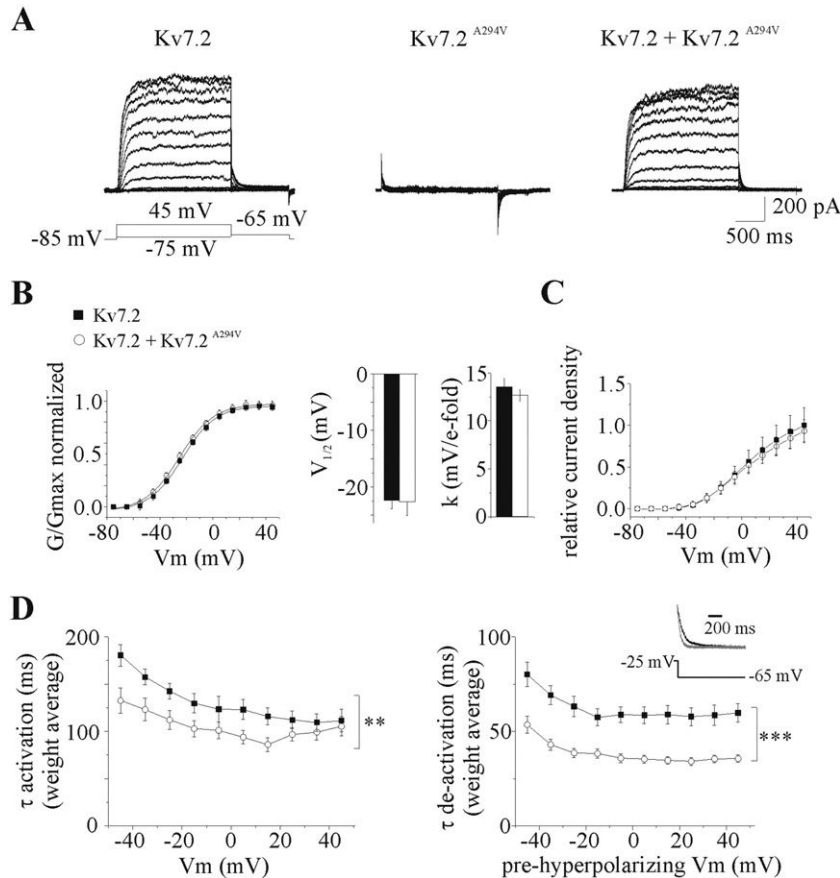


Fig. 3. Functional consequences of the pore p.A294V mutation on homomeric Kv7.2 channels. **A**) Current responses to 10 mV incremental depolarizing voltage step-command from -85 mV to +45 mV for 2 s followed by a 1 s hyperpolarizing voltage step to -65 mV in CHO cells transfected with wild-type Kv7.2 (left), Kv7.2^{A294V} (middle), and both Kv7.2^{A294V}/Kv7.2 (right). **B**) Conductance-voltage relationship of homomeric Kv7.2 channels (black square, n = 11 cells) and Kv7.2^{A294V}/Kv7.2 channels (open circle, n = 11 cells) each normalized to their maximal conductance. Continuous lines represent Boltzmann fits to the experimental data. Histograms show the average of V_{1/2} and slope factor (k) of homomeric Kv7.2 and Kv7.2^{A294V}/Kv7.2 channels calculated from 20 and 22 series of depolarizing voltage steps respectively. **C**) Relative current density measured at all voltage steps and showing that the mutation does not exert a dominant-negative effect. All values were normalized to the mean current density measured at 45 mV in CHO expressing the wild-type Kv7.2 subunit. **D**) Channel kinetics. Left: Weight average time constant of current activation measured at membrane potential (Vm) indicated in the abscissa. Homomeric Kv7.2 channels (wild-type or associated with the pore mutation) displayed a single exponential activation kinetic. Right: Weight average time constant of current deactivation of both channels. Vm indicated in the abscissa are values reached by the depolarizing voltage steps before the hyperpolarization to -65 mV. Superimposed traces in the inset are from (A) and represent tail currents after a step from -25 to -65 mV. They are scaled to show that the deactivation of the current in CHO expressing Kv7.2^{A294V}/Kv7.2 subunits (gray) is faster than that of wild-type Kv7.2 (black).

Statistical analysis

Data are represented as means \pm s.e.m. When the data's distribution was normal, we used a Student's *t*-test to compare means of two groups or the one-way ANOVA followed by Bonferroni test as mentioned. When the normality test failed, we used the non-parametric Mann–Whitney test for two independent samples. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism software. ns: not significant; **p* < 0.05; ***p* < 0.01; and ****p* < 0.001.

Results

The p.A294V mutation is associated with a severe clinical phenotype

Clinical and epileptic features of the patients are summarized in Tables 1 and 2. *KCNQ2* mutations were found *de novo*, except for two patients (1 and 6) who inherited the mutation from one mosaic parent. Clinical presentation at onset was notably stereotyped, with an initial stormy phase of epileptic seizures, mostly consisting of tonic asymmetric seizures beginning during the first days of life, and with a

suppression-burst pattern on the interictal EEG (6/7 patients, Fig. 2). Epileptic activity stopped between 3 and 25 weeks of age in five patients, one patient died at 6 weeks (sudden unexpected death in epilepsy, SUDEP) and one patient was still epileptic at 12 years of age (Tables 1 and 2). Cessation of epilepsy was consecutive to sodium valproate administration in two patients, levetiracetam in one patient and phenytoin in one patient. Despite rapid offset of epilepsy in all patients but one, they all evolved to a severe phenotype. Only one patient was able to walk before 2 years of age but none of them acquired functional language. Overall, the phenotype associated with the recurrent *Kv7.2*^{A294V} mutation in our patient series was never benign and consisted mostly in an EOEE with a suppression-burst EEG pattern and poor developmental progression.

The p.A294V mutation has no dominant-negative effect on heteromeric *Kv7.2/Kv7.3* channels

In a first set of experiments, CHO cells were transfected with plasmids expressing the wild-type *Kv7.2* subunit to study homomeric *Kv7.2* channels. Application of depolarizing voltage steps activated

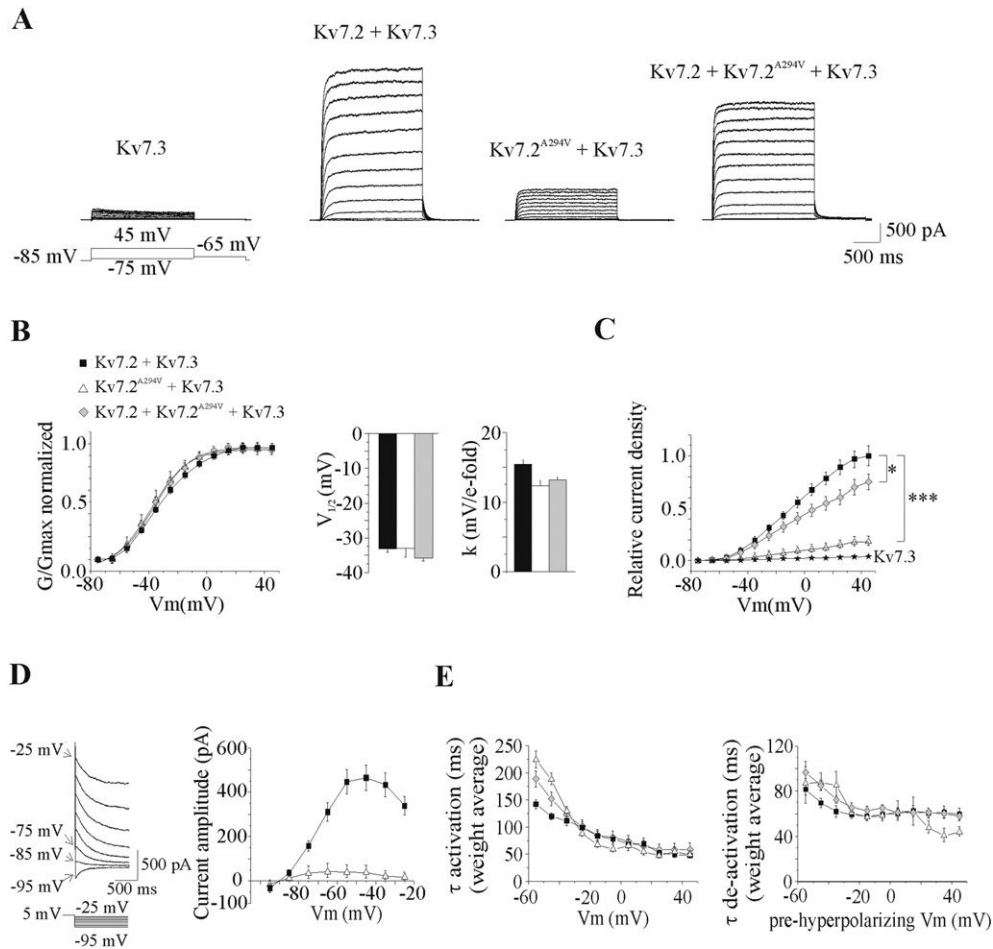


Fig. 4. Functional consequences of the pore p.A294V mutation on heteromeric channels. A) Representative current responses to depolarizing voltage steps observed in CHO cells transfected with *Kv7.3* only; wild-type *Kv7.2* + *Kv7.3* (ratio 1:1); *Kv7.2*^{A294V} + *Kv7.3* (ratio 1:1); *Kv7.2*^{A294V} + *Kv7.2* + *Kv7.3* (ratio 1:1:2) plasmids. B) Conductance–voltage relationships of wild-type heteromeric (black square, *n* = 25 cells), mutant heteromeric (open triangle, *n* = 14 cells) and mutant + wild-type heteromeric channels (gray diamond, *n* = 31 cells) normalized as in Fig. 2B. Averaged $V_{1/2}$ and *k* values are calculated from 42, 25 and 56 series of depolarizing voltage steps in the 3 conditions respectively. C) Relative current density measured in CHO cells transfected with the *Kv7.3* (stars, *n* = 5) and with the different associations of *Kv7.2* subunits. All values are normalized to the mean current density measured at +45 mV in CHO expressing the wild-type *Kv7.2/Kv7.3* subunits. The slope of each graph was calculated after linear fit of data from –45 to +45 mV. The values are 0.0106, 0.0019 and 0.0075 for cells transfected with wild-type *Kv7.2/Kv7.3*, *Kv7.2*^{A294V}/*Kv7.3* and *Kv7.2*^{A294V}/*Kv7.2/Kv7.3* plasmids respectively. Thus, this pore mutation reduces by 83% and 30% *M* current density for the two last associations. D) Tail currents observed after a 1 s hyperpolarizing voltage step command from +5 mV to membrane potentials ranging from –25 mV to –95 mV. The amplitude of the currents were measured in cells expressing heteromeric wild-type subunits (black square) and *Kv7.2*^{A294V}/*Kv7.3* subunits (open triangle) and plotted in the graph (left). Currents in both configurations reverse polarity at \sim –90 mV, a value closed to the reversal potential calculated by Nernst equation. E) Channel kinetics. Weight average time constant of current activation (left) and deactivation (right). The mutation does not significantly impact the activation and deactivation processes (ANOVA followed by Bonferroni's test with multiple comparisons).

outward currents (Fig. 3A). Homomeric channels displayed a single exponential activation kinetic for currents evoked by depolarizing steps up to -10 mV and a double exponential for currents evoked by steps above -10 mV which accounted for 10–15% of the current activation process. Consistent with other studies (Maljevic et al., 2008; Orhan et al., 2014), the activation kinetic was voltage sensitive with time constant decreasing with the depolarization (Fig. 3D). Cell hyperpolarization to -65 mV leads to current deactivation which displayed a single exponential kinetic whatever the pre-hyperpolarizing membrane potential value (Fig. 3D). Full abolition of the current by XE-991 ($10 \mu\text{M}$, $n = 3/3$ cells, data not shown) confirmed the M current identity. Then, CHO cells were transfected either with Kv7.2^{A294V} expressing plasmid alone or with the Kv7.2^{A294V} and Kv7.2 subunits expressing plasmids in a 1:1 ratio. We did not observe any currents in cells transfected with the mutant subunit only ($n = 8/8$ cells, Fig. 3A). In contrast, in Kv7.2 + Kv7.2^{A294V} expressing cells, depolarizing voltage steps produced currents with a similar global density compared to those generated in homomeric Kv7.2 expressing CHO cells (Figs. 3A to C) but the kinetics of activation and deactivation were significantly faster for Kv7.2^{A294V}/Kv7.2 channels ($p < 0.01$ and $p < 0.0001$ respectively, Mann–Whitney test, Fig. 3D). These data indicated that Kv7.2^{A294V} does not exert a dominant-negative effect on wild-type Kv7.2. The Kv7.2^{A294V}/Kv7.2 association leads to the formation of a functional channel with significantly faster kinetics.

In a second series of experiments, we analyzed the functional impact of the Kv7.2^{A294V} subunit on heteromeric channels. Compared to homomeric Kv7.2 channels, the current density was ~ 4 times larger (176.5 ± 11.1 pA/pF, $n = 45$ cells and 43.4 ± 4.1 pA/pF, $n = 30$ cells measured at $+45$ mV for Kv7.2/Kv7.3 and Kv7.2 channels respectively) and the conductance–voltage relationship was shifted by ~ 10 mV to the left in cells expressing wild-type heteromeric Kv7.2/Kv7.3 channels (Figs. 3B, 4B, 5B, 6B). These effects are close to those already reported in CHO cells by Tagliatalata's group (Soldovieri et al., 2006; Miceli et al., 2013). Moreover, heteromeric channels displayed a double

exponential deactivation kinetic with a slow time constant contributing to 20–25% of the current deactivation process. The co-transfection of Kv7.2^{A294V} with Kv7.3 in a 1:1 ratio generated currents reduced by $\sim 83\%$ compared to Kv7.2/Kv7.3 channels (ratio of the slope after linear fit of the data from -45 mV to $+45$ mV in the 2 configurations, $n = 14$ and 25 cells respectively, Figs. 4A to C). To ensure that co-transfection of Kv7.2^{A294V} and Kv7.3 leads to the formation of a functional heteromeric channel, we compared the current density measured at $+45$ mV in CHO cells transfected with Kv7.3 only versus Kv7.2^{A294V}/Kv7.3 subunits. We found a significant difference in the current density confirming the existence of a functional heteromeric channel (Kv7.3: 5.9 ± 1.1 pA/pF, $n = 5$ cells; Kv7.2^{A294V}/Kv7.3: 25.9 ± 2.3 pA/pF, $n = 14$ cells, $p < 0.0001$, Student's *t*-test, Figs. 4A, C). The conductance–voltage relationship, the activation and deactivation kinetics and the current reversal potential were not altered compared to Kv7.2/Kv7.3 channels (Figs. 4D, E). We then examined the impact of the Kv7.2^{A294V} subunit when co-expressed with Kv7.2 and Kv7.3 subunits in a 1:1:2 ratio ($n = 31$ cells), a ratio that is theoretically observed in patients. The current density produced in such a configuration was reduced by $\sim 30\%$ compared to Kv7.2/Kv7.3 channels, confirming that Kv7.2^{A294V} mutant does not exert a dominant-negative effect (Fig. 4C). As expected, there were no significant consequences on the conductance–voltage relationship and on channel kinetics (Figs. 4B, E).

Retigabine has similar enhancing action on wild-type and mutant channels

We then examined retigabine effect on heteromeric mutant channels. Retigabine has been marketed as an anti-epileptic drug for the treatment of resistant partial onset seizures and has been shown to enhance M current via its interaction with several specific residues located in S5 and S6 segments (Xiong et al., 2008; Lange et al., 2009; Orhan et al., 2014; Maljevic and Lerche, 2014). We wondered if the potentiating action of retigabine was affected by the p.A294V mutation. We used the same experimental procedure as above but depolarizing

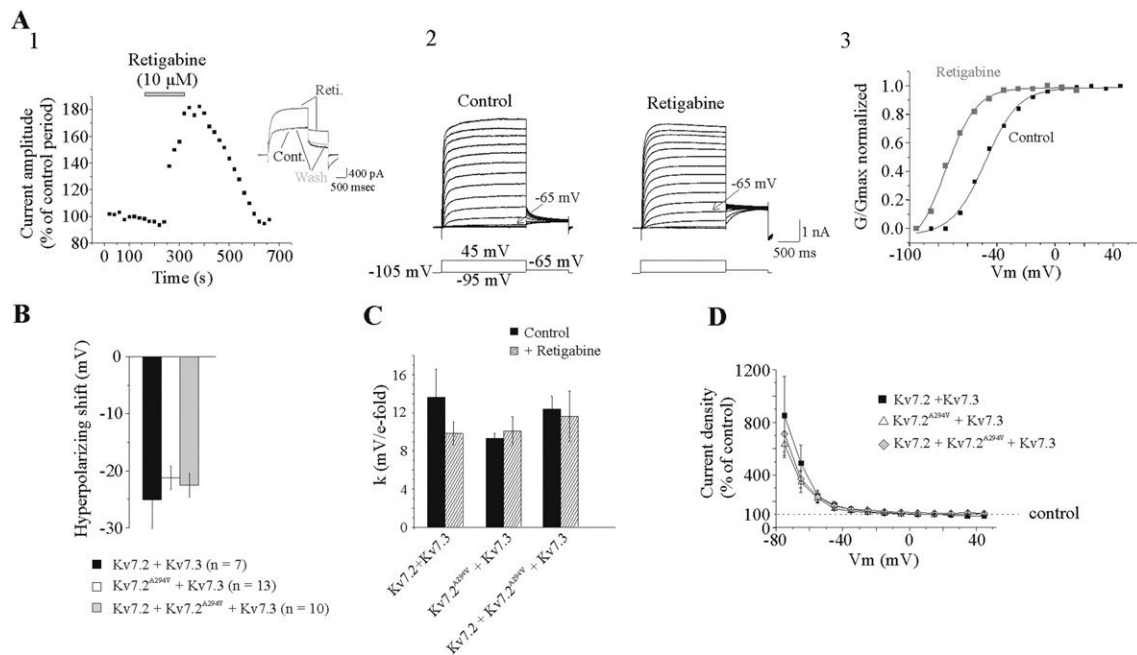


Fig. 5. The enhancing effect of retigabine on M current is not affected by the p.A294V mutation. A1) Representative experiment showing the time course of the effect of retigabine ($10 \mu\text{M}$) on heteromeric wild-type channels Kv7.2/Kv7.3. The current is evoked every 20 s by a constant depolarizing voltage step command from -105 mV to -45 mV. Inset depicted currents evoked just before bath application of retigabine, at the end of drug application, and after retigabine washout. Leak current have not been subtracted. A2) Current responses to incremental depolarizing voltage steps command from -105 mV to -45 mV performed in the same cell before the application of retigabine (control) and before the washout of the drug (retigabine). A3) Corresponding conductance–voltage relationships, each normalized to their maximal conductance. B–C) Summary of the effect of retigabine on the hyperpolarizing shift of channels G–V relationships (B, ANOVA followed by Bonferroni's test with multiple comparisons) and slope factor (C, Student's *t*-test, control vs retigabine) resulting from the association of subunits indicated below the histograms. D) Summary of retigabine effect on current density expressed as percentage of control (period preceding the application of the drug for each cells). The mutation does not impair the voltage sensitive enhancing action of retigabine.

voltage steps were applied from a holding membrane potential of -105 mV. Fig. 5A shows the typical effect of retigabine in a cell expressing heteromeric wild-type channels. Bath application of retigabine ($10 \mu\text{M}$) rapidly and reversibly enhanced M current amplitude in a voltage sensitive manner as shown previously (Xiong et al., 2008). Retigabine also produced a $25 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$ hyperpolarizing shift of $V_{1/2}$ with no significant change in the slope factor (Figs. 5B to D). Similar effects of retigabine were observed in CHO cells expressing heteromeric mutant channels, including the hyperpolarizing shift of $V_{1/2}$ and the voltage dependent increase in current density. Thus, the potentiating effect of retigabine was maintained on mutated heteromeric channel and indicated that Ala-294 residue in the segment S6 is not crucial for the binding of retigabine.

The p.A294G mutation reduces global current density of the heteromeric channels to the same extent as the p.A294V mutation

In order to determine whether these alterations were specific to EOOE mutations, we then performed the same types of experiments for the $\text{Kv7.2}^{\text{A294G}}$, a mutation associated with BFNS and affecting the same residue. As shown in Fig. 6, this mutation did not have any significant consequences on M current characteristics ($V_{1/2}$, k factor, current density and kinetics) in CHO cells expressing the homomeric mutant channels ($n = 17$ cells) or expressing the $\text{Kv7.2}^{\text{A294G}}/\text{Kv7.2}$ subunits ($n = 16$ cells) compared to wild-type homomeric channels ($n = 19$ cells). In contrast, the p.A294G mutation affected the current in cells co-expressing the mutant subunit and Kv7.3 (Fig. 7). The global current

density of $\text{Kv7.2}^{\text{A294G}}/\text{Kv7.3}$ expressing cells was reduced by $\sim 50\%$ compared to those expressing heteromeric wild-type channels ($n = 19$ and 20 cells respectively, Fig. 7C). This was not accompanied by a change in the conductance–voltage relationship although there was a small reduction of the slope factor (Fig. 7B). The deactivation kinetic of the mutant channel was also slightly but significantly slower than that of the heteromeric wild-type channels whereas the activation kinetic was globally unchanged (Fig. 7D). The co-expression of the wild-type Kv7.2 subunit with $\text{Kv7.2}^{\text{A294G}}$ and Kv7.3 ($n = 20$ cells) led to channels with similar activation properties and deactivation kinetics than heteromeric wild-type channels. However, the global current density was only partially restored and still remained $\sim 30\%$ less than that of $\text{Kv7.2}/\text{Kv7.3}$ expressing cells. Therefore the p.A294G mutation reduces the global current density to the same extent than the p.A294V mutation in the configuration that mimics the situation in patients.

Mutation of Ala294 affects the expression level of homomeric but not heteromeric mutant channels in CHO cells

We next analyzed the impact of the Ala294 residue mutation on protein expression in CHO cells by western blot analysis. First, we measured the total amount of Kv7.2 proteins and compared the amount of wild-type versus p.A294V mutated subunits (Figs. 8A, B). We found that total $\text{Kv7.2}^{\text{A294V}}$ expression level was reduced by $\sim 80\%$ compared to that of Kv7.2 ; this decrease was fully rescued by co-expression with Kv7.3 . We then performed the same experiments after co-transfection of $\text{Kv7.2}^{\text{A294G}}$ in CHO cells. As for $\text{Kv7.2}^{\text{A294V}}$, the p.A294G mutation

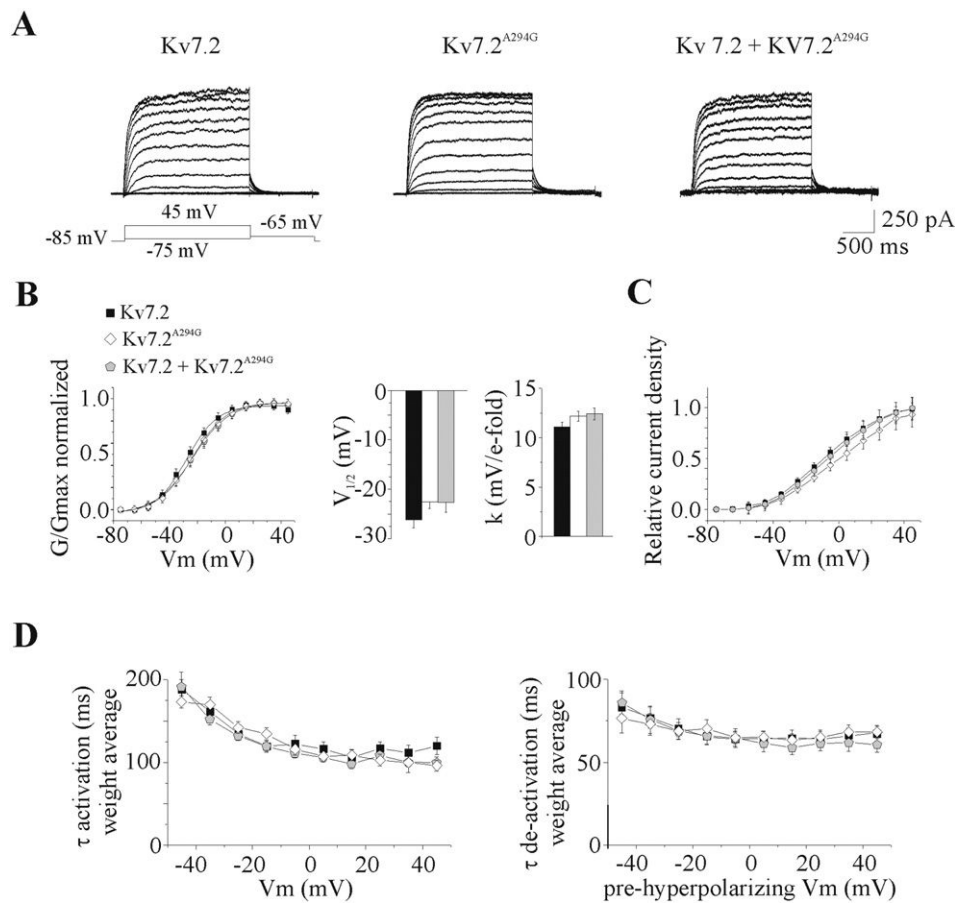


Fig. 6. Functional consequences of the pore p.A294G mutation on homomeric Kv7.2 channels. A) Representative current responses to depolarizing voltage steps observed in CHO cells transfected with wild-type Kv7.2 (left), $\text{Kv7.2}^{\text{A294G}}$ (middle); $\text{Kv7.2} + \text{Kv7.2}^{\text{A294G}}$ (ratio 1:1 right) plasmids. B) Conductance–voltage relationships of wild-type homomeric (black square, $n = 19$ cells), mutant heteromeric (open diamond, $n = 17$ cells) and mutant + wild-type heteromeric channels (gray pentagon, $n = 16$ cells) normalized as in Fig. 3B. Averaged $V_{1/2}$ and k values are calculated from 35, 34 and 31 series of depolarizing voltage steps in the three conditions respectively. C) Relative current density measured in CHO cells transfected in the three different conditions. Values are normalized as in Fig. 3C. D) Weight average time constant of current activation (left) and deactivation (right).

affected channel expression, albeit to a much lower level than p.A294V (40% of wild-type expression). Again, the Kv7.3 subunit was able to restore the total Kv7.2^{A294G} expression to wild-type levels (Figs. 8C, D). This suggests that the assembly of both mutant subunits with Kv7.3 prevents the degradation of the mutated protein and that conservation of the Ala294 residue is important for the stability of the Kv7.2 subunit.

The p.A294V but not the p.A294G mutation induced a redistribution of Kv7 channels to the somato-dendritic compartment

After the consequence analyses of the p.A294V and p.A294G mutations on Kv7 channel properties and expression in CHO cells, we went on to test whether this mutation could affect the distribution of Kv7 channels in hippocampal neurons. For this purpose, cultured hippocampal neurons were transfected at DIV7 with V5-tagged Kv7.2 constructs in combination with Kv7.3 and GFP to assess neuronal morphology. Neurons were then immunostained 48 h later for V5 and for ankyrin-G to label the AIS (Fig. 9A). As previously described, wild-type Kv7.2/Kv7.3 heteromers were concentrated at the AIS and co-localized with ankyrin-G (Devaux et al., 2004; Chung et al., 2006; Pan et al.,

2006; Rasmussen et al., 2007; Liu and Devaux, 2014; Cavaretta et al., 2014). By contrast, the co-expression of the Kv7.2^{A294V} with Kv7.3 or with wild-type Kv7.2/Kv7.3 strongly affected the distribution of the heteromeric channels in neurons and resulted in the loss of the axonal regionalization of Kv7 subunits (Figs. 9B to C). In order to quantify these alterations, we measured the mean fluorescence intensity of V5 staining at the AIS and compared it with the dendrites and soma (Fig. 9F). This demonstrated that the density not only of mutant Kv7.2 channels, but also that of wild-type and mutant Kv7.2 channels, was significantly decreased at the AIS. The mutant heteromers were instead mostly detected in the somato-dendritic compartment leading to a strong and significant decrease in the AIS/dendrite and AIS/soma ratios of fluorescence for Kv7.2^{A294V}/Kv7.3 (~60% decrease; V5-tagged Kv7.2^{A294V}) and Kv7.2^{A294V}/Kv7.2/Kv7.3 (~48% decrease; V5-tagged Kv7.2) compared to Kv7.2/Kv7.3 (V5-tagged Kv7.2) (Fig. 9F). Interestingly, these diminutions were not significantly different from each other. In contrast, the distribution of Kv7 channels carrying the p.A294G mutation was similar to that of wild-type channels with a strong concentration of the Kv7.2^{A294G}/Kv7.3 or Kv7.2^{A294G}/Kv7.2/Kv7.3 at the AIS (Figs. 9D–E) and no alterations of the AIS/dendrite or AIS/soma ratios (Fig. 9F).

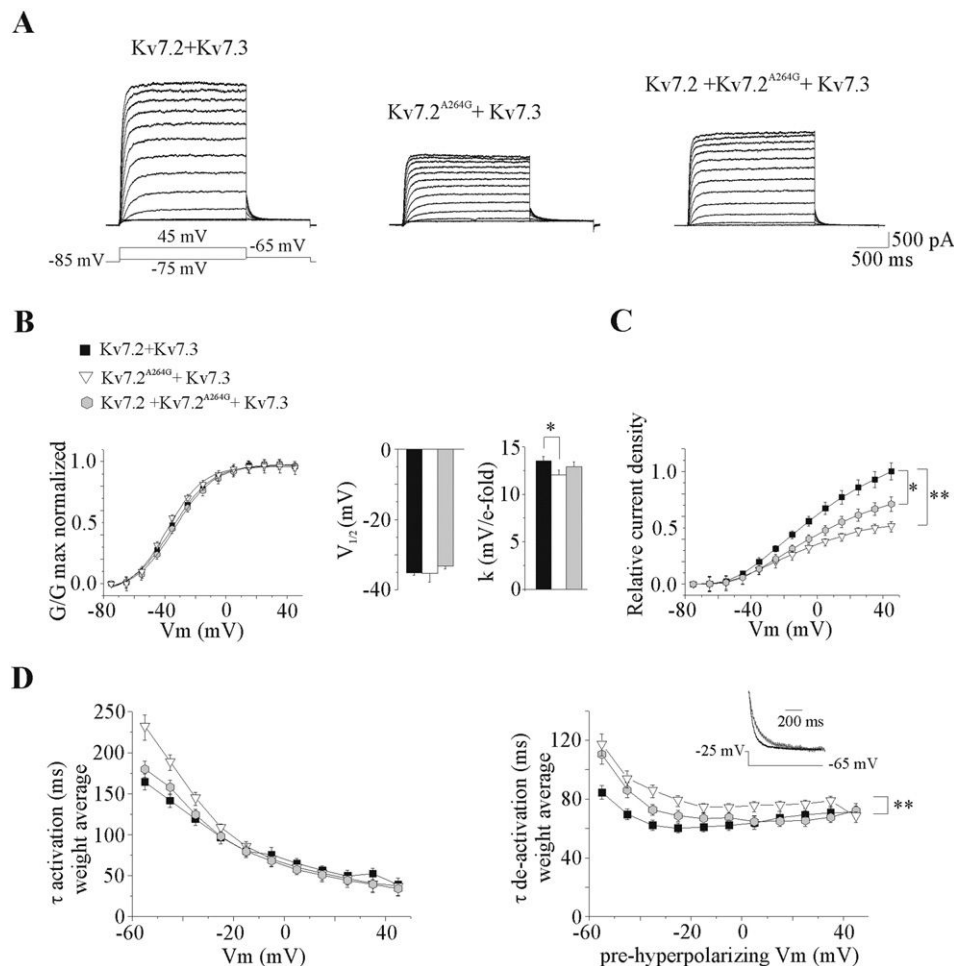


Fig. 7. Functional consequences of the pore p.A294G mutation on heteromeric channels. A) Representative current responses to depolarizing voltage steps observed in CHO cells transfected with wild-type Kv7.2 + Kv7.3 (ratio 1:1, left); Kv7.2^{A294G} + Kv7.3 (ratio 1:1, middle); Kv7.2 + Kv7.2^{A294G} + Kv7.3 (ratio 1:1:2, right) plasmids. B) Conductance–voltage relationships of wild-type heteromeric (black square, n = 19 cells), mutant heteromeric (white triangle, n = 20 cells) and mutant + wild-type heteromeric channels (gray hexagon, n = 20 cells). Averaged V_{1/2} and k values are calculated from 38, 37 and 40 series of depolarizing voltage steps in the three conditions respectively. C) Relative current density measured in CHO cells transfected with the three different associations of plasmids. Values are normalized as in Fig. 3C. The slope of each graph was calculated after linear fit of data from –45 to +45 mV. The values are 0.0103, 0.0051 and 0.0074 for cells transfected with wild-type Kv7.2/Kv7.3, Kv7.2^{A294G}/Kv7.3 and Kv7.2^{A294G}/Kv7.2/Kv7.3 plasmids respectively. This pore mutation reduces by 50% and 29% M current density for the two last associations. D) Weight average time constant of current activation (left) and deactivation (right). Superimposed traces in the inset are from (A) and represent tail currents after a step from –25 to –65 mV. They are scaled to show that the deactivation of the currents in CHO expressing Kv7.2^{A294G}/Kv7.3 subunits (gray) are slower than that of wild-type Kv7.2/Kv7.3 (black).

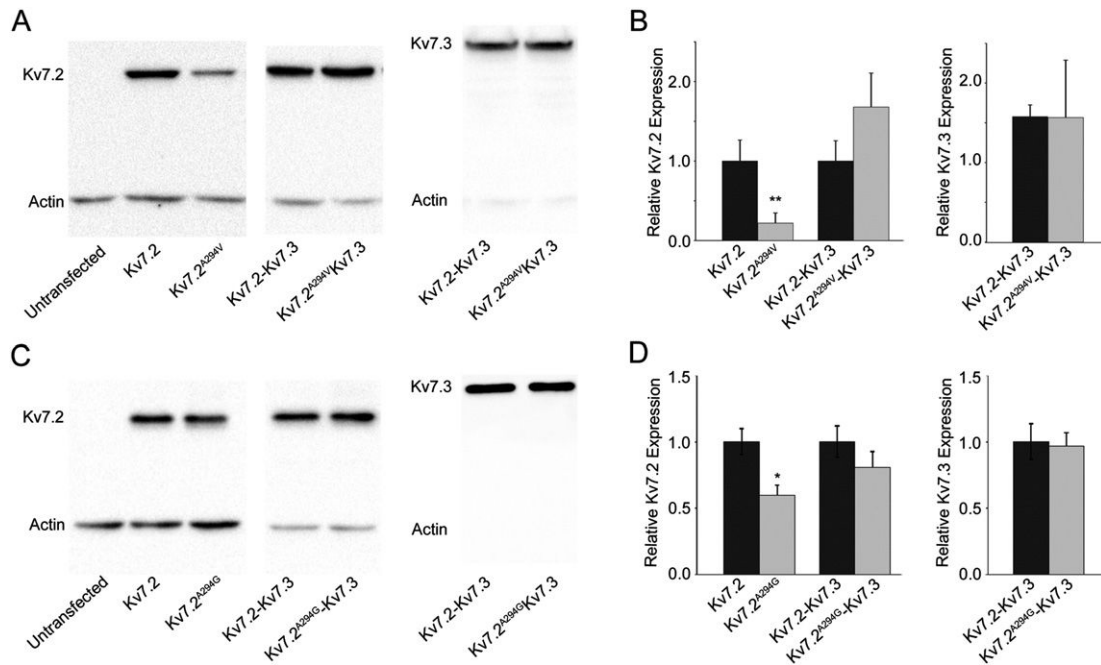


Fig. 8. The two pore p.A294V and p.A294G mutations affect the expression of homomeric but not of heteromeric mutant channels in CHO cells. We performed western blot analysis by revealing Kv7.2 (92 kDa), Kv7.3 (96 kDa) or actin (42 kDa), as loading control (A, left and middle) western blot analysis of total input of untransfected, transfected CHO cells with Kv7.2 or Kv7.2^{A294V}, with Kv7.2/Kv7.3 or Kv7.2^{A294V}/Kv7.3 revealed with a Kv7.2 antibody. (A, right) Same blot as middle treated with stripping buffer and re-probed with the Kv7.3 antibody only. Note that Kv7.3 prevents Kv7.2^{A294V} degradation. (B) Total protein expression was analyzed by normalizing total Kv7.2 to the corresponding actin signal. We performed 6 and 7 independent experiments for homo and heteromeric channels respectively (Mann–Whitney test). (C–D) Comparison of Kv7.2^{A294G} subunit expression as in A and B. For this mutation, we performed 5 and 4 independent experiments for homomeric and heteromeric channels respectively (Mann–Whitney test).

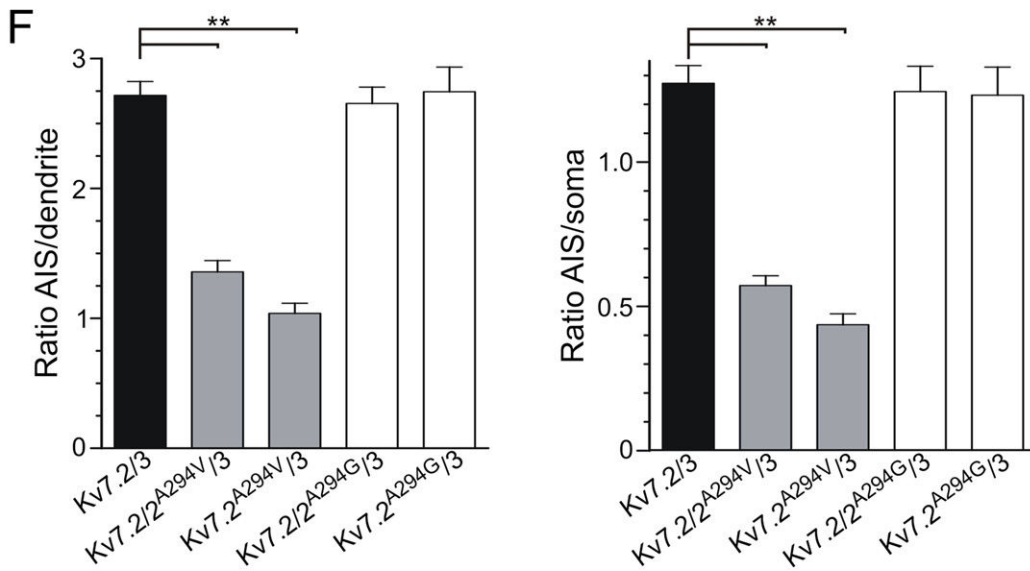
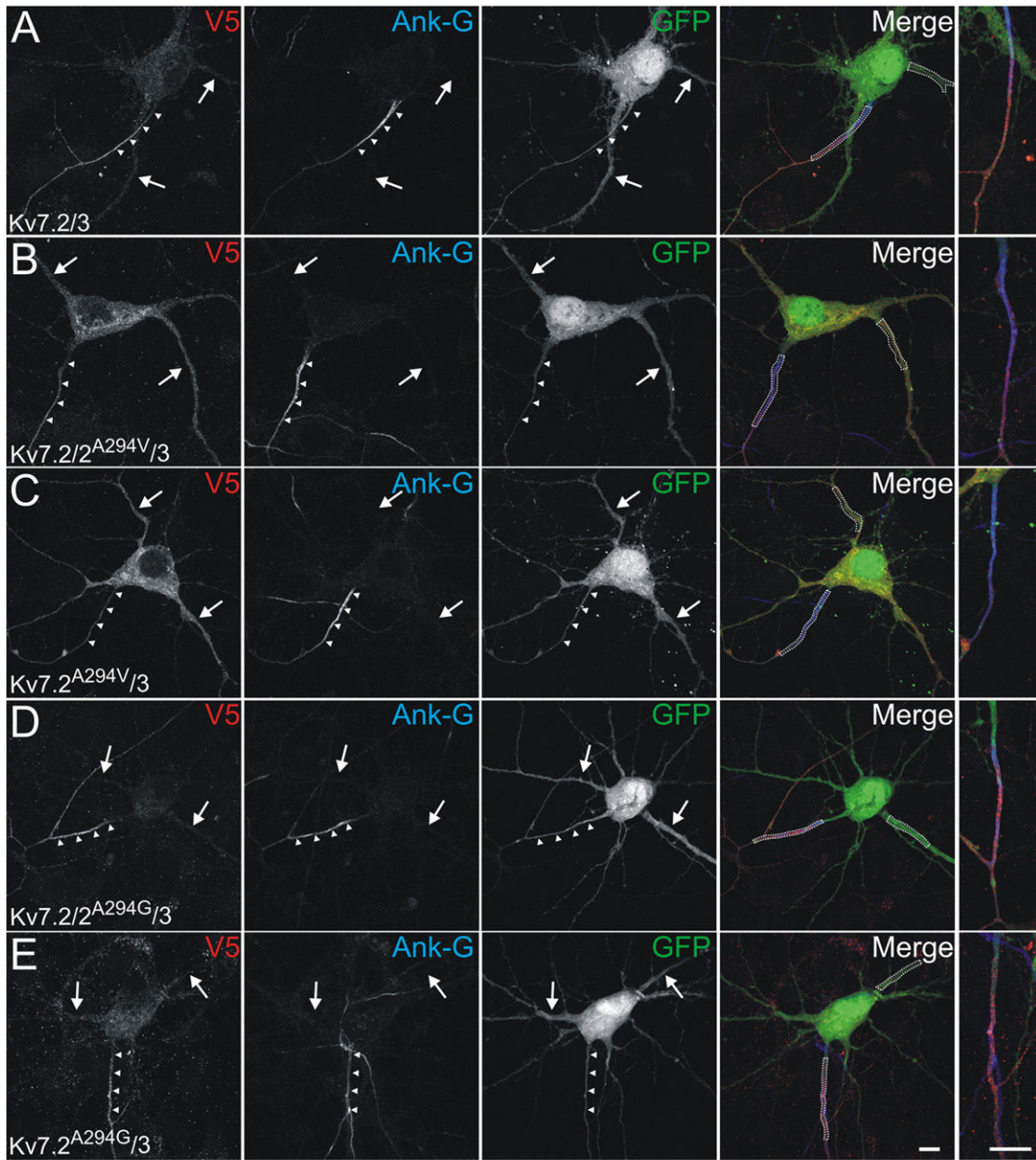
Discussion

Mutations in *KCNQ2* lead to neonatal epilepsies that have drastically different prognoses, ranging from benign (BFNS) to severe (EOEE) evolutions in children with *KCNQ2*-related epilepsy. With rare exceptions (Borgatti et al., 2004; Steinlein et al., 2007), most of the *KCNQ2* mutations associated with BFNS are, to date, distinct from those found in EOEE. Therefore, the variability of *KCNQ2*-related epileptic phenotypes could be a direct consequence of the functional alterations in the M-current, which then would be predictive of the patients' neurological evolution. Here, we studied the recurrent p.A294V mutation located in the S6 segment of the protein that we identified in 7 patients; we compared its functional consequences with those of the p.A294G mutation, an inherited mutation associated with BFNS (Steinlein et al., 2007). First, the electro-clinical features and clinical evolution of the patients carrying the mutation p.A294V were characteristic of an EOEE. Although we found some degree of variability in the neurological evolution, all patients described here had a severe encephalopathy with intellectual disabilities and/or motor impairments. A similar phenotype was associated with the same mutation in three previously reported patients (Kato et al., 2013; Allen et al., 2014). Thus, p.A294V is a frequent mutation that gives rise to a severe form of neonatal epilepsy, mostly associated with an initial suppression-burst pattern of the EEG, profound motor and cognitive impairment despite the short course of epilepsy.

Second, we observed that the mutation of the Ala294 residue has functional consequences on Kv7 channels. No currents were detected in cells expressing the Kv7.2^{A294V} subunit only and the current amplitude was reduced when this mutant or the Kv7.2^{A294G} subunit was co-expressed with wild-type Kv7.3 or Kv7.2/Kv7.3 subunits. Given the important role played by M current not only in controlling cortical network activities in adult but also in the developing brain (Peters et al., 2005; Safulina et al., 2008), it is likely that the reduction of current density may be one important cause in both diseases. However, M current density was similarly reduced by 30%, when each mutant was co-expressed with Kv7.2/Kv7.3 subunits in a 1:1:2 ratio, supposed

to replicate the expression ratio existing in patients. This reduction amplitude is close to that reported for most of *KCNQ2*-related BFNS mutations (~25–30%, Maljevic et al., 2008; Maljevic and Lerche, 2014; Soldovieri et al., 2014) and that observed with the p.A294G mutation. Therefore, while the clinical consequences of the p.A294V mutation are severe, its impact on the M current is moderate, suggesting that this mutation may act through other mechanisms than a simple functional alteration. Our study contrasts with other studies in which mutations associated with EOEE and located in the pore region or S4 segment have dominant-negative effects and reduce current density by 50–70% (Miceli et al., 2013; Orhan et al., 2014). However, Orhan and collaborators also reported two other EOEE mutations localized in the C-terminal domain of Kv7.2 subunit (p.M518V and p.R532W) characterized by global M current densities reduced by only 25%. Therefore, in accordance with the present study, we postulate that the degree of M current inhibition, measured in non-neuronal expressing systems, is not always predictive of the disease severity. This is further supported by a very recent study showing even a gain of function induced by mutations located in the voltage sensor domain and associated with EOEE (Miceli et al., 2015).

We also observed that the p.A294V mutation reduced the total expression of Kv7.2 subunits by ~80%, while the protein was normally expressed in cells co-transfected with the mutant and Kv7.3 subunits. This suggests that the mutation could alter protein folding and/or increase endoplasmic reticulum degradation and that the association of the mutant subunit with Kv7.3 may be protective. Such a protective effect of Kv7.3 has also been described on the c.2043ΔT frameshift mutation located in the C-terminal domain of Kv7.2 (Coppola et al., 2003; Soldovieri et al., 2006). In our study, in spite of the restoration of Kv7.2^{A294V} protein to wild-type levels, current density in cells co-expressing Kv7.2^{A294V}/Kv7.3 was strongly reduced (~80%) compared to wild-type heteromeric channel. In contrast to the p.A294V mutation, we did not observe any effect of the p.A294G mutation on the homomeric Kv7.2 channel, although we found an ~40% decrease in total channel expression by western blotting. The p.A294G channel



appears less sensitive to intracellular degradation than the pA294V channel, and more efficient at reaching the cell membrane by itself since it generates a current identical to that of the wild-type Kv7.2 subunit. However, in the situation where Kv7.2 is expressed with Kv7.3 and a mutated subunit, both mutations behave similarly and lead to an equivalent decrease in M current, thus unmasking the functional impairment in Kv7.2^{A294G}. This suggests that Ala294 may be an important residue for pore formation and heteromeric channel activity. As a consequence, the bulkier Val residue in Kv7.2^{A294V} would be more deleterious than the smaller Gly in Kv7.2^{A294G}.

The heterologous expression in hippocampal neurons further indicated that the p.A294V but not the p.A294G mutation strongly affects the neuronal localization of Kv7.2^{A294V}/Kv7.3 channels. In neurons, channel composed of p.A294V mutated subunit presented a decreased density at the AIS and were mostly detected within the somato-dendritic compartment. Interestingly, the decrease in AIS/dendrite ratio was not significantly different in neurons transfected with Kv7.2^{A294V}/Kv7.3 or with Kv7.2^{A294V}/Kv7.2/Kv7.3, indicating that wild-type Kv7.2 or Kv7.3 subunits were not able to restore the normal location of the channels. Axonal targeting defects have also been described in some BFNS cases (Chung et al., 2006; Cavaretta et al., 2014; Liu and Devaux, 2014). However, to our knowledge, such influence exerted by a mutant subunit on the heteromeric channel targeting has never been described in severe *KCNQ2*-related epilepsies and in configuration mimicking the patients' heterozygous genotype. It is although unclear how the p.A294V mutation may selectively affect the axonal targeting of M channels. Indeed, molecules involved in channels targeting, such as calmodulin and ankyrin-G, bind the C-terminus of Kv7.2 subunit (Devaux et al., 2004; Pan et al., 2006; Rasmussen et al., 2007; Etxeberria et al., 2008; Liu and Devaux, 2014; Cavaretta et al., 2014), including the proximal domain (amino acids 323–500) but not the segment S6. Therefore, our current hypothesis is that the substitution of Ala294 by valine, but not by glycine residue, indirectly affects the binding of regulatory proteins involved in channel targeting to the C-terminal domain or even at position 294 of Kv7.2.

This new data provides an additional mechanism that could play a crucial role in the severity of the disease, although the electrophysiological consequences may be complex. Indeed, while a decreased expression and a reduced current density at the AIS may favor neuronal firing (Yue and Yaari, 2006; Hu et al., 2007; Shah et al., 2008; Bettefeld et al., 2014; Soh et al., 2014), an increase in channel expression at the dendritic level may lower the dendritic input resistance, dampening dendrite excitability. Further studies are required to understand the functional consequences of this dendritic localization of Kv7 channels with a specific attention on synaptic integration of excitatory inputs and temporal summation of excitatory post-synaptic potentials that are likely to be impacted by this channel redistribution (Magee, 2000; Shah et al., 2011). In contrast, for the BFNS mutation A294G, our data suggest that this mutation might affect the function of the heteromeric channels in their normal neuronal location (i.e., the AIS).

How could we treat the patients? Recently, the interest in retigabine as a potential treatment was raised for some *KCNQ2* mutations altering the current density. However, it is likely that retigabine is of lesser interest here, since the main effect of *KCNQ2* mutation we observed was on channel targeting and not on I_M current (with Kv7.2^{A294V}/Kv7.2/Kv7.3), and that such a treatment may potentially induce a more important dampening of dendritic excitability. Carbamazepine has been shown to be effective

in some *KCNQ2*-related epileptic encephalopathies (Kato et al., 2013; Numis et al., 2014). Here, we cannot clearly attribute the cessation of epilepsy to any particular anti-epileptic drug since very different protocols were used for each patient. However, we confirmed that the neurological prognosis may be very poor despite the short duration of the epilepsy (Kato et al., 2013; Milh et al., 2013). This would tend to confirm that neurological disability is not just a sequel of neonatal seizures and raise the question of the appropriateness of the term “epileptic encephalopathy” to characterize the severe forms of *KCNQ2*-related epilepsies. More than the epileptic and/or interictal activity per se, the *KCNQ2* “channelopathy” may cause a developmental impairment via permanent disruption of neuronal networks. In theory, the effects of the p.A294V mutation could be reduced using molecules preventing the targeting of the channel to the somato-dendritic compartment. To our knowledge, such molecules have not yet been uncovered. A better understanding of Kv7.2 targeting and pre-clinical pharmacological studies remains instrumental to develop new treatments.

Conclusions

We conclude that p.A294V is a frequent mutation that always gives rise to a severe phenotype. This mutation has a strong impact on the mutant subunit expression and its function. In a configuration that is theoretically observed in patients, the mutant subunit reduces global current density to the same extent as a BFNS mutation involving the same residue. However, we found that the p.A294V mutation specifically affects the targeting of the channel to the AIS. To our knowledge, such an effect has never been described for previously documented *KCNQ2* mutations. Altogether, we suggest that the disease severity may not necessarily result from a strong impairment of the M current and it is likely that the reorganization of channel distribution is also important. Therefore, the subcellular analysis of Kv7 channel expression should be taken into consideration for future studies on *KCNQ2* mutations and future treatment development.

Acknowledgments

We thank the Centre de Ressources Biologiques of La Timone Children's Hospital in Marseille for providing the human samples used to identify mutations. We thank Drs. Patrick Delmas and Thomas Jentsch for their generous gifts of plasmids. We also thank Dr. Igor Medina for primary neuron culture. This work was supported by the Agence National pour la Recherche (ANR-14-CE13-0011-02, EPI'K), ERA-Net for Research on Rare Diseases (ANR-13-RARE-0001-01; JD), and the Association Française contre les Myopathies (MNM1 2012-14580; JD). This work was supported by INSERM, CNRS, Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC IR 2011) and Aix-Marseille Université.

All authors certify that there is not any conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

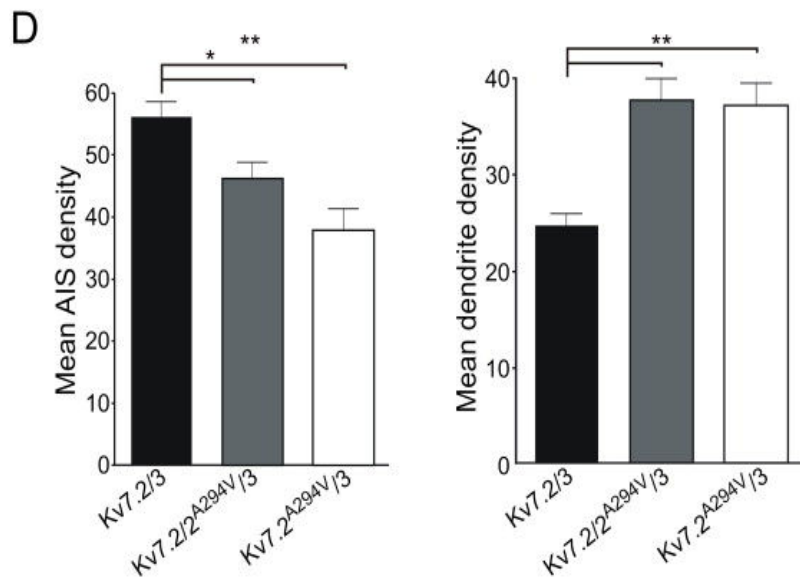
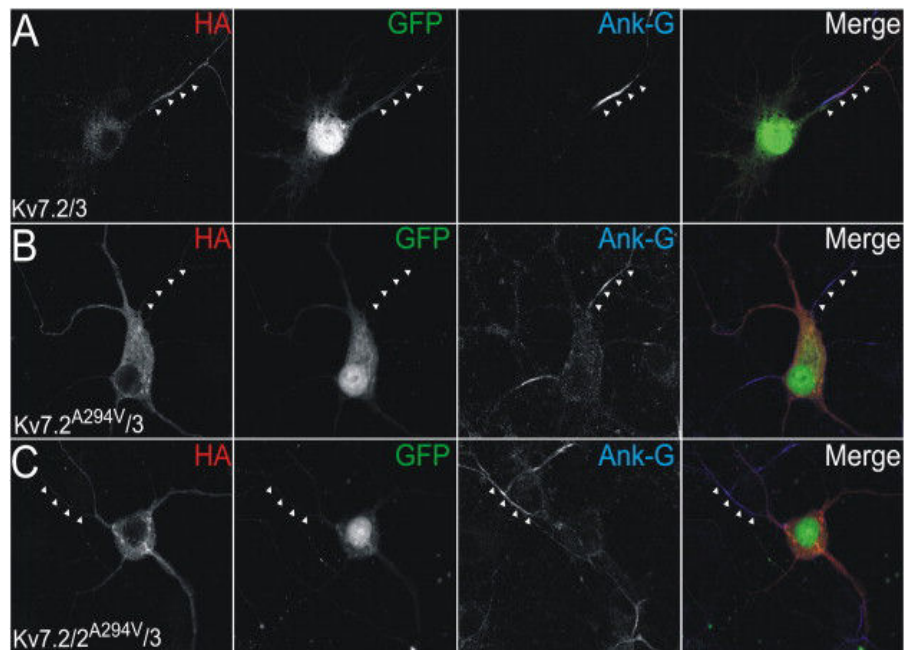
Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.017>.

Fig. 9. The pore p.A294V mutation increases Kv7 channels expression in the somato-dendritic compartment. (A–E) Hippocampal neurons (DIV9) were transfected with GFP (green) and V5-tagged Kv7.2 (A), Kv7.2^{A294V}/Kv7.2 (B), Kv7.2^{A294V} (C), Kv7.2^{A294G}/Kv7.2 (D) or Kv7.2^{A294G} (E) together with Kv7.3 constructs, then were immunostained for V5 (red) and ankyrin-G (blue) to label the AIS (arrowheads). Wild-type Kv7.2/Kv7.3 channels are selectively addressed at the AIS and co-localize with ankyrin-G. The heteromeric association of the mutant Kv7.2^{A294V} subunit with wild-type Kv7.3 or Kv7.2/Kv7.3 subunits leads to a reduction in the fluorescence density at the AIS. Instead, the mutant channels are predominantly localized in the somato-dendritic compartment (arrows). By contrast, the heteromeric association of the mutant Kv7.2^{A294G} subunit with wild-type Kv7.3 or Kv7.2/Kv7.3 subunits did not affect the localization of the channels at AIS. Isolated AIS labeling are shown at a higher magnification in the left panels. F) The intensity of V5 staining was measured along a 20–30 μm long selection (dashed lines) within the AIS, dendrites and soma, and the fluorescence ratio AIS/dendrite and AIS/soma were calculated (n = 29 to 36 neurons from 4 different sets of experiments for each condition). ANOVA followed by Bonferroni's test with multiple-comparisons. Scale bars: 10 μm.

References

- Allen, N.M., Mannion, M., Conroy, J., Lynch, S.A., Shahwan, A., Lynch, B., King, M.D., 2014. The variable phenotypes of KCNQ-related epilepsy. *Epilepsia* 55, 99–105.
- Battefeld, A., Tran, B.T., Gavrilis, J., Cooper, E.C., Kole, M.H., 2014. Heteromeric Kv7.2/7.3 channels differentially regulate action potential initiation and conduction in neocortical myelinated axons. *J. Neurosci.* 34, 3719–3732.
- Biervert, C., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Berkovic, S.F., Prooing, P., Jentsch, T.J., Steinlein, O.K., 1998. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279, 403–406.
- Borgatti, R., Zucca, C., Cavallini, A., Ferrario, M., Panzeri, C., Castaldo, P., Soldovieri, M.V., Baschiroto, C., Bresolin, N., Dalla Bernardina, B., Tagliatalata, M., Bassi, M.T., 2004. A novel mutation in KCNQ2 associated with BFNC, drug resistant epilepsy, and menral retardation. *Neurology* 63, 57–65.
- Brown, D.A., Passmore, G.M., 2009. Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br. J. Pharmacol.* 156, 1185–1195.
- Cavaretta, J.P., Sherer, K.R., Lee, K.Y., Kim, E.H., Issema, R.S., Chung, H.J., 2014. Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ potassium channels is regulated by calmodulin interaction with KCNQ2 subunit. *PLoS One* 9, e103655.
- Charlier, C., Singh, N.A., Ryan, S.G., Lewis, T.B., Reus, B.E., Leach, R.J., Leppert, R.M., 1998. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat. Genet.* 18, 53–55.
- Chung, H.J., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 2006. Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ channels is mediated by multiple signals in the KCNQ2 and KCNQ3 C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8870–8875.
- Coppola, G., Castaldo, P., Miraglia del Giudice, E., Bellini, G., Galasso, F., Soldovieri, M.V., Anzalone, L., Sferro, C., Annunziato, L., Pascotto, A., Tagliatalata, M., 2003. A novel KCNQ2 K⁺ channel mutation in benign neonatal convulsions and centrotemporal spikes. *Neurology* 61, 131–134.
- Dalen Meurs-van der Schoor, C., van Weissenbruch, M., van Kempen, M., Bugiani, M., Aronica, E., Ronner, H., Vermeulen, R.J., 2014. Severe neonatal epileptic encephalopathy and KCNQ2 mutation: neuropathological substrate? *Front. Pediatr.* 2, 136.
- Devaux, J.J., Kleopa, K.A., Cooper, E.C., Scherer, S.S., 2004. KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J. Neurosci.* 24, 1236–1244.
- Etcheberria, A., Aivar, P., Rodriguez-Alfaro, J.A., Alaimo, A., Villace, P., Gomez-Posada, J.C., Areso, P., Villaroel, A., 2008. Calmodulin regulates the trafficking of KCNQ2 potassium channels. *FASEB J.* 22, 1135–1143.
- Hu, H., Vervaeke, K., Storm, J.F., 2007. M-channels (Kv7/KCNQ channels) that regulate synaptic integration, excitability, and spike pattern of CA1 pyramidal cells are located in the perisomatic region. *J. Neurosci.* 27, 1853–1867.
- Jentsch, T.J., 2000. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 21–30.
- Kato, M., Yamagata, T., Kubota, M., Arai, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., Fujii, T., Imai, K., Uster, T., Chitayat, D., Weiss, S., Kashii, H., Kusano, R., Matsumoto, A., Nakamura, K., Oyazato, Y., Maeno, M., Nishiyama, K., Koderu, H., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Saito, K., Hayasaka, K., Matsumoto, N., Saito, H., 2013. Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia* 54, 1282–1287.
- Lange, W., Geissendörfer, J., Schenzer, A., Grötzinger, J., Seeböhm, G., Friedrich, T., Schwake, M., 2009. Refinement of the binding site and mode of action of the anticonvulsant Retigabine on KCNQ K⁺ channels. *Mol. Pharmacol.* 75, 272–280.
- Liu, W., Devaux, J.J., 2014. Calmodulin orchestrates the heteromeric assembly and the trafficking of KCNQ2/3 (Kv7.2/3) channels in neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 58, 40–52.
- Lonigro, A., Devaux, J.J., 2009. Disruption of neurofascin and gliomedin at nodes of Ranvier precedes demyelination in experimental allergic neuritis. *Brain* 132, 260–273.
- Magee, J.C., 2000. Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 181–190.
- Maljevic, S., Lerche, H., 2014. Potassium channel genes and benign familial neonatal epilepsy. *Prog. Brain Res.* 213, 17–53.
- Maljevic, S., Wuttke, T.V., Lerche, H., 2008. Nervous system KV7 disorders: breakdown of a subthreshold brake. *J. Physiol.* 586, 1791–1801.
- Miceli, F., Soldovieri, M.V., Ambrosino, P., Ambrosino, P., Barrese, V., Migliore, M., Cilio, M.R., Tagliatalata, M., 2013. Genotype–phenotype correlations in neonatal epilepsies caused by mutations in the voltage sensor of K(v)7.2 potassium channel subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4386–4391.
- Miceli, F., Soldovieri, M.V., Ambrosino, P., De Maria, M., Migliore, M., Migliore, R., Tagliatalata, M., 2015. Early-onset epileptic encephalopathy caused by gain of function mutations in the voltage sensor of Kv7.2 and Kv7.3 potassium channel subunits. *J. Neurosci.* 35, 3782–3793.
- Milh, M., Boutry-Kryza, N., Sutura-Sardo, J., Mignot, C., Auvin, S., Lacoste, C., Villeneuve, N., Roubertie, A., Heron, B., Carneiro, M., Kaminska, A., Altuzarra, C., et al., 2013. Similar early characteristics but variable neurological outcome of patients with a de novo mutation of KCNQ2. *Orphanet J. Rare Dis.* 8, 80.
- Numis, A.L., Angriman, M., Sullivan, J.E., Lewis, A.J., Striano, P., Nabbout, R., Cilio, M.R., 2014. KCNQ2 encephalopathy: delineation of the electroclinical phenotype and treatment response. *Neurology* 82, 368–370.
- Orhan, G., Bock, M., Schepers, D., Liina, E.I., Reichel, S.N., Löffler, H., Jezutkovic, N., Weckhuysen, S., Mandelstam, S., Danker, T., Guenther, E., Scheffer, I.E., de Jonghe, P., Lerche, H., Maljevic, S., 2014. Dominant-negative effects of KCNQ2 mutations are associated with epileptic encephalopathy. *Ann. Neurol.* 75, 382–394.
- Pan, Z., Kao, T., Horvath, Z., Lemos, J., Sul, J.Y., Cranston, S.D., Bennett, V., Scherer, S.S., Cooper, E.C., 2006. A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and Nav channels at electrically active domains of the axon. *J. Neurosci.* 26, 2599–2613.
- Peters, H.C., Hu, H., Pongs, O., Storm, J.F., Isbrandt, D., 2005. Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nat. Neurosci.* 8, 51–60.
- Rasmussen, H.B., Frøkjær-Jensen, C., Jensen, C.S., Jensen, H.S., Jørgensen, N.K., Misonou, H., Trimmer, J.S., Olesen, S.P., Schmitt, N., 2007. Requirement of subunit co-assembly and ankyrin-G for M-channel localization at the axon initial segment. *J. Cell Sci.* 120, 953–963.
- Safulina, V.F., Zacchi, P., Tagliatalata, M., Yaari, Y., Cherubini, E., 2008. Low expression of Kv7/M channels facilitates intrinsic and network bursting in the developing rat hippocampus. *J. Physiol.* 586, 5437–5453.
- Shah, M.M., Migliore, M., Valencia, I., Cooper, E.C., Brown, D.A., 2008. Functional significance of axonal Kv7 channels in hippocampal pyramidal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7869–7874.
- Shah, M.M., Migliore, M., Brown, D.A., 2011. Differential effects of Kv7 (M⁻) channels on synaptic integration in distinct subcellular compartments of rat hippocampal pyramidal neurons. *J. Physiol.* 589, 6029–6038.
- Singh, N.A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B.R., Leach, R.J., Melis, R., Ronen, G.M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J.V., McHarg, M.L., Gagnon, D., Rosales, T.O., Peiffer, A., Anderson, V.E., Leppert, M., 1998. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat. Genet.* 18, 25–29.
- Soh, H., Pant, R., LoTurco, J.J., Tzingounis, A.V., 2014. Conditional deletions of epilepsy-associated KCNQ2 and KCNQ3 channels from cerebral cortex cause differential effects on neuronal excitability. *J. Neurosci.* 34, 5311–5321.
- Soldovieri, M.V., Castaldo, P., Iodice, L., Miceli, F., Barrese, V., Bellini, G., Miraglia del Giudice, E., Pascotto, A., Annunziato, L., Tagliatalata, M., 2006. Decreased subunit stability as a novel mechanism for potassium current impairment by a KCNQ2 C terminus mutation causing benign familial neonatal convulsions. *J. Biol. Chem.* 281, 418–428.
- Soldovieri, M.V., Boutry-Kryza, N., Milh, M., Doumar, D., Heron, B., Bourel, E., Ambrosino, P., Miceli, F., De Maria, M., Dorison, N., Auvin, S., Echenne, B., Oertel, J., Riquet, A., Lambert, L., Gerard, M., Roubergue, A., Calender, A., Mignot, C., Tagliatalata, M., Lesca, G., 2014. Novel KCNQ2 and KCNQ3 mutations in a large cohort of families with benign neonatal epilepsy: first evidence for an altered channel regulation by syntaxin 1A. *Hum. Mutat.* 35, 356–367.
- Steinlein, O.K., Conrad, C., Weidner, B., 2007. Benign familial neonatal convulsions: always benign? *Epilepsy Res.* 73, 245–249.
- Wang, H.S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B.S., Wymore, R.S., Cohn, I.S., Dixon, J.E., McKinnon, D., 1998. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282, 1890–1893.
- Weckhuysen, S., Mandelstam, S., Suls, A., Audenaert, D., Deconinck, T., Claes, L.R., Deprez, L., Smets, K., Hristova, D., Roelens, F., Lagae, L., Yendle, S., Stanley, T., Heron, S.E., Mulley, J.C., Berkovic, S.F., Scheffer, I.E., De Jonghe, P., 2012. KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Ann. Neurol.* 71, 15–25.
- Wen, H., Levitan, I.B., 2002. Calmodulin is an auxiliary subunit of KCNQ2/3 potassium channels. *J. Neurosci.* 22, 7991–8001.
- Xiong, Q., Sun, H., Zhang, Y., Nan, F., Li, M., 2008. Combinatorial augmentation of voltage-gated KCNQ potassium channels by chemical openers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3128–3133.
- Yue, C., Yaari, Y., 2006. Axo-somatic and apical dendritic Kv7/M channels differentially regulate the intrinsic excitability of adult rat CA1 pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* 95, 3480–3495.

A recurrent KCNQ2 pore mutation causing early onset epileptic encephalopathy has a moderate effect on M current but alters subcellular localization of Kv7 channels



Supplementary figure.

Affef Abidi, Jérôme J. Devaux, Florence Molinari, Gisèle Alcaraz, François-Xavier Michon, Julie Sutera-Sardo, Hélène Becq, Caroline Lacoste, Cécilia Altuzarra, Alexandra Afenjar, Cyril Mignot, Diane Doummar, Bertrand Isidor, Sylvie N. Guyen, Estelle Colin, Sabine De La Vaissière, Damien Haye, Adeline Trauffer, Catherine Badens, Fabienne Prieur, Gaetan Lesca, Laurent Villard, Mathieu Milh, Laurent Aniksztejn

Neurobiology of Disease, Volume 80, 2015, 80–92

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.017>

II.3. ETUDE D'UNE MUTATION RECURRENTE DANS LE GENE *KCNQ2* (ARTICLE 2 : ABIDI ET AL, 2015)

La mutation p.A294V (c.881C>T) a particulièrement retenu notre attention car elle est présente chez 5 patients de notre cohorte. Nous avons établi une collaboration avec une équipe lyonnaise. Cette équipe a rassemblé une cohorte de patients porteurs de mutations dans le gène *KCNQ2*. La mutation p.A294V a été retrouvée chez deux patients de cette cohorte lyonnaise. Elle a aussi été décrite 3 fois dans la littérature (Kato, 2013 ; Allen, 2014).

Cette mutation est *de novo* pour tous les patients décrits dans l'Article 2 sauf deux patients EEP qui l'ont hérité d'un parent porteur de la mutation à l'état mosaïque. Les patients sont tous atteints d'EEP, leur tableau clinique est sévère et très similaire. Ils ont tous présenté une épilepsie débutant durant la première semaine de vie (entre 1 jour et 8 jours), avec des crises fréquentes qui se sont arrêtées après quelques mois (entre 2 mois et 7 mois) de façon spontanée ou après traitement. L'EEG initial de ces patients était de type *suppression-burst* pour la majorité des patients (6/7 patients). Les patients ont tous des déficits cognitifs et moteurs importants, avec une incapacité à se déplacer ou même à s'asseoir. Ces patients ont donc un profil clinique similaire mais une variabilité clinique existe néanmoins puisque le patient 6 peut se déplacer à l'aide d'une aide (phénotype le moins sévère) tandis que le patient 5 est décédé à 6 mois (phénotype le plus sévère). Une autre mutation, p.A294G, a été décrite dans la littérature et serait responsable d'une épilepsie familiale bénigne (Steinlein, 2007). Il semblerait que le développement du patient porteur de la mutation p.A294G soit normal après l'arrêt des crises. Cette localisation à la position 881 sur l'ADNc serait donc un point chaud (*hot spot*) mutationnel.

Il nous a semblé essentiel de comparer les mécanismes pathologiques pour ces deux mutations. Nous avons émis l'hypothèse qu'une mutation localisée dans le pore du canal conduirait à une altération de la densité de courant. Nous avons voulu étudier si les conséquences sur le courant I_M des mutations responsables d'EEP sont plus délétères que pour les mutations responsables de BFNS. Cette hypothèse étant sous-tendue par des travaux présentés dans deux publications (Orhan, 2014 ; Miceli 2013).

Nous avons étudié l'influence des deux mutations p.A294V (Kv7.2-EEP) et p.A294G (Kv7.2-BFNS) sur les propriétés du canal KCNQ/M, son expression protéique ainsi que sur son adressage à l'AIS.

Après analyse de l'effet de ces deux mutations sur le courant, nous avons pu démontrer que:

- Sous forme homomérique Kv7.2*, il y a un effet de la mutation p.A294V sur la densité et la dépendance au voltage du courant I_M tandis qu'il n'y a aucun effet de la mutation p.A294G. Lorsqu'il y a co-expression des sous-unités Kv7.2 et Kv7.2*, il y a restauration complète du courant I_M pour la mutation p.A294V. Cependant, sous cette dernière configuration, il existe une différence significative dans la cinétique du courant I_M pour la mutation p.A294V et le canal est plus rapide à l'activation et à la désactivation ($p < 0,01$ et $p < 0,001$ avec un test de Mann-Whitney ; Figure 3 de l'article 2). La dépendance au voltage ($V_{1/2}$ et pente k) n'est affectée pour aucune des deux mutations dans la configuration Kv7.2-Kv7.2* (Tableau 8 et Figure 3 de l'article 2)

- Sous forme hétéromérique, la densité de courant est la principale propriété du canal qui est affectée de façon statistiquement significative. La diminution est de 83% pour la configuration Kv7.2^{A294V}-Kv7.3 contre 50% pour la configuration Kv7.2^{A294G}-Kv7.3. Ces diminutions par rapport à la configuration sauvage (Kv7.2-Kv7.3) sont statistiquement significatives ($p < 0,001$, test de Kruskal Wallis et $p < 0,01$, ANOVA ; respectivement). Les sous-unités sauvages transfectées en configuration Kv7.2*-Kv7.2-Kv7.3 de proportion 1 :1 :2 permettent une restauration du courant avec une diminution qui n'est plus que de 30% pour les deux mutations p.A294V ($p < 0,05$, test de Kruskal Wallis) et p.A294G ($p < 0,05$, ANOVA) (Tableau 8 et Figure 4 de l'article 2). Ces deux mutations entraînent donc une diminution similaire de la densité de courant dans une configuration reproduisant le génotype du patient. La dépendance au voltage ainsi que la cinétique ne sont affectées dans aucune des configurations hétéromériques que ce soit avec les sous-unités Kv7.2^{A294V} ou avec les sous-unités Kv7.2^{A294G} (Tableau 8 et Figure 4 de l'article 2).

Tableau 8 : Etude du courant par électrophysiologie sur cellules CHO transfectées par les plasmides pcDNA3-KCNQ2 sauvage, p.A294V ou p.A294G avec ou sans le plasmide pcDNA3-KCNQ3.

Les résultats obtenus pour les configurations mutées sont comparées à la forme sauvage correspondante (Kv7.2, pour la forme homomérique et Kv7.2-Kv7.3 pour la forme hétéromérique).

Les pentes sont relevées entre - 45 mV et +45 mV.

Résultats simplifiés de l'électrophysiologie				
Configuration	n	$V_{1/2}$	k	Densité de courant
Kv7.2 ^{A294V}	8	Pas de courant	Pas de courant	Pas de courant
Kv7.2 ^{A294V} -Kv7.2	11	Non modifié	Non modifié	Non modifié
Kv7.2 ^{A294V} -Kv7.3	14	Non modifié	Non modifié	83%
Kv7.2-Kv7.2 ^{A294V} -Kv7.3	31	Non modifié	Non modifié	30%
Kv7.2 ^{A294G}	17	Non modifié	Non modifié	Non modifié
Kv7.2 ^{A294G} -Kv7.2	16	Non modifié	Non modifié	Non modifié
Kv7.2 ^{A294G} -Kv7.3	20	Non modifié	Non modifié	50%
Kv7.2-Kv7.2 ^{A294G} -Kv7.3	20	Non modifié	Non modifié	30%

Dans les BFNS, une diminution de densité de courant de 30% est décrite pour des configurations hétéromériques avec les sous-unités Kv7.2 sauvages et mutées (Maljevic, 2008 ; Soldovieri 2014). Cette altération du courant est de plus, similaire entre les deux mutations p.A294V-EEP et p.A294G-BFNS. La sévérité de la pathologie ne serait donc pas liée à un défaut du courant I_M plus important pour la mutation responsable d'EEP.

Nous nous sommes également intéressé aux conséquences des mutations de *KCNQ2* sur l'efficacité des médicaments antiépileptiques. En effet, certaines molécules telles que la rétigabine, utilisée dans les épilepsies focales du nourrisson, provoquent un décalage hyperpolarisant sur le courant I_M (Figure 21A). Ces molécules peuvent agir sur les segments transmembranaires S5 et S6 des sous-unités Kv2 et Kv7.3 (Figure 21B ; Lange, 2009). La mutation p.A294V pourrait donc agir sur la liaison de la rétigabine à la sous-unité Kv7.2. Nous avons donc testé *in vitro* l'effet de cette molécule sur les canaux ioniques hétéromériques Kv7.2^{A294V}-Kv7.3 et Kv7.2^{A294V}-Kv7.2-Kv7.3. De manière étonnante, nous avons montré que la rétigabine conservait un effet sur les canaux Kv7.2^{A294V} en configuration hétéromérique et provoquait le même décalage hyperpolarisant que sur les canaux Kv7.2-Kv7.3 sauvages (Figure 5 de l'Article 2).

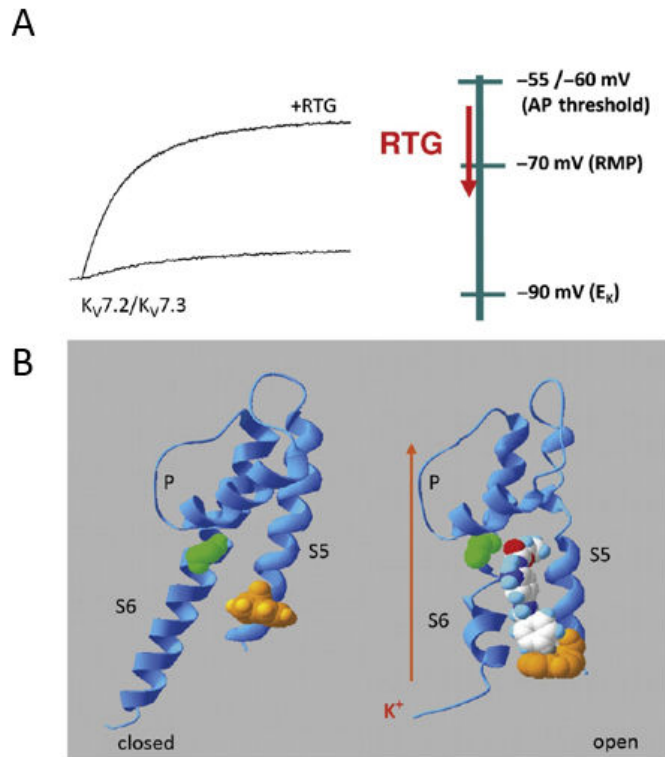


Figure 21 : Effet de la rétigabine sur le canal Kv7.2-Kv7.3 (A) et représentation 3D de l'interaction de la rétigabine avec les segments S5 et S6 (B). (Maljevic et Lerche, 2014)

Nous avons également analysé l'expression totale des sous-unités Kv7.2^{A294V} et Kv7.2^{A294G}. Des expériences d'immunoblot ont permis de montrer une diminution de 80% des sous-unités Kv7.2^{A294V} (n=6, p<0,01, test de Mann Whitney) contre une diminution de 40% pour les sous-unités Kv7.2^{A294G} (n=5, p<0,05, test de Mann Whitney) en configuration homomérique (Figure 8 de l'article 2). La sous-unité Kv7.3 quant à elle restaure la quantité totale de sous-unités Kv7.2^{A294V} (n=5) et Kv7.2^{A294G} (n=4). La diminution de densité de courant à l'état hétéromérique n'est donc pas la conséquence d'une diminution de quantité de protéines totales.

La localisation des canaux Kv7.2-Kv7.3 au niveau du segment initial de l'axone (AIS) est indispensable à leur fonctionnement. Nous avons donc étudié cette localisation dans des neurones primaires en culture. Les résultats simplifiés sont présentés dans le Tableau 9. Les expériences d'immunohistochimie sur neurones en culture montrent une délocalisation des canaux hétéromériques mutants, avec pour conséquence une altération des ratio

AIS/dendrite ou soma (Tableau 9 et Figure 22). La diminution d'expression des canaux Kv7 à l'AIS est la même pour les deux configurations (Kv7.2^{A294V}V5-Kv7.3 et Kv7.2^{A294V}-Kv7.2V5-Kv7.3) (Tableau 9 et Figure 22). Les sous-unités sauvages (qui sont marquées par l'étiquette V5 et reconnues par l'anticorps anti-V5) sont donc en partie délocalisées lorsque les sous-unités Kv7.2^{A294V} sont présentes, ce qui montre un effet dominant-négatif de la sous-unité Kv7.2^{A294V} sur la sous-unité sauvage Kv7.2.

Tableau 9 : Etude de localisation des sous-unités Kv7.2^{A294V} ou Kv7.2^{A294G} au segment initial de l'axone en utilisant la technique d'immunohistochimie.

Les pourcentages de diminution sont exprimés en comparaison au contrôle Kv7.2-Kv7.3. Les anticorps reconnaissent la forme marquée de Kv7.2 (ici, elle est représentée *en rouge*). Les analyses ont été réalisées sur n=29 à n= 36 neurones dans 4 expériences indépendantes.

Résultats simplifiés de l'immunohistochimie		
Configuration	Pourcentage AIS/dendrite	Pourcentage AIS/soma
Kv7.2 ^{A294V} V5-Kv7.3	60%	60%
Kv7.2 V5-Kv7.2 ^{A294V} -Kv7.3	48%	48%
Kv7.2 ^{A294G} V5-Kv7.3	Non modifié	Non modifié
Kv7.2 V5-Kv7.2 ^{A294G} -Kv7.3	Non modifié	Non modifié

Dans des expériences indépendantes, nous avons testé l'effet des sous-unités Kv7.2^{A294V} sur la délocalisation des sous-unités Kv7.3 (Figure 23). Pour cela, les sous-unités Kv7.3 sont mises en évidence par une étiquette HA, les configurations testées sont Kv7.2^{A294V}-Kv7.3 HA et Kv7.2-Kv7.2^{A294V}-Kv7.3 HA. Les sous-unités Kv7.3 sont également délocalisées en présence de sous-unités Kv7.2^{A294V}. En conclusion de ces expériences, nous avons pu mettre en évidence qu'il y a une réduction de canaux hétéromériques au niveau du segment initial et une augmentation au niveau du compartiment somatodendritique.

Les mêmes expériences avec les sous-unités Kv7.2^{A294G} montrent qu'il n'y a pas de phénomène de délocalisation (Figure 22).

Cet article nous a permis de démontrer que la mutation p.A294V localisée dans le pore du canal Kv7.2-Kv7.3 conduit à une localisation anormale des canaux Kv7 (Figure 23). Nous avons également montré que les mutations décrites dans les EEP ne provoquaient pas toujours des altérations de courant I_M plus importantes que celles causées par les mutations conduisant à des BFNS.

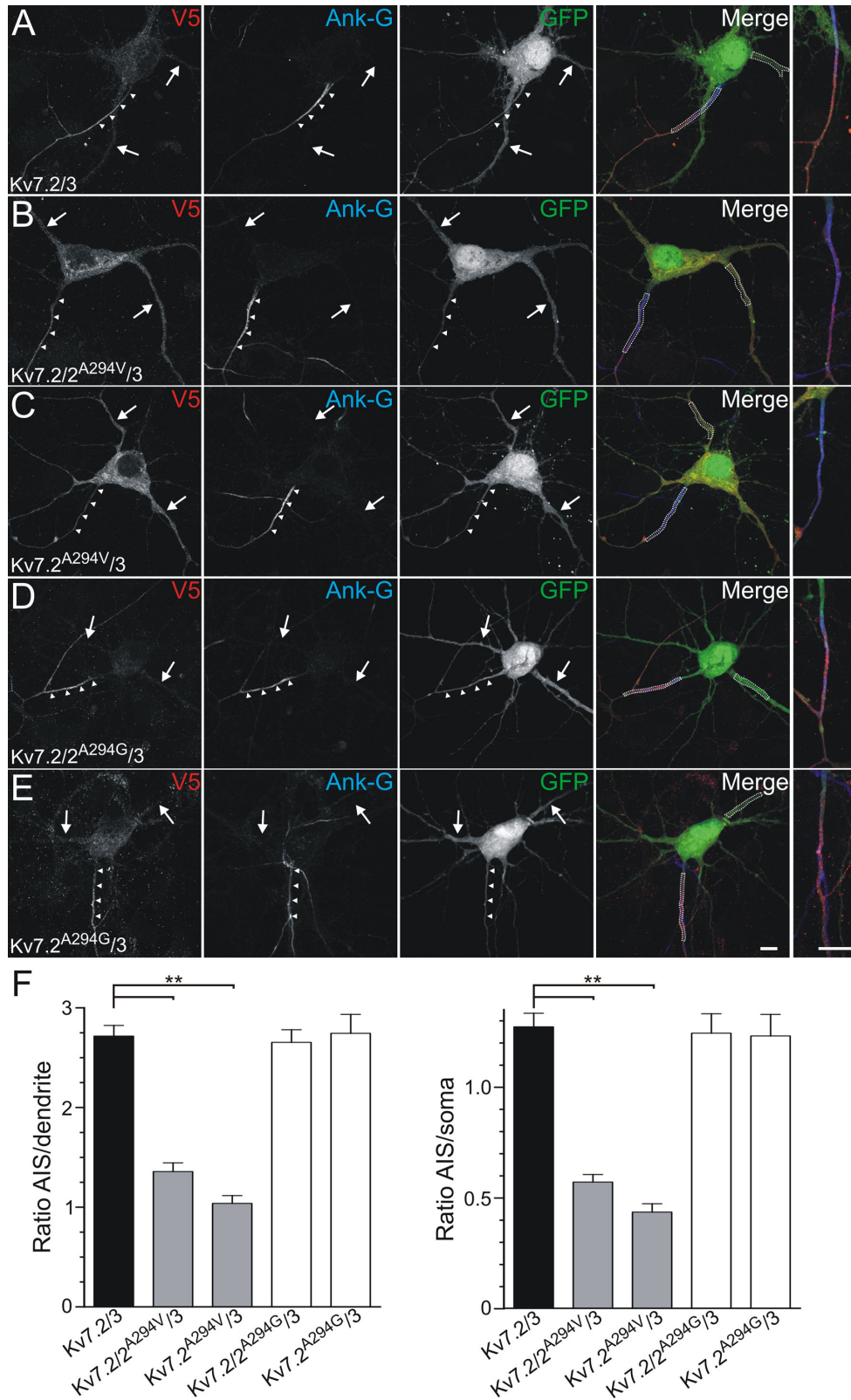


Figure 22 : Etude de l'expression des sous-unités Kv7.2 sauvages, p.A294V et p.A294G au segment initial de l'axone (AIS). Les culture d'hippocampe (DIV9) ont été transfectées avec des plasmides codant pour la GFP (*green fluorescent protein*) et codant les sous-unités Kv7.2-V5/Kv7.3 (A), Kv7.2^{A294V}-V5/Kv7.3 (B), Kv7.2^{A294V}/Kv7.2-V5 /Kv7.3 (C), Kv7.2^{A294G}-V5 /Kv7.3 (D), Kv7.2^{A294G}/Kv7.2-V5 /Kv7.3 (E). Les sous-unités étiquetées avec V5 sont marquées *en rouge* et l'Ankyrine G *en bleu* pour localiser l'AIS. Le compartiment somatodendritique est mis en évidence par des *flèches* tandis que l'AIS est mis en évidence par des *triangles*. (F) L'intensité du marquage de l'étiquette V5 est mesurée sur une section de 20-30 μ m dans l'AIS, le compartiment somatique et les dendrites (*rectangle en pointillé*). Le ratio de fluorescence du marquage V5 est calculé en utilisant les rapport AIS/dendrite et AIS/soma (n= 29 à 36 neurones dans 4 expériences indépendantes). Le test statistique utilisé est l'ANOVA suivi d'une comparaison multiple de Bonferroni. Echelle : 10 μ M

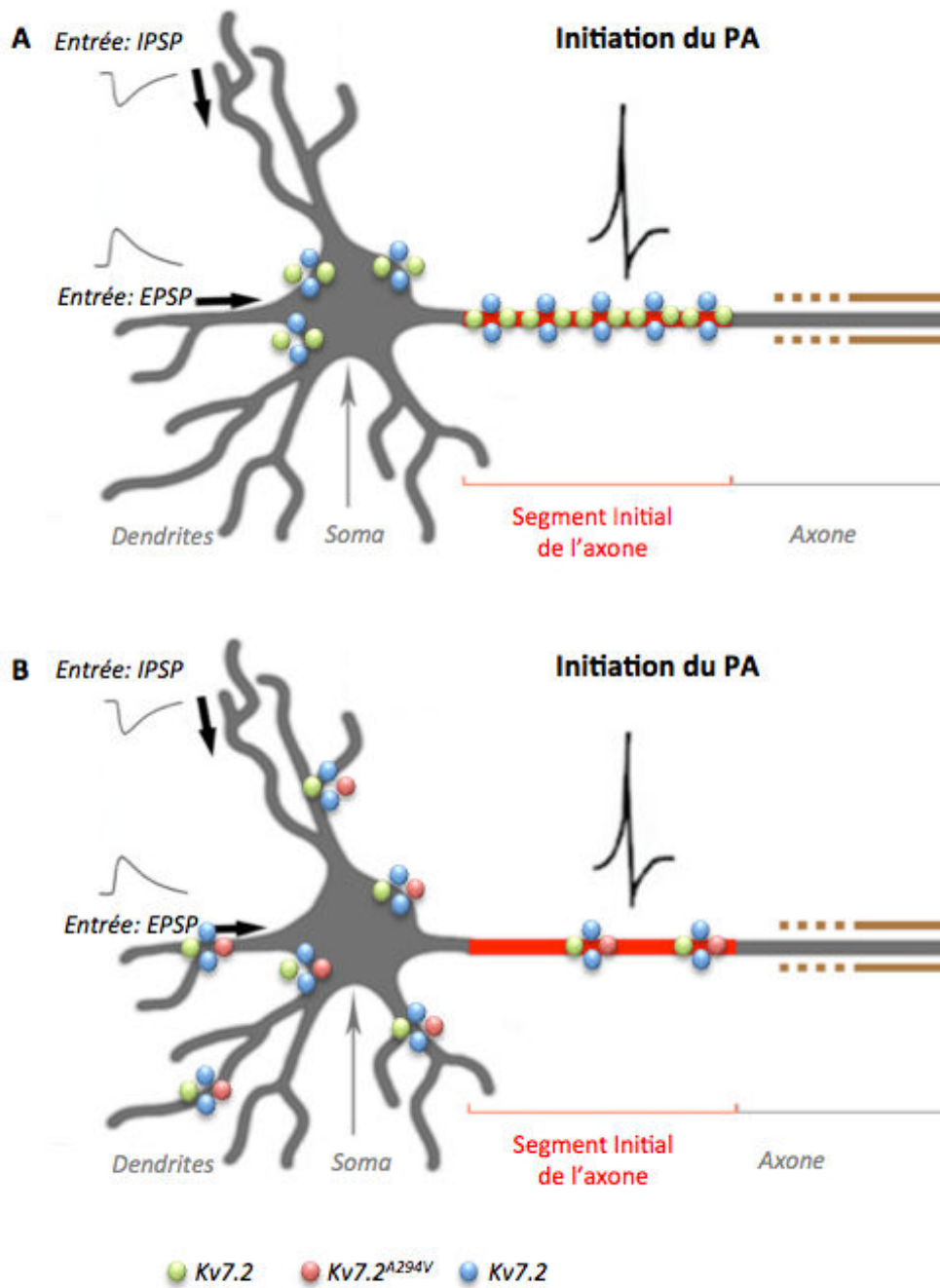


Figure 23 : Représentation schématique récapitulant la délocalisation des sous-unités Kv7.2-Kv7.3 dans un neurone (D'après Duflocq, 2011)
 (A) Localisation normale des canaux Kv7.2-Kv7.3 au segment initial de l'axone.
 (B) Délocalisation des canaux Kv7.2-Kv7.3 au soma et aux dendrites

Article 3: A Kv7.2 mutation associated to early onset epileptic encephalopathy with suppression-burst enhances Kv7/M channel activity

Devaux JJ, **Abidi A**, Roubertie A, Molinari F, Becq H, Lacoste C, Villard L, Milh M, Aniksztejn L.
Epilepsia, sous presse



A Kv7.2 mutation associated with early onset epileptic encephalopathy with suppression-burst enhances Kv7/M channel activity

*Jérôme Devaux, ††Affef Abidi, §¶Agathe Roubertie, #**Florence Molinari, #**Hélène Becq, ††††Caroline Lacoste, ††Laurent Villard, ††††Mathieu Milh, and #**Laurent Aniksztejn

Epilepsia, **(*)1–7, 2016

doi: 10.1111/epi.13366

SUMMARY

Mutations in the *KCNQ2* gene encoding the voltage-gated potassium channel subunit Kv7.2 cause early onset epileptic encephalopathy (EOEE). Most mutations have been shown to induce a loss of function or to affect the subcellular distribution of Kv7 channels in neurons. Herein, we investigated functional consequences and subcellular distribution of the p.V175L mutation of Kv7.2 (Kv7.2^{V175L}) found in a patient presenting

EOEE. We observed that the mutation produced a 25–40 mV hyperpolarizing shift of the conductance–voltage relationship of both the homomeric Kv7.2^{V175L} and heteromeric Kv7.2^{V175L}/Kv7.3 channels compared to wild-type channels and a 10 mV hyperpolarizing shift of Kv7.2^{V175L}/Kv7.2/ Kv7.3 channels in a 1:1:2 ratio mimicking the patient situation. Mutant channels also displayed faster activation kinetics and an increased current density that was prevented by 1 μM linopirdine. The p.V175L mutation did not affect the protein expression of Kv7 channels and its localization at the axon initial segment. We conclude that p.V175L is a gain of function mutation. This confirms previous observations showing that mutations having opposite consequences on M channels can produce EOEE. These findings alert us that drugs aiming to increase Kv7 channel activity might have adverse effects in EOEE in the case of gain-of-function variants.

KEY WORDS: Early onset epileptic encephalopathy, *KCNQ2*, M-current, Gain of function, Axon initial segment, Linopirdine.



Jérôme Devaux is a CNRS researcher at “Aix-Marseille Université”

De novo mutations in *KCNQ2* have been identified in patients with early onset epileptic encephalopathy (EOEE).¹ *KCNQ2* encodes the Kv7.2 protein and forms homomeric

or, in association with Kv7.3, heteromeric voltage-gated potassium channels responsible for the M current.^{1,2} These channels are expressed at high density at the axon initial segment (AIS) and at the nodes of Ranvier, where they regulate neuronal firing.^{3–5} Each Kv7 subunit consists of intracellular N- and C-terminal domains and six transmembrane segments forming the voltage-sensing (S1–S4) and the pore (S5–P–S6) domains. Functional analysis of EOEE mutations in heterologous cells showed variable effects on the M current. All mutations located within the S5–S6 or the C-terminal domains decrease M-current amplitude from a moderate (~25%) to a strong (>50%) level.^{6,7} However, three reported mutations located in the S2 (p.R144Q) and S4 (p.R201C and p.R201H) regions of Kv7.2 actually increased M-current amplitude.⁸ This suggested that EOEE mutations located in the voltage-sensing domain can be gain of function mutations. We recently identified the mutation

Accepted February 25, 2016.

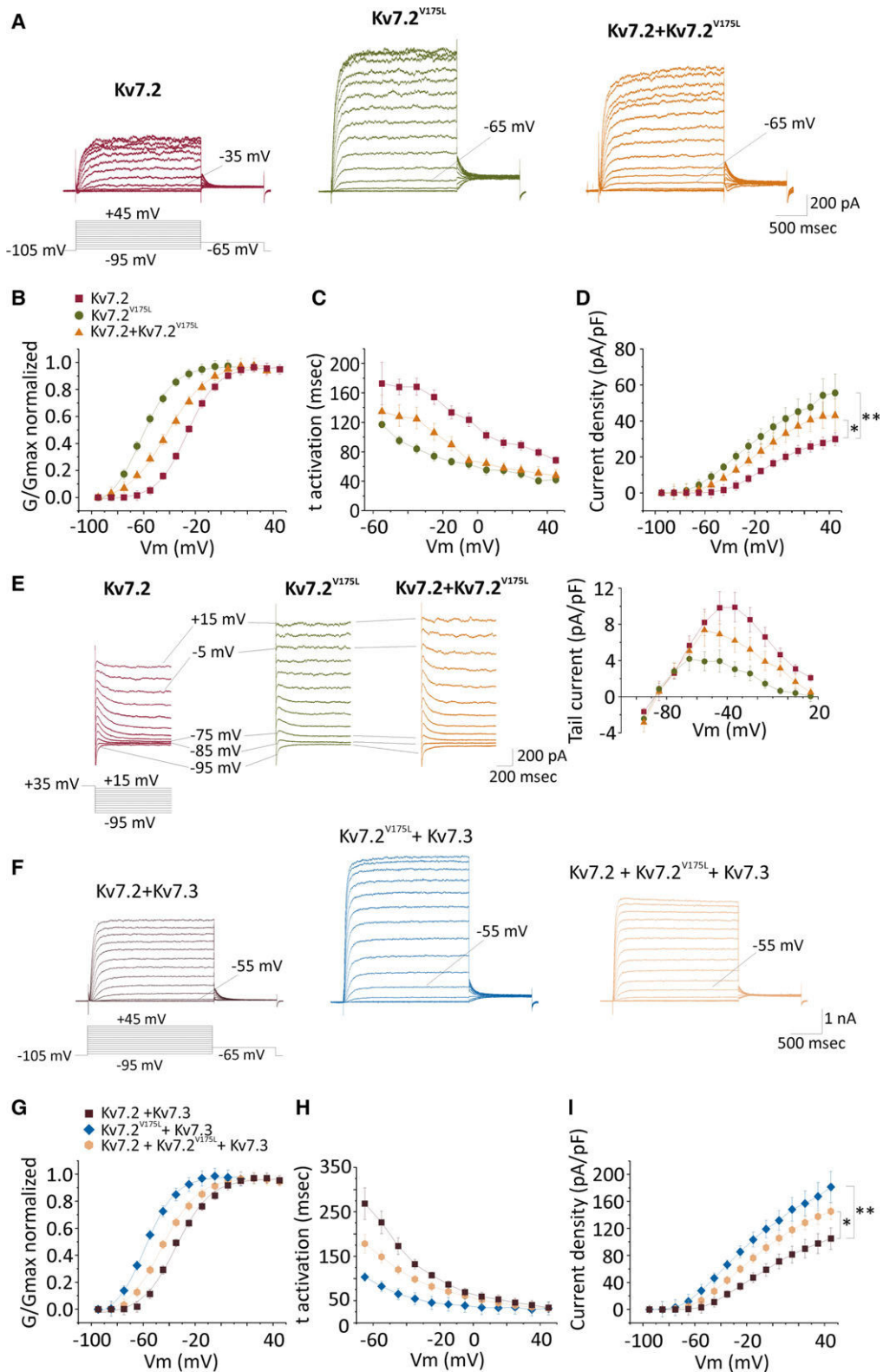
*CNRS, Aix-Marseille Université, CRN2M-UMR7286, Marseille, France; †GMGF, Aix-Marseille Université, Marseille, France; ‡INSERM, UMR_S 910, Marseille, France; §Service de Neuropédiatrie, CHU Montpellier, Montpellier, France; ¶INSERM U1051, INM Montpellier, Montpellier, France; #Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED), Aix-Marseille Université, Marseille, France; **INSERM, UMR_S 901, Marseille, France; and ††Hôpital d’Enfants de la Timone, Service de neurologie pédiatrique, APHM, Marseille, France

Address correspondence to Laurent Aniksztejn, INMED-INSERM U901, parc Scientifique de Luminy, 13273 Marseille Cedex 09, France. E-mail: laurent.aniksztejn@inserm.fr and Mathieu Milh, Hôpital d’Enfants de la Timone, Service de neurologie pédiatrique, APHM, rue St Pierre, 13005 Marseille, France. E-mail: mathieu.milh@ap-hm.fr

Wiley Periodicals, Inc.

© 2016 International League Against Epilepsy

Dispatch: 12.3.16	CE: Liyagath Ali
No. of pages: 7	PE: Vidya
WILEY	
13366	Manuscript No.
E P I	Journal Code



p.V175L located in S3 region of Kv7.2 in a patient with EOEE.⁹ Herein we show that this mutation increases M-channel activity and does not affect channel distribution in neurons.

METHODS

The experimental procedures and data analysis used in the present study have been described previously.⁷

RESULTS

Clinical features of the patient carrying the p.V175L mutation

The female patient was born from healthy, nonconsanguineous parents. During pregnancy, there was a fetal growth restriction associated with hip displacement. Fetal karyotype was normal. The patient was born at 34 post-conceptional weeks. At birth, the weight was 2,040 g, the height was 44 cm, and the cranial circumference was 30 cm. The first neurologic examination was abnormal with no arousal, no eye contact, and axial hypotonia. The patient had a cleft palate and she became hypertonic with pyramidal signs and global spasticity. Electroencephalography (EEG) performed during the first day of life showed a suppression-burst pattern with periods of silence longer than those of burst (Fig. S1). The bursts of activity were initially asymptomatic. Epilepsy began during the second week of life with frequent erratic and axial myoclonic jerks. EEG still showed a suppression-burst pattern and symptomatic bursts of activity associated with myoclonic jerks that lasted longer than the periods of silence. There were no spasms or clonic seizure, only erratic and massive myoclonic jerks. Pyridoxine and pyridoxal phosphate trials were ineffective, as was phenobarbital, vigabatrin, and topiramate. Brain magnetic resonance imaging (MRI) performed at day 13 did not show any brain malformation. Metabolic screening and CGH were normal. Psychomotor achievements were limited and progressive spastic tetraparesis was observed. The patient needed gastrostomy feeding due to swallowing difficulties. The patient died at 18 months (probable sudden unexpected death in epilepsy [SUDEP]).

Functional consequences of p.V175L mutation

We investigated the electrophysiologic consequences of the p.V175L mutation on homomeric Kv7.2 channels and

heteromeric Kv7.2/Kv7.3 channels expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Homomeric Kv7.2 wild-type channels generated a slowly activating outward current in response to depolarizing voltage steps from a holding potential of -105 mV with a threshold potential of around -45 mV. The $V_{1/2}$ and K slope values were -25 ± 1.9 mV and 12.7 ± 1.04 mV/e-fold, respectively ($n = 10$ cells; Fig. 1A,B). The p.V175L mutation strongly affected the gating properties of the channel. We observed a large hyperpolarizing shift in the conductance/voltage (G/V) relationship of Kv7.2^{V175L} channels. The threshold potential of Kv7.2^{V175L} channels was around -75 mV with a $V_{1/2}$ value of -62.3 ± 1.09 mV ($n = 13$ cells, $p < 10^{-6}$, analysis of variance [ANOVA] followed by Bonferroni test), and a K slope factor of 13.05 ± 0.89 mV/efold (not significant) (Fig. 1B). The current density was increased by 90% (measured at $+45$ mV), and the activation time constant was also twice faster at all membrane potentials (Fig. 1C,D). Because of the negative shift, there were fewer channels that deactivate during hyperpolarizing voltage steps applied from $+35$ mV compared to wild-type channels; consequently tail currents of mutant channels had lower amplitude (Fig. 1E). Tail currents from both channels reversed polarity at the same membrane potential (~ -88 mV, Fig. 1E), a value close to the equilibrium potential of K^+ in our recording condition.⁷ This indicated that the p.V175L mutation did not affect the ionic selectivity of the channels. Deactivation channel kinetics were also not significantly affected by the mutation at all potentials tested (data not shown). The co-transfection of Kv7.2 with Kv7.2^{V175L} in a 1:1 ratio attenuated but did not abolish the impact of the mutation on channel gating. The negative shift of the G/V relationship was reduced to 10 mV, but the $V_{1/2}$ was significantly different from wild-type channels (-40.4 ± 2.9 mV; $n = 8$, $p < 10^{-4}$). The activation time constant was also significantly faster and the current density was significantly increased (by 45% at $+45$ mV, Fig. 1B–D).

Figure 1.

Electrophysiologic consequences of the p.V175L mutation on homomeric and heteromeric channels. **(A)** Current evoked by 10 mV incremental depolarizing voltage steps from -105 mV to $+45$ mV for 2 s followed by a 1 s hyperpolarizing voltage step to -65 mV in CHO cells transfected with wild-type Kv7.2 (left), Kv7.2^{V175L} (middle), or Kv7.2^{V175L}/Kv7.2 (right). **(B)** Conductance–voltage relationship of homomeric Kv7.2 channels (red squares), Kv7.2^{V175L} (green circles), and Kv7.2^{V175L}/Kv7.2 (orange triangles) each normalized to their maximal conductance. Continuous lines represent Boltzmann fits to the experimental data. **(C)** Activation time constant plotted as a function of the membrane potential (V_m). **(D)** Current densities are represented as a function of V_m . Plotted data in **A–D** are from currents evoked by 19, 25, and 14 series of incremental depolarizing voltage steps performed in cells expressing Kv7.2 ($n = 10$ cells), Kv7.2^{V175L} ($n = 13$ cells), and Kv7.2/Kv7.2^{V175L} ($n = 8$ cells), respectively. **(E–I)** Same as **A–D** for heteromeric channels Kv7.2/Kv7.3 (dark brown squares), Kv7.2^{V175L}/Kv7.3 (blue diamonds), and Kv7.2^{V175L}/Kv7.2/Kv7.3 (light orange hexagons). Plotted data are from currents evoked by 26, 21, and 24 series of incremental depolarizing voltage steps performed in cells expressing Kv7.2/Kv7.3 ($n = 14$ cells), Kv7.2^{V175L}/Kv7.3 ($n = 12$ cells), and Kv7.2^{V175L}/Kv7.2/Kv7.3 ($n = 14$ cells), respectively. Statistics analysis: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (ANOVA followed by Bonferroni's test).

Epilepsia © ILAE

We then analyzed the consequences of the mutant subunit associated with Kv7.3 in a 1:1 ratio (Kv7.2^{V175L}/Kv7.3) and with both Kv7.2 and Kv7.3 subunits in a 1:1:2 ratio, a configuration that is theoretically observed in patients. The mutation induced a negative shift of the G/V relationship in both configurations with significantly more hyperpolarized V_{1/2} values than that of Kv7.2/Kv7.3 channels (Fig. 1G). The V_{1/2} values (in mV) were of -33.5 ± 0.83, -59.5 ± 1.5, and -44.7 ± 1.25 for Kv7.2/Kv7.3 (n = 14), Kv7.2^{V175L}/Kv7.3 (n = 12), and Kv7.2^{V175L}/Kv7.2/Kv7.3 (n = 14) channels, respectively (p < 10⁻⁴, mutant channels vs. wild-type channel). The K slope factor was significantly decreased for Kv7.2^{V175L}/Kv7.3 channels only. The K values (in mV/e-fold) were 14.1 ± 0.72, 11.2 ± 0.58 (p < 0.01), and 14.2 ± 0.84. The activation time constants of both Kv7.2^{V175L}/Kv7.3 and Kv7.2^{V175L}/Kv7.2/Kv7.3 channels were significantly faster for currents evoked by

depolarizing voltage steps up to +15 mV and up to -15 mV, respectively, and current densities at +45 mV increased by 72% and 38% (Fig. 1H,I).

We then examined whether linopirdine, a cognitive enhancer known to inhibit M current, could restore mutant channel current density close to that of wild-type. The current density carried by Kv7.2^{V175L}/Kv7.2/Kv7.3 channels was not significantly different from that of Kv7.2/Kv7.3 channels at 1 μM of linopirdine (Fig. 2A,C). However, linopirdine did not prevent the shift of the mutant channels G/V relationship (Fig. 2D). The V_{1/2} (in mV) were -40.5 ± 1.4 (n = 13), -41.8 ± 1.3 (n = 12), and -40.9 ± 1.2 (n = 10) for 1, 3, and 10 μM of linopirdine, respectively. In contrast to linopirdine, retigabine significantly enhanced mutant channel current density and further shifted the V_{1/2} value to -75.2 ± 2.0 mV (Fig. 2C,D; n = 5). Linopirdine showed similar effects on Kv7.2/Kv7.2^{V175L} channels and restored a

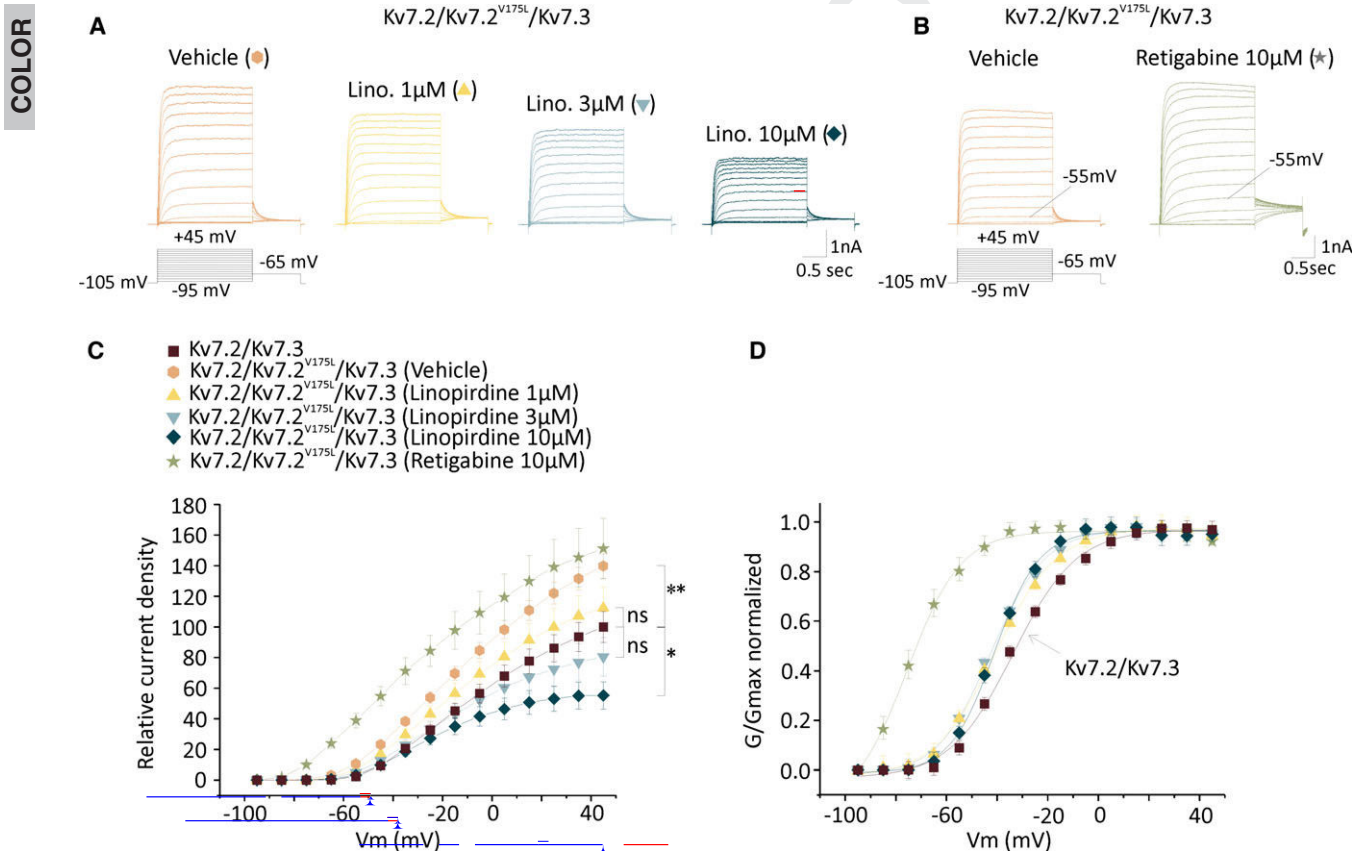


Figure 2.

Effects of linopirdine and retigabine on heteromeric mutant channels. (A and B) Currents evoked by incremental depolarizing voltage steps in the absence (vehicle) and the in presence of linopirdine at 1, 3, and 10 μM (A) or of retigabine 10 μM (B) in cells expressing Kv7.2/Kv7.2^{V175L}/Kv7.3 channels. (C) Relative current densities measured at all voltage steps showing the effects of linopirdine at 1 μM (yellow triangles), 3 μM (light blue triangles), and 10 μM (dark blue diamonds) or that of retigabine 10 μM (green stars) in cells expressing Kv7.2/Kv7.2^{V175L}/Kv7.3 channels. Values were normalized to the mean current density measured at +45 mV in CHO expressing wild-type Kv7.2/Kv7.3 subunits (dark brown squares). (D) Conductance–voltage relationship of heteromeric Kv7.2/Kv7.3 and Kv7.2/Kv7.2^{V175L}/Kv7.3 in the presence of linopirdine at 1, 3, 10 μM or retigabine 10 μM, each normalized to their maximal conductance. Continuous lines represent Boltzmann fits to the experimental data.

Epilepsia © ILAE

current density close to that of Kv7.2 channels at 1 μM (data not shown).

We then examined by western blot and biotinylation assay whether the p.V175L mutation affected the total and cell surface expression of both homomeric and heteromeric proteins (Fig. S2). The p.V175L mutation did not significantly affect the expression of the heteromeric channels, but solely increased the surface expression of the homomeric proteins.

We previously found that EOEE mutations affected the targeting of Kv7.2/Kv7.3 channels at the AIS in neurons.⁷ We examined whether the p.V175L mutation also affects the location of Kv7 channels in hippocampal neurons. We found that both wild-type Kv7.2/Kv7.3 and Kv7.2^{V175L}/Kv7.3 heteromers were expressed at the AIS and colocalized with ankyrin-G. The ratios of labeling of heteromeric channels at AIS/dendrite or AIS/soma were

not significantly different between wild-type and mutant channels (Fig. 3).

Taken together, our data suggested that the mutant protein may exert a gain of function at the AIS in the patient.

DISCUSSION

Together with a recent study,⁸ our data provide new evidence that a gain of function mutation in Kv7.2 channels can lead to EOEE. Of interest, we show here that this mutation does not impact the protein traffic, suggesting that the mutant protein may exert its pathogenic function at its proper neuronal location. The epileptic features of the patient with p.V175L mutation appeared similar to those described in patients with loss-of-function mutations in KCNQ2.^{7,10} This indicated that both types of mutations have similar deleterious consequences. It is unclear whether

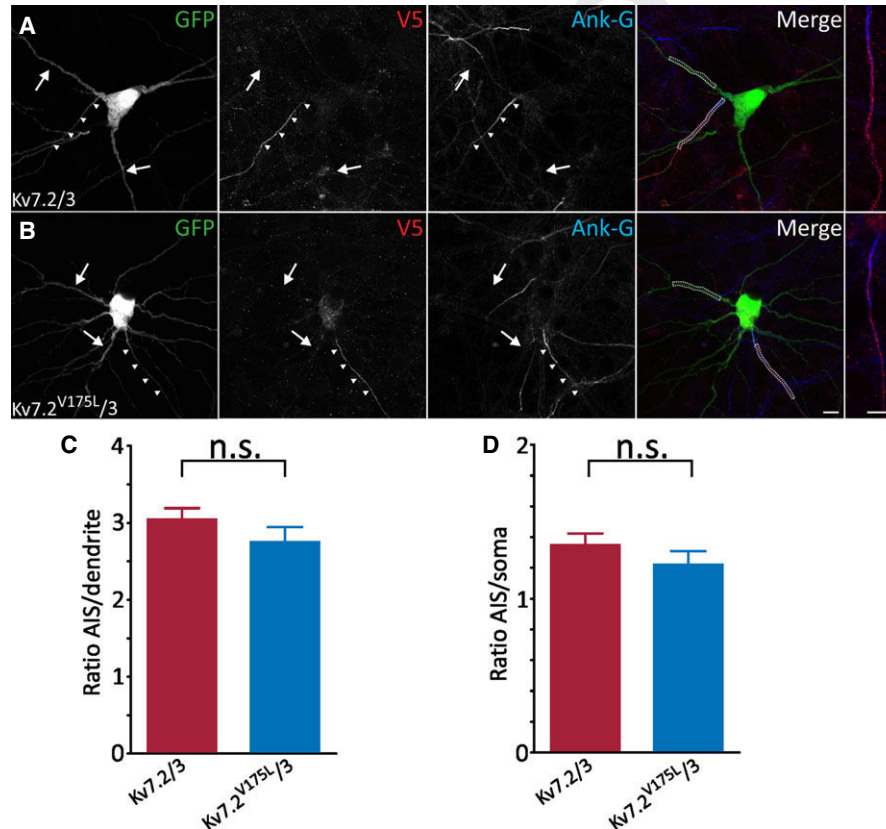


Figure 3.

The p.V175L mutation does not affect the targeting of Kv7 channels in neurons. (**A** and **B**) Cultured hippocampal neurons were transfected at 7 days *in vitro* with V5-tagged Kv7.2 (**A**) or V5-tagged Kv7.2^{V175L} constructs (**B**) together with hKv7.3 and pEGFP (green), and then were immunostained 2 days later for V5 (red) and ankyrin-G (blue) to label the AIS (arrowheads). Wild-type Kv7.2/Kv7.3 channels (**A**) were selectively addressed at the AIS where they co-localized with ankyrin-G, but were not detected in dendrites (arrows). The heteromeric association of wild-type Kv7.3 with the mutant Kv7.2^{V175L} subunit did not affect the localization of the channels at AIS (**B**). Isolated AIS labeling are shown at a higher magnification in the right panels. (**C** and **D**) The intensity of V5 staining was measured along a 20–30 μm long selection (dashed lines) within the AIS, dendrites, and soma, and the fluorescence ratios AIS/dendrite (**C**) and AIS/soma were calculated ($n = 20$ neurons for each condition). n.s. not significant (ANOVA followed by Bonferroni's test with multiple-comparisons). Scale bars: 10 μm .

Epilepsia © ILAE

the fetal growth restriction, cleft palate, and hip displacement are related to the mutation of *KCNQ2*, even if some fetal abnormalities have also been reported only in a patient with another gain of function mutation in *KCNQ2*.¹¹

The molecular mechanism by which the p.V175L mutation in S3 affects the gating of Kv7 channel is not known. Of interest, both p.V175L and p.R201H mutations induce similar changes in $V_{1/2}$ values in homomeric and heteromeric channels.⁸ It was suggested that the positively charged arginine residue at position 201 in S4 contracts electrostatic interactions with negatively charged residues in S2 (E140) and S3 (D172), thereby leading to the stabilization of the voltage-sensing domain at resting state.⁸ The stability of this domain is reduced by the replacement of the arginine by a histidine, which is less charged at pH 7. Both valine and leucine residues are not ionized at physiologic pH. These two residues have similar properties but differ only by their radical, leucine being a bulkier residue than valine. We thus suspect that this substitution may change the conformation of S3 and impair the electrostatic interaction between the residues in S4 and S2–S3 in a manner similar to the p.R201H mutation. In addition, we found that the p.V175L increased the surface expression of homomeric mutant channels, but not heteromeric channels with Kv7.3. This effect may contribute to the increase in current densities observed for homomeric mutant channels. Previously, we also found that p.A294V mutation affected the expression of homomeric Kv7.2 channel, but not heteromeric channels.⁷ Together, this suggests that the association with Kv7.3 is protective and may partly compensate for conformational changes and restore a normal protein sorting. However, these results were obtained in heterologous systems and may not necessarily reflect what is observed in vivo.

It is difficult to understand how the p.V175L mutation can be responsible for the epileptic disorder since in principle, at the cellular level, the mutant channel should dampen neuronal excitability. It may be, as suggested by Miceli et al.,⁸ with other gain of function mutations that interneurons are more impacted than pyramidal cells by an increase in M current, thus creating an imbalance between excitation and inhibition.

It is also unclear why both gain- and loss-of-function mutations lead to the same phenotype. One may speculate that no matter the impact on Kv7 channel activity, what is important is that these alterations change the dynamics of early patterns of activity that are required for proper brain development. Such patterns of activity have been described in both human premature brain (the delta brush) at stages where Kv7.2 channels are expressed,^{12,13} and in rodent brain (spindle burst and early gamma oscillations) during the first postnatal week of life.^{12–14} It has been proposed that these patterns play an important role in the formation of cortical circuits before the onset of any external sensory input.¹³ Of interest, this developmental stage corresponds in rodent to a critical period, where a

dominant negative mutation in *KCNQ2* lead to an increase in the rate of spindle burst and later to epilepsy and pathologic behavior.¹⁵

KCNQ2-related EOOEs are resistant to many antiepileptic drugs. M-current increasing compounds (i.e., retigabine, ICA-27243, SF0034, and others) first appeared as promising treatment tools, since most Kv7.2 mutations associated with EOOE reduced Kv7 channel activity.¹ In light of our results and those of others,⁸ these compounds may be inappropriate and may even be more deleterious for patients, while Kv7-channel inhibitors such as linopirdine could bring about a potential benefit. Functional analyses of EOOE mutations are thus critical for selecting therapeutic options. Animal models of EOOE are also needed to unravel how *KCNQ2* mutations affect brain development and to find novel therapeutic alternatives.¹⁵

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Thomas Jentsch and Gisèle Alcaraz for the generous gift of plasmids, antibodies, and critical advice. This work was supported by the Agence National pour la Recherche (ANR-14-CE13-0011-02, EPIK), ERA-Net for Research on Rare Diseases (ANR-13-RARE-0001-01; JD), and the Association Française contre les Myopathies (MNMI 2012-14580; JD). This work was also supported by INSERM, CNRS, Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) and Aix-Marseille Université.

DISCLOSURE

None of the authors has any conflict of interest to disclose. We confirm that we have read the Journals' position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

REFERENCES

1. Maljevic S, Lerche H. Potassium channel genes and benign familial neonatal epilepsy. *Prog Brain Res* 2014;213:17–53.
2. Jentsch TJ. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 2000;1:21–30.
3. Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC, et al. *KCNQ2* is a nodal K⁺ channel. *J Neurosci* 2004;24:1236–1244.
4. Shah MM, Migliore M, Valencia I, et al. Functional significance of axonal Kv7 channels in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:7869–7874.
5. Battefeld A, Tran BT, Gavrilis J, et al. Heteromeric Kv7.2/7.3 channels differentially regulate action potential initiation and conduction in neocortical myelinated axons. *J Neurosci* 2014;34:3719–3732.
6. Orhan G, Bock M, Schepers D, et al. Dominant-negative effects of *KCNQ2* mutations are associated with epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* 2014;75:382–394.
7. Abidi A, Devaux J, 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.
8. Miceli F, Soldovieri MV, Ambrosino P, et al. Early-onset epileptic encephalopathy caused by gain-of-function mutations in the voltage sensor of Kv7.2 and Kv7.3 potassium channel subunits. *J Neurosci* 2015;35:3782–3793.
9. Milh M, Boutry-Kryza N, Sutera-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.

10. Weckhuysen S, Mandelstam S, Suls A, et al. KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* 2012;71:15–25.
11. Weckhuysen S, Ivanovic V, Hendrickx R, et al. Extending the KCNQ2 encephalopathy spectrum: clinical and neuroimaging findings in 17 patients. *Neurology* 2013;81:1697–1703.
12. Kanaumi T, Takashima S, Iwasaki H, et al. Developmental changes in KCNQ2 and KCNQ3 expression in human brain: possible contribution to the age-dependent etiology of benign familial neonatal convulsions. *Brain Dev* 2008;30:362–369.
13. Khazipov R, Luhmann HJ. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci* 2006;29:414–418.
14. Minlebaev M, Colonnese M, Tsintsadze T, et al. Early γ oscillations synchronize developing thalamus and cortex. *Science* 2011;334:226–229.
15. Marguet SL, Le-Schulte VT, Merseburg A, et al. Treatment during a vulnerable developmental period rescues a genetic epilepsy. *Nat Med* 2015;21:1436–1444.

SUPPORTING INFORMATION

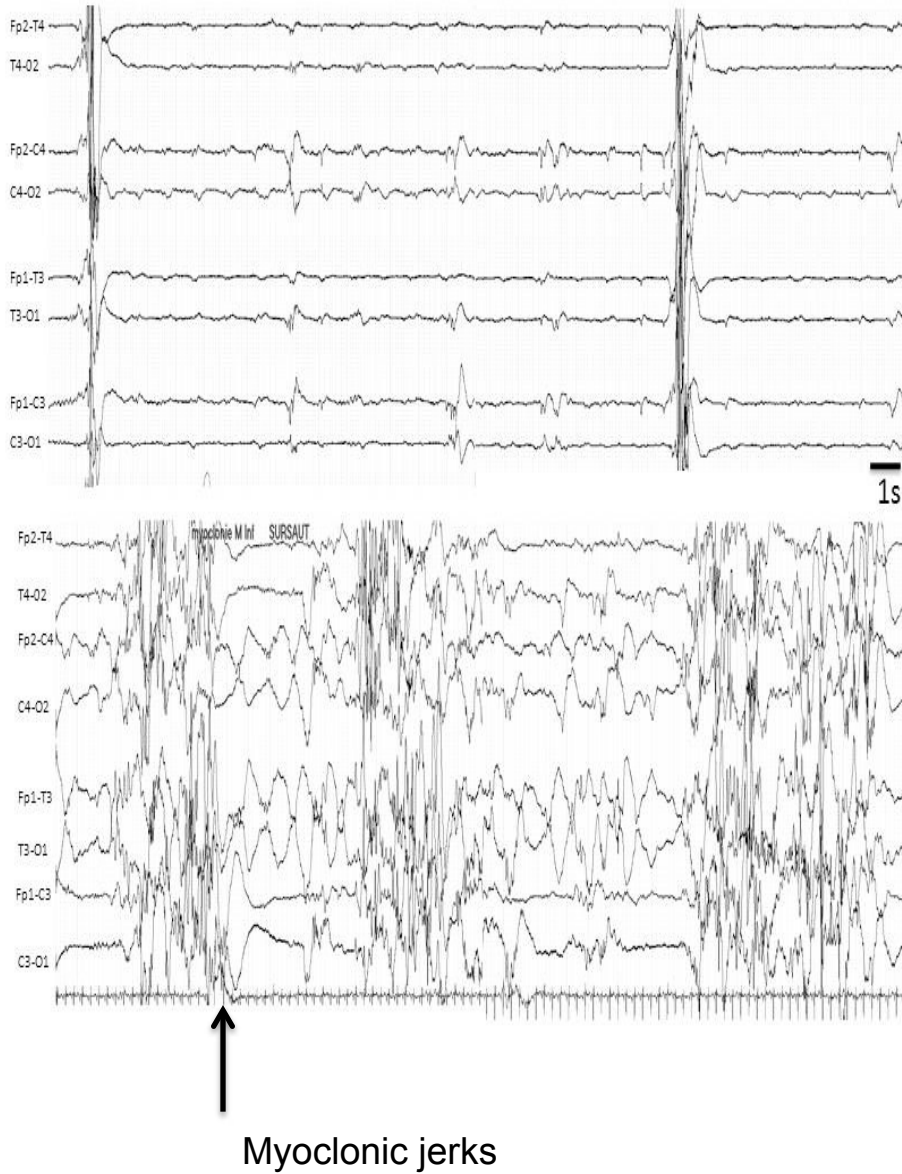
Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

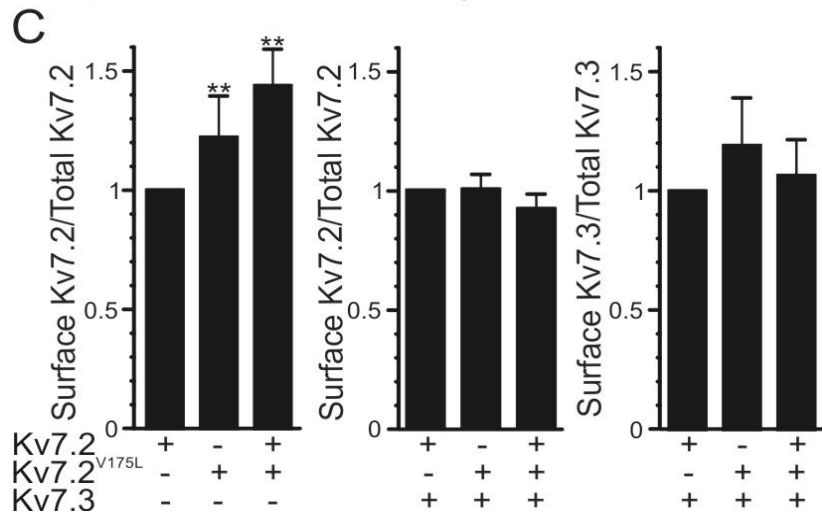
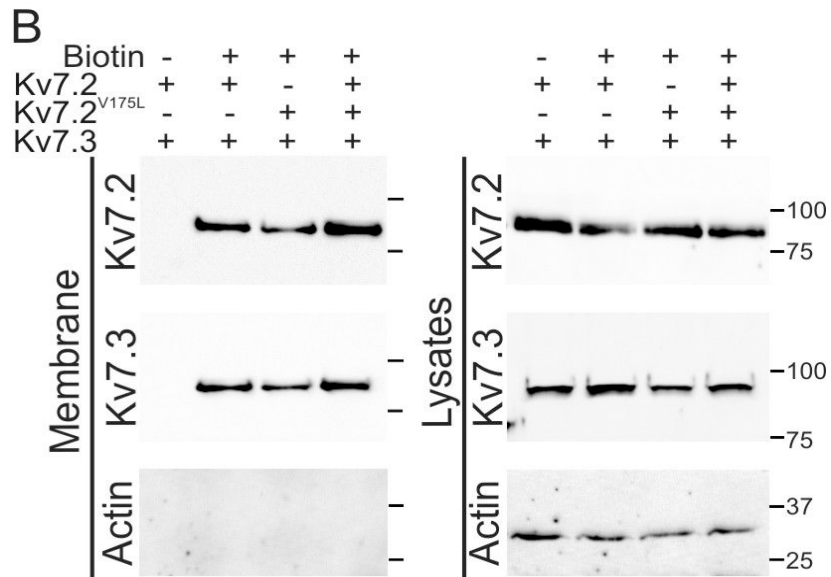
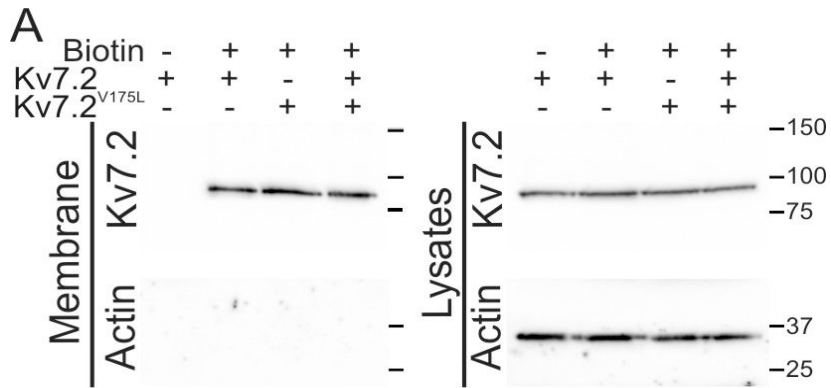
Figure S1. Representative interictal EEG at day 1 (top) and at 6 weeks of age (bottom).

Figure S2. Total and surface expression of homomeric and heteromeric channels.

A Kv7.2 mutation associated to early onset epileptic encephalopathy with suppression-burst enhances Kv7/M channel activity.

Jérôme Devaux¹, Affef Abidi^{2,3}, Agathe Roubertie^{4,5}, Florence Molinari^{6,7}, Hélène Becq^{6,7}, Caroline Iacoste^{2,3,8}, Laurent Villard^{2,3}, Mathieu Milh^{2,3,8}, and Laurent Aniksztejn^{6,7}





II.4. ETUDE DE LA MUTATION P.V175L DU GENE *KCNQ2* (ARTICLE 3: DEVAUX ET AL, SOUS PRESSE)

J'ai souhaité étudier la mutation atypique p.V175L puisqu'elle a été identifiée dans un cas sévère d'EEP et est située dans le segment S3 de la sous-unité Kv7.2. Des mutations dans ce segment n'ont jusqu'à présent pas été étudiées dans la littérature, les mutations qui ont fait l'objet d'études fonctionnelles sont le plus souvent localisées dans les segments S2, S4-S6 et la partie C-terminale (Weckhuysen, 2012 ; Saitsu 2012 ; Milh, 2013, Tableau 4).

La patiente porteuse de la mutation p.V175L est une fille dont le phénotype clinique est le plus sévère de la cohorte EEP. Dès son premier jour de vie, cette patiente était hypertonique et l'EEG présentait un profil de *suppression-burst* avec des périodes de silence plus longues que les périodes d'activité (Figure 1 supplémentaire de l'article 3). Les crises ont commencé dès la deuxième semaine de vie avec des myoclonies associées à un profil EEG toujours altéré de type *suppression-burst* ainsi que des pics d'activités symptomatiques. La patiente est décédée à 18 mois d'une mort subite et inexplicée en épilepsie (SUDEP).

Nous avons d'abord étudié les propriétés intrinsèques du courant porté par le canal muté, après transfection et enregistrement de cellules CHO en culture.

- En configuration homomérique, le courant Kv7.2^{V175L} avec ou sans la sous-unité Kv7.2 provoque un déplacement de la courbe de potentiel vers des valeurs plus hyperpolarisées (Tableau 10 et Figure 1 de l'Article 3). Lors de ces expériences, nous avons modifié le protocole présenté plus haut, en commençant les stimulations de voltage à un potentiel de repos de -105 mV. En effet, les canaux comportant des sous-unités Kv7.2^{V175L} sont déjà actifs aux premiers pas de potentiel utilisés pour la mutation p.A294V (-85 mV) ce qui ne permet pas d'obtenir un courant analysable dans sa globalité. Pour la configuration Kv7.2^{V175L}, nous avons constaté un décalage de -37 mV et pour la configuration Kv7.2^{V175L}-Kv7.2, un décalage de -15 mV pour la $V_{1/2}$ en comparaison à la configuration sauvage. Les sous-unités Kv7.2 sauvages ne restaurent donc pas complètement le courant. De plus, nous avons observé une

augmentation de densité de courant de 90 % et 45% pour la configuration Kv7.2^{V175L} et Kv7.2^{V175L}-Kv7.2 à +45 mV, respectivement. La cinétique du canal, quant à elle, est plus rapide pour les canaux mutés (Figure 1C de l'article 3).

- En configuration hétéromérique, la mutation p.V175L provoque également un déplacement de la courbe de potentiel vers des valeurs plus hyperpolarisées. Ce déplacement est de -26 mV pour la configuration Kv7.2^{V175L}-Kv7.3 et de -11 mV pour la configuration Kv7.2^{V175L}-Kv7.2-Kv7.3. La cinétique du canal est également plus rapide pour les configurations hétéromériques (Tableau 10 ; Figure 1H de l'article 3).

Nos expériences montrent que la mutation p.V175L augmente la densité de courant et la cinétique d'ouverture du canal KCNQ2 quelle que soit la configuration testée, ce qui indique que cette mutation est de type gain de fonction. Des mutations de type gain de fonction ont été récemment décrites dans la littérature et sont localisées dans les segments S2 et S4 (Miceli, 2015).

Tableau 10 : Etude du courant par électrophysiologie sur cellules CHO transfectées par les plasmides pcDNA3-KCNQ2 sauvage, p.V175L avec ou sans le plasmide pcDNA3-KCNQ3

Les résultats obtenus pour les configurations mutées sont comparées à la forme sauvage correspondante (Kv7.2, pour la forme homomérique et Kv7.2-Kv7.3 pour la forme hétéromérique). Les densités sont comparées à +45mV.

Résultats simplifiés de l'électrophysiologie				
Configuration	N	V _{1/2} (mV)	k (mV/e-fold)	Densité de courant
Kv7.2	10	-25 +/- 1.9	12.7 +/- 1.04	--
Kv7.2 ^{V175L}	13	-62.3 +/- 1.09	13.05 +/- 0.89	90%
Kv7.2 ^{V175L} Kv7.2	8	-40.4 +/- 2.9	13.63 +/- 0.49	45%
Kv7.2 -Kv7.3	14	-33.5 +/- 0.83	14.1 +/- 0.72	--
Kv7.2 ^{V175L} -Kv7.3	12	-59.5 +/- 1.5	11.2 +/- 0.58	72%
Kv7.2- Kv7.2 ^{V175L} -Kv7.3	14	-44.7 +/- 1.25	14.2 +/- 0.84	38%

Pour ce gain de fonction, nous avons également testé une molécule thérapeutique, la linopirdine à différentes concentrations (1, 3 et 10 µM) (Figure 2 de l'article 3). Nous avons choisi cette molécule car elle permet de provoquer un décalage dépolarisant de la courbe de dépendance au voltage des canaux KCNQ/M, ce qui aurait en théorie la capacité de bloquer l'effet hyperpolarisant de la mutation p.V175L. En configuration homomérique Kv7.2^{V175L}, nous avons remarqué que la linopirdine est effective dès 1 µM sur la densité de courant. Cependant, elle ne permet pas de retrouver une dépendance au voltage similaire au canal sauvage. En configuration hétéromérique, la linopirdine permet de diminuer également la

densité de courant dès 1 μ M et le décalage hyperpolarisant de la courbe de dépendance au voltage reste conservé. Cette molécule est donc partiellement efficace pour bloquer les effets de la mutation p.V175L puisqu'elle permet de restaurer la densité de courant.

Dans toutes les configurations, nous avons observé une augmentation de densité de courant qui pourrait être due à une quantité plus importante de protéines au niveau de la membrane plasmique. Des expériences d'immunoblot et de biotinylation des protéines de surface ont donc été réalisées (Figure supplémentaire 2 de l'article 3). Les résultats montrent que la mutation p.V175L augmente la quantité de canaux homomériques à la surface de la cellule mais qu'elle n'a pas d'effet sur les canaux hétéromériques. L'augmentation de courant n'est donc pas uniquement due à une quantité plus importante de protéine à la membrane plasmique mais pourrait être également due à des défauts de dépendance au voltage. Cette dernière hypothèse est soutenue par le fait que la courbe de dépendance au voltage est décalée vers des valeurs hyperpolarisées pour la mutation p.V175L.

Pour compléter l'étude de cette mutation, nous avons souhaité observer si la localisation des canaux pouvait être modifiée par la mutation p.V175L, comme ce que nous avons décrit pour la mutation p.A294V. Nous avons donc réalisé les mêmes expériences de localisation à l' AIS. Pour toutes les configurations testées, il y a une conservation de la localisation des canaux mutés à l' AIS. La mutation p.V175L n'impacte donc pas la localisation des canaux à l' AIS (Figure 3 de l'article 3).

Cet article nous a permis de démontrer que la mutation p.V175L localisée dans le segment S3 sous-unité Kv7.2 était une mutation gain de fonction.

III. Développement de nouveaux modèles pour l'étude fonctionnelle de *KCNQ2* et la recherche préclinique

III.1. MISE EN PLACE D'UN MODELE DE LIGNEES STABLES POUR LA RECHERCHE DE NOUVELLES MOLECULES THERAPEUTIQUES

Le mécanisme de délocalisation des canaux au compartiment somatodendritique que nous avons découvert pour la mutation p.A294V n'est pas observable pour toutes les autres mutations comme le montrent les expériences sur la mutation p.V175L. Un défaut dans les propriétés du courant I_M reste aujourd'hui le mécanisme pathologique le plus représenté parmi ceux provoqués par les mutations de Kv7.2. Il est donc nécessaire de rechercher des molécules capables de moduler le courant M des canaux Kv7.2 et Kv7.3. Jusqu'à aujourd'hui, il n'existe pas de solution thérapeutique pour les patients porteurs de mutations dans le gène *KCNQ2*. L'utilisation de la rétigabine est restreinte par la Haute Autorité de Santé (HAS) dans un avis du 2 avril 2014 et ne peut être utilisée en pédiatrie car les patients traités peuvent présenter des effets secondaires importants tels qu'une pigmentation d'origine inconnue des tissus oculaires, de la peau, des lèvres et des ongles chez les patients traités.

Au cours de ma dernière année de thèse, j'ai souhaité mettre au point un modèle afin de tester plus rapidement et efficacement de nouvelles molécules agissant sur les canaux potassiques. J'ai sélectionné le kit FluxOR™ Potassium Ion Channel Assay (Lifetechnologie). Le principe de ce kit est présenté Figure 24. Des cellules exprimant à leur membrane des canaux potassiques sont incubés avec le réactif FluxOR™ sensible au thallium et non fluorescent. Ce réactif est un acétoxyméthyl (AM) ester non fluorescent qui pénètre dans les cellules par perméabilité membranaire. A l'intérieur du cytoplasme, il est clivé par les estérases endogènes en un réactif sensible au thallium. Un composant chimique, la probénécide qui permet de bloquer les pompes à anions organiques est ajoutée aux cellules et permet de bloquer son extrusion. Les cellules sont ensuite incubées avec le thallium et un stimulus (le potassium) permet d'activer la membrane en créant une légère dépolarisation. Les canaux potassiques vont s'ouvrir et le thallium va donc diffuser en fonction de son

gradient de concentration à l'intérieur de la cellule. Il va ensuite réagir avec le réactif FluxOR™ sensible au thallium. Cette réaction va provoquer l'émission d'une fluorescence, proportionnelle au nombre de canaux ouverts. Cette fluorescence peut ensuite être reconnue par un lecteur approprié. Ce kit est utilisable sur cellules cultivées en plaque 96 ou 384 puits et permettrait donc de tester rapidement l'effet de nombreuses molécules thérapeutiques sur l'ouverture des canaux potassiques.

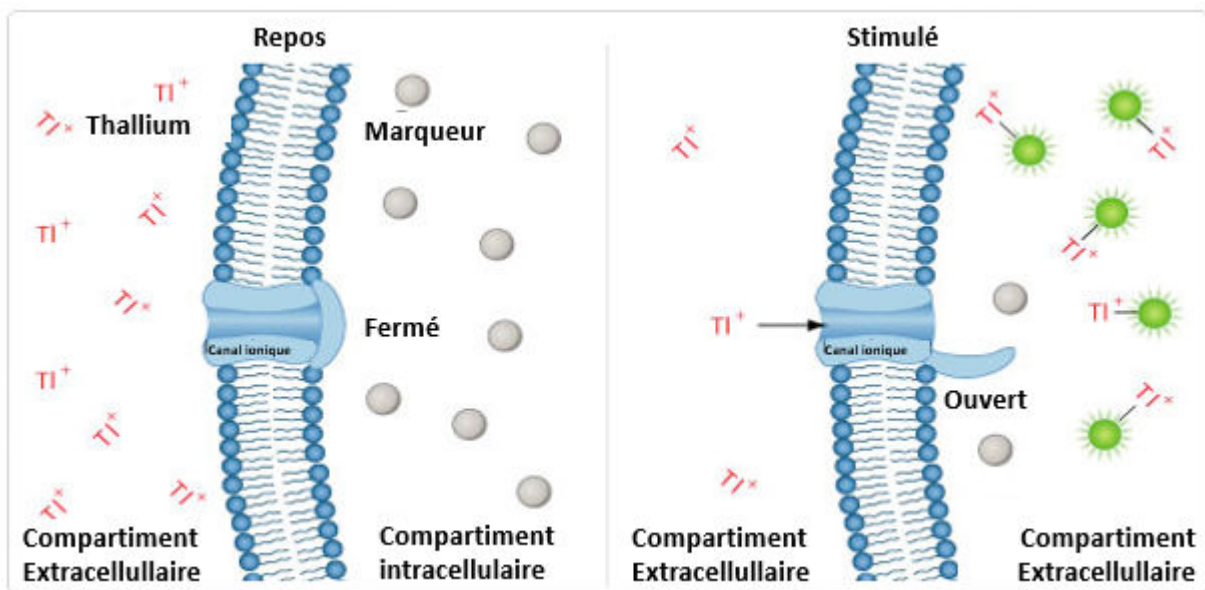


Figure 24 : Représentation schématique du principe du kit FluxOR™ Potassium Ion Channel Assay (*Life technologies*).

Pour réaliser ces expériences, il était nécessaire de générer des lignées de cellules exprimant la protéine Kv7.2 de façon stable et non transitoire afin d'assurer l'obtention d'un signal comparable entre les expériences en s'affranchissant de la variabilité du taux de transfection. J'ai initié la mise en place de ce nouveau modèle. Tout d'abord, j'ai choisi deux mutations connues pour abolir le courant de manière dominant-négative, les mutations p.T287N et p.T274M. J'ai souhaité ainsi agir en première intention sur les mutations les plus sévères de notre cohorte et permettre la restauration d'un courant complètement aboli. Je n'ai pas sélectionné la mutation p.A294V car elle ne réduit pas suffisamment le courant pour observer une différence, ni la mutation p.V175L car le canal pourrait être actif dans les conditions expérimentales utilisées. Nous avons en notre possession un plasmide pcDNA3-KCNQ2 où une cassette de résistance à la néomycine permet la sélection des cellules en culture. Nous avons souhaité réaliser des co-transfections avec le plasmide pcDNA-KCNQ3

afin d'obtenir un courant potassique d'amplitude plus importante. Le courant M généré par les configurations hétéromériques permet d'amplifier le signal. Pour cela, il était nécessaire que le plasmide codant la protéine Kv7.3 ait une autre cassette de résistance que la néomycine. J'ai donc sous-cloné l'ADNc du gène *KCNQ3* dans le plasmide pCMV-hygromycine qui possède le gène de résistance pour l'hygromycine et le promoteur fort du cytomégalovirus.

En parallèle, j'ai testé l'effet de ces deux antibiotiques (hygromycine et néomycine) sur les cellules CHO non transfectées en culture afin d'observer la concentration minimale où les cellules ne sont plus résistantes à l'antibiotique. Puis, j'ai réalisé des transfections du plasmide pcDNA3-KCNQ2 avec ou sans le plasmide pcDNA3-KCNQ3. J'ai sélectionné ensuite les clones par dilution limite sur plaque 96 puits. Les résultats de cette mise au point sont présentés dans le Tableau 11. Les expériences de sélection pour la mutation p.T274M sont encore en cours.

Tableau 11 : Liste des clones obtenus après transfection et sélection par les antibiotiques Néomycine et Hygromycine

Configuration	Nombre de clones sélectionnés
Kv7.2	3
Kv7.2 ^{T287N}	3
Kv7.2 ^{T274M}	En cours
Kv7.3	3
Kv7.2-Kv7.3	3
Kv7.2 ^{T287N} -Kv7.3	3
Kv7.2 ^{T274M} -Kv7.3	En cours

A la suite de cette sélection, nous souhaitons confirmer la présence de l'intégration du cDNA humain de *KCNQ2* dans l'ADN génomique des cellules CHO en utilisant la PCR, vérifier la présence de l'expression de la protéine en utilisant la technique d'immunoblot et tester le courant potassique I_M à l'aide de la technique de patch-clamp sur cellule entière.

Mon équipe utilisera ces lignées stables avec le kit FluxOR™ Potassium Ion Channel Assay, pour tester des banques de molécules thérapeutiques.

III.2. MISE EN PLACE D'UN MODELE NEURONAL POUR L'ETUDE DE L'IMPACT DES MUTATIONS DE *KCNQ2*

Les modèles utilisés actuellement pour l'étude des mutations de *KCNQ2* sont les lignées cellulaires (CHO, HEK293, oocytes de xénope...) et les neurones primaires issus de souris sauvages. Le modèle de cellules CHO est très utile pour la caractérisation rapide des canaux cependant, l'utilisation de cellules non neuronales, non excitables et surexprimant la protéine Kv7.2 pose de nombreux problèmes de relevance physiologique. Les neurones primaires issus de souris sauvages expriment déjà la forme sauvage de Kv7.2-Kv7.3 lorsqu'ils sont transfectés par les plasmides codant pour Kv7.2 et Kv7.3. Ce modèle présente l'avantage d'un contexte neuronal mais il reste limité par l'utilisation de protéines étiquetées (V5 ou HA) et de dosage génique non contrôlé.

Les cellules souches pluripotentes induites (iPS) sont désormais utilisées dans de nombreuses études (Liu, 2013). Dans notre cas, elles permettront d'établir un modèle plus pertinent, en permettant l'obtention des neurones issus de patients EEP. J'ai commencé la différenciation en neurones de cellules iPS humaines issues de patients atteints d'EEP. Nous avons choisi deux patients porteurs respectivement des mutations p.T287N et p.L203P. Cette étude s'est déroulée en plusieurs étapes :

- 1- des biopsies de peau ont été réalisées sur deux patients à l'hôpital de la Timone ;
- 2- les fibroblastes des patients ont été mis en culture à l'hôpital de la Timone puis transférés dans notre laboratoire qui dispose d'une plateforme spécialisée dans la production et la caractérisation de cellules iPS.
- 3- les fibroblastes des patients ont été reprogrammés en cellules iPS sur notre plateforme. Lors de la reprogrammation, des clones apparaissent et sont sélectionnés sur des critères de capacité de multiplication sans différenciation aléatoire et de stabilité de la pluripotence.

Deux clones ont été choisis pour chaque lignée issue de patients et certains sont encore en cours de caractérisation (Tableau 12).

Tableau 12 : Liste des clones de cellules souches pluripotentes induites obtenus après reprogrammation par la plateforme spécialisée dans la biologie cellulaires des cellules iPS (UMRS_910)

Les quatre clones **en gras** et soulignés correspondent à ceux choisi pour la différenciation

Liste des clones	Mutation
16312-AA	p.L203P
16312-Ks	
16312-Bs	
16312-I	
16312-D	
16312-M	
16312-EE	
16312-P	
16312-F	
16312-Qs	
16312-Gs	
16312-Us	
16312-Vs	
<u>16312 N</u>	
<u>16312 TS</u>	
12528-As	p.T287N
12528-Es	
<u>12528-F</u>	
<u>12528-g</u>	
12528-H	
12528-I	

Pour la différenciation en neurones, j'ai souhaité commencé par le clone 16312-TS qui a été le premier à être caractérisé. En parallèle, j'ai utilisé un clone contrôle (Hff-19) fourni par notre plateforme.

Au sein de notre unité de recherche, une équipe travaille sur la différenciation de cellules iPS en neurones. Cette équipe a mis au point un protocole de différenciation (Badja, 2014) qui est désormais utilisé en routine au sein du laboratoire. Ce protocole permet la différenciation des cellules iPS en neurones dopaminergiques en deux étapes successives : 1- production de progéniteurs neuronaux, 2- maturation de ces progéniteurs en neurones dopaminergiques (Figure 24).

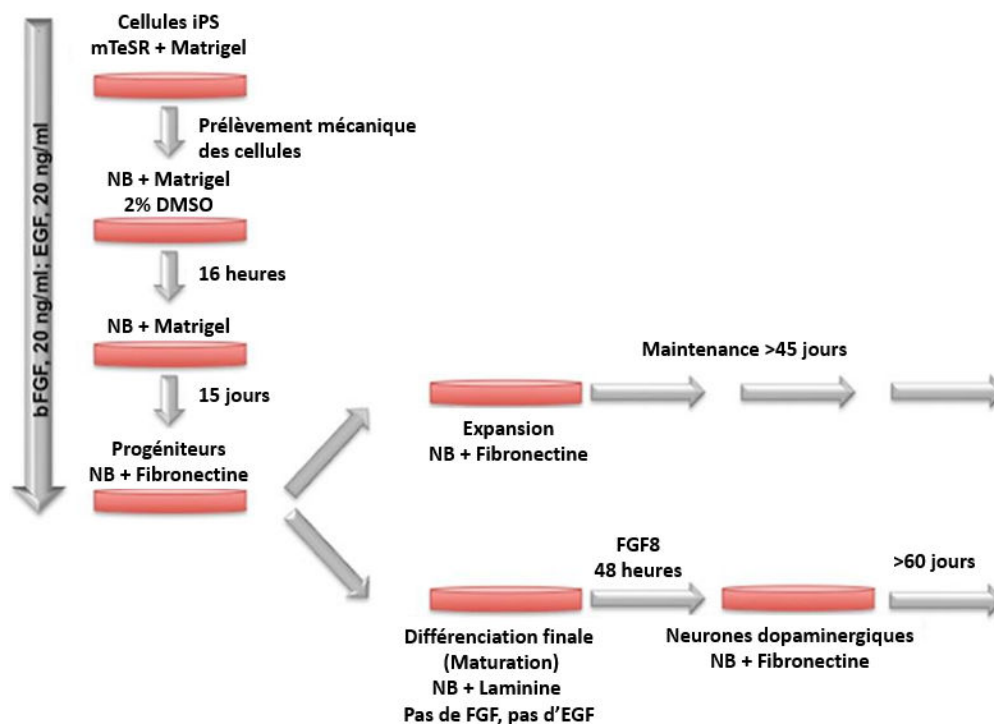


Figure 24 : Protocole simplifié de la technique utilisée pour la différenciation des cellules souches pluripotentes induites en neurones dopaminergiques (D'après *Badja, 2014*). Les cellules iPS sont mises en culture dans le milieu NB (avec des facteurs de croissance FGF et EGF) contenant 2% de DMSO sur des plaques prétraitées au Matrigel. Les cellules progénitrices sont ensuite passées dans le milieu NB (avec des facteurs de croissance FGF et EGF) sur des boîtes contenant une matrice de fibronectine. Les cellules sont cultivées en changeant le milieu NB (avec des facteurs de croissance FGF et EGF) tous les jours. La maturation s'effectue ensuite en induisant les cellules en utilisant un milieu sans facteurs de croissance et en ajoutant des facteurs pour guider les cellules vers la voie de maturation choisie (ici, les neurones dopaminergiques en utilisant le FGF8). NB : neurobasal

Nous avons débuté la première étape de ce protocole en induisant les cellules iPS 16312-TS et Hff-19 dans un milieu neurobasal complet contenant les facteurs de prolifération EGF et FGF (Figure 25). Nous avons observé progressivement un changement dans la forme de ces cellules. En effet, les cellules iPS sont rondes et poussent en colonie, lors de l'induction de la différenciation neuronale, elles deviennent progressivement plus allongées (Figure 25B). Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence, puis elles sont détachées du support à l'aide d'une enzyme, la dispase, qui permet d'obtenir des cellules en amas. Elles sont ensuite remises en culture sur des boîtes qui ont été préalablement recouvertes d'une matrice de fibronectine et de poly- D-lysine. Les cellules se divisent, s'isolent et commencent à former des colonies appelées neurosphères (Figure 25C). Le protocole développé par Badja et al. (2014) permet la formation de cellules mésenchymateuses (progéniteurs musculaires) et de progéniteurs

neuronaux en même temps. Les deux types ne se mélangent pas, n'ont pas la même réfringence à la lumière et il est possible de les séparer de façon mécanique, en choisissant des neurosphères (Figure 25C) ou une zone de cellules neuronales (Figure 25D). Après plusieurs essais, nous avons sélectionné principalement des neurosphères qui sont facilement visualisables et accessibles. Celles-ci ont ensuite été traitées à l'aide d'une enzyme, l'acutase, afin de les séparer et de remettre en culture des cellules isolées. Cette technique est reproduite plusieurs fois pour exclure les progéniteurs musculaires de l'échantillon. Après de nombreux passages, nous avons pu obtenir des progéniteurs neuronaux uniquement pour la lignée 16312-TS. Pour la lignée contrôle Hff-19, je n'ai pas pu sélectionner des progéniteurs neuronaux qui étaient déjà trop peu nombreux lors de l'induction des cellules iPS par le milieu neurobasal. Avant de procéder à la deuxième étape correspondant à la maturation de ces progéniteurs en neurones dopaminergiques, nous avons souhaité tester leur engagement dans la voie neuronale. Nous avons donc réalisé des études d'expression et des marquages immunocytochimiques (ICC) (Tableau 13). La caractérisation de ces cellules me permet de vérifier l'engagement dans la lignée neuronale, de confirmer la sélection des progéniteurs neuronaux en comparaison aux progéniteurs mésenchymateux et d'éliminer la présence d'autres types cellulaires.

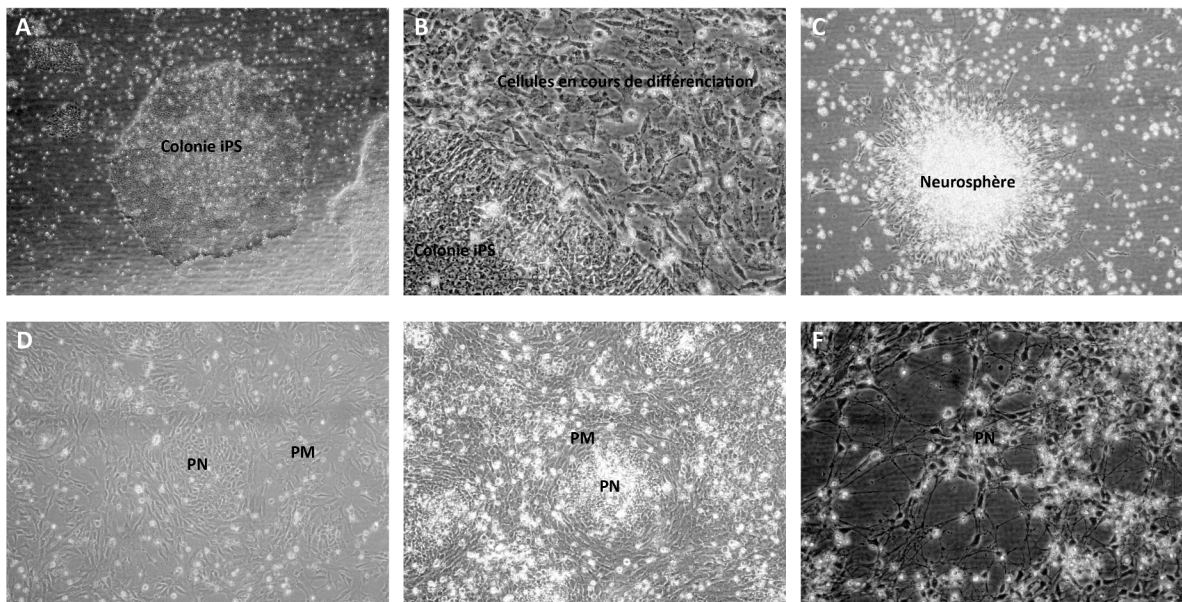


Figure 25 : Etude par microscopie optique en lumière blanche de la morphologie des cellules iPS du clone 16312-TS (A) et morphologie des progéniteurs neuronaux et musculaires (B-F)

Les images sont prises à 0 jours (A), 5 jours (B), 15 jours (C), 21 jours (D), 21 jours (E) et 35 jours (F) après induction de la différenciation. *PM* : progéniteurs musculaires *PN* progéniteurs neuronaux Grossissement *x40*

Pour l'étude d'expression, nous avons réalisé une extraction des ARN des progéniteurs neuronaux de la lignée 16312-TS, puis nous avons utilisé la technique de transcription inverse (RT) pour produire des ADNc. Nous avons ensuite amplifié par PCR classique les ADNc en utilisant des amorces spécifiques de chaque marqueur (Annexe 1). Pour la caractérisation, nous avons choisi les marqueurs suivants (Tableau 13) :

- Des marqueurs de progéniteurs neuronaux précoces et tardifs (beta III-tubuline, nestine, NCAM, PAX6, SOX1, DCX, MAP2).
- Des marqueurs de cellules mésenchymateuses (CAV-3, HDAC-5, MUSK).
- Un marqueur de cellules gliales (GFAP)
- Des marqueurs de cellules ganglionnaires de la rétine (OPSIN-1, RAX2).
- Des marqueurs de différents tissus (KRT19, HNF1B, SOX1).

Tableau 13 : Caractérisation des progéniteurs obtenus après différenciation du clone TS de la lignée 16312 en utilisant la technique de RT-PCR et la technique d'immunocytochimie.

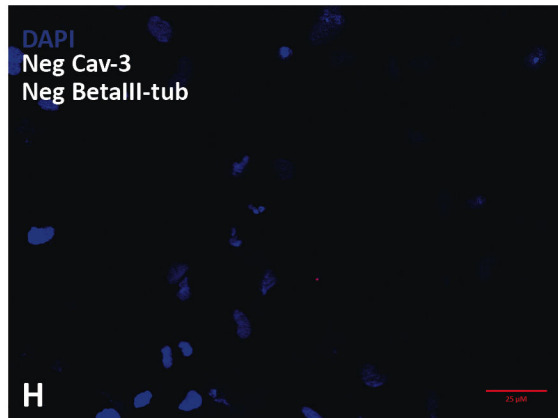
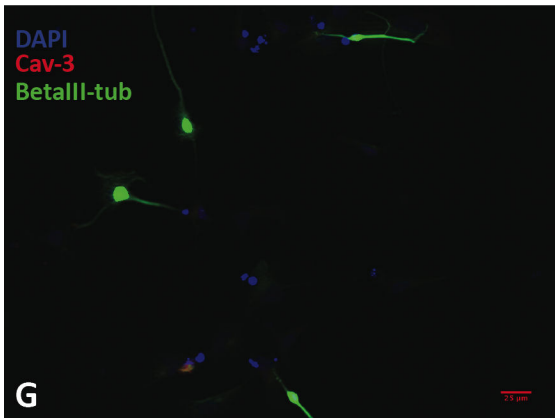
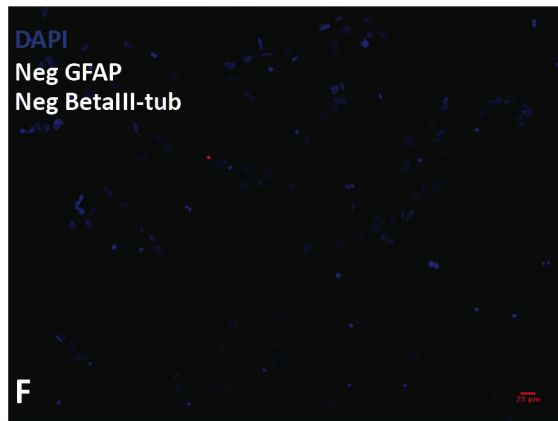
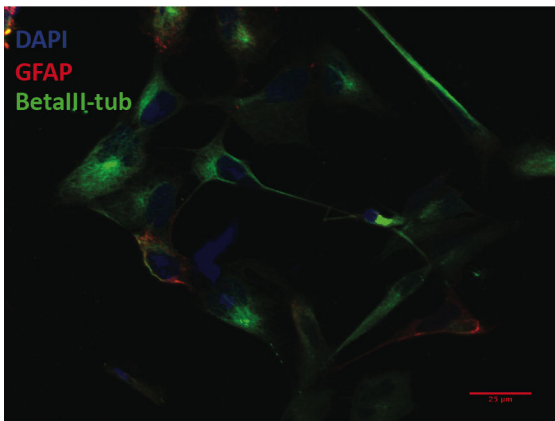
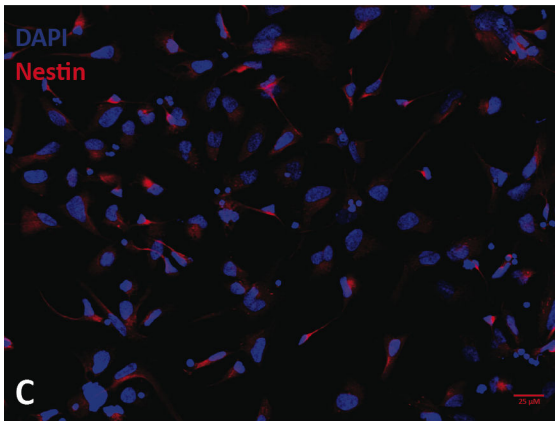
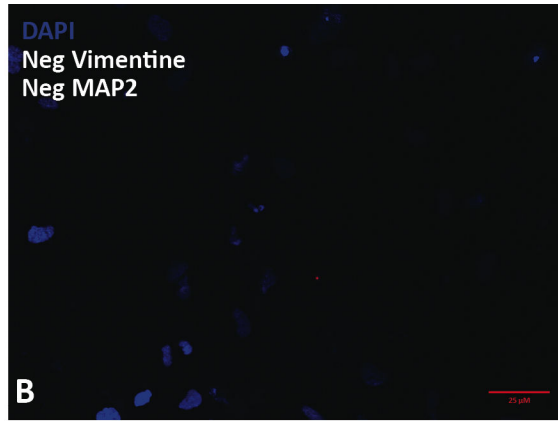
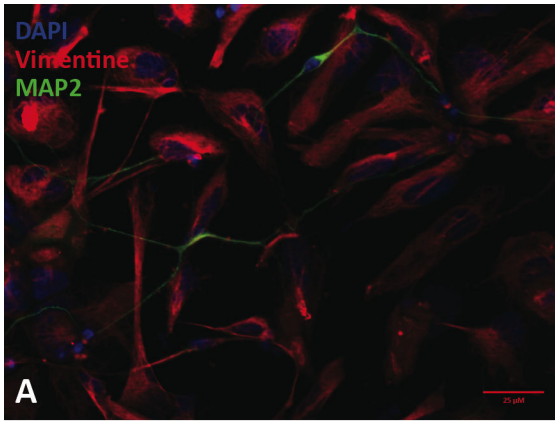
Marqueurs	Type de cellules exprimant le marqueur	Cellules positives ?
Immunocytochimie		
Beta III-tubuline	Progéniteurs neuronaux tardifs	+
nestine	Progéniteurs neuronaux	+++
vimentine	Progéniteurs neuronaux et gliales	++
MAP2 (<i>Microtubule-associated protein 2</i>)	Progéniteurs neuronaux tardifs	+
GFAP (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)	Progéniteurs de cellules gliales	+
Cav-3	Progéniteurs musculaires	+
Kv7.2	Protéine d'intérêt	++
RT-PCR		
Beta III-tubuline	Progéniteurs neuronaux tardifs	+
nestine	Progéniteurs neuronaux	+
NCAM (<i>Neural cell adhesion molecule</i>)	Progéniteurs neuronaux	+
PAX6 (<i>Paired box protein Pax-6</i>)	Progéniteurs neuronaux	+
SOX1 (<i>Sex determining region Y-box 1</i>)	Progéniteurs neuronaux	+
DCX (<i>Doublecortin</i>)	Progéniteurs neuronaux	+
MAP2	Progéniteurs neuronaux	En cours
CAV-3 (<i>Caveolin-3</i>)	Progéniteurs musculaires	-
HDAC-5 (<i>Histone deacetylase 5</i>)	Progéniteurs musculaires	-
MUSK (<i>Muscle-Specific Kinase</i>)	Progéniteurs musculaires	-
Opsin-1 (<i>gène OPN1MW</i>)	Cellules ganglionnaires de la rétine	-
RAX-2 (<i>Retina And Anterior Neural Fold Homeobox 2</i>)	Cellules ganglionnaires de la rétine	-
KRT19 (<i>Keratin 19, Type I</i>)	Progéniteurs des cellules épithéliales	-
HNF1B (<i>Hepatocyte nuclear factor-1-beta</i>)	Progéniteurs, du foie, du rein et du pancréas	-
Sox17 (<i>SRY (Sex Determining Region Y)-Box 17</i>)	Cellules de l'intestin primitif postérieur	-
Kv7.2	Protéine d'intérêt	++

Nous avons pu ainsi confirmer que les cellules 16312-TS différenciées par notre protocole sont bien des progéniteurs neuronaux. Par cette technique, il apparaît néanmoins que des cellules expriment des marqueurs appartenant à des cellules gliales. J'ai montré qu'il n'y avait aucune expression de marqueurs de cellules ganglionnaires de la rétine, cellules qui peuvent avoir la même morphologie que des progéniteurs neuronaux. De plus, il n'y a aucune expression de marqueurs non-neuronaux (KRT19, HNF1B, SOX1), éliminant ainsi la possibilité d'avoir ces autres lignées cellulaires. L'absence d'expression de marqueurs musculaires permet d'appuyer que la sélection mécanique réalisée sur les neurosphères a permis de sélectionner les lignées de cellules progénitrices obtenues.

La caractérisation des progéniteurs neuronaux a également été réalisée à l'aide de la technique d'immunocytochimie (ICC) afin d'observer de façon individuelle les cellules exprimant les différents marqueurs. J'ai également réalisé des ICC en utilisant des anticorps reconnaissant des protéines neuronales (beta III-tubuline, nestine, vimentine, MAP2), un marqueur des cellules gliales (GFAP, vimentine) et un marqueur des progéniteurs musculaires précoces (CAV3). J'ai obtenu les résultats qui sont synthétisés dans le tableau 13. Ainsi, j'ai montré que les progéniteurs neuronaux de la lignée 16312-TS expriment les protéines vimentine et nestine (Figure 26 A et C). Les protéines beta III-tubuline et MAP2 qui sont exprimées de façon plus tardive lorsque les neurones commencent à présenter des prolongements, s'exprime également dans quelques progéniteurs neuronaux (Figure 26E et G). Cette expression indique que certains progéniteurs neuronaux sont déjà en voie de maturation. En ICC, il est possible de voir une expression de la GFAP indiquant la présence de quelques cellules gliales (Figure 26E) et de la protéine cavéoline-3 qui est un marqueur de cellules musculaires précoces (Figure 26G). Cette dernière apparaissait négative dans les études de RT-PCR. Il est donc possible qu'il y ait un nombre très faible de cellules exprimant la cavéoline-3. Ces cellules sont toutefois différentes des cellules exprimant la beta III-tubuline déjà engagées dans une voie de différenciation.

En parallèle de cette étude, nous avons souhaité confirmer la présence de la protéine Kv7.2 dans les progéniteurs neuronaux. Nous avons réalisé des marquages de la protéine Kv7.2 en utilisant la technique d'ICC et nous en avons également étudié l'expression à l'aide d'une RT-

PCR sur les ADNc issus des progéniteurs de la lignée 16312-TS. Les résultats de ces deux techniques m'ont permis de confirmer la présence de la protéine Kv7.2 par RT-PCR (Tableau 13) et par ICC (Figure 26 I et J). De plus, les co-marquages en immunocytochimie de la protéine Kv7.2 et de la vimentine montrent que la protéine Kv7.2 est exprimée dans les progéniteurs neuronaux.



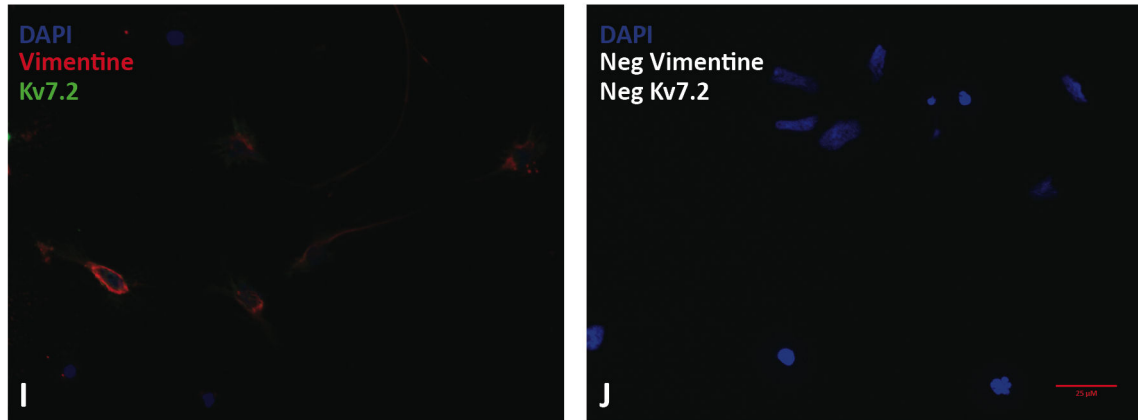


Figure 26 Etude de l'expression par immunocytochimie des protéines vimentine et MAP2 (A, B), nestine (C, D), GFAP et BetaIII-tubuline (betaIII-tub) (E,F), Cav-3 et betaIII-tub (G,H), Kv7.2 et Vimentine (I,J) sur des progéniteurs neuronaux de la lignée 16312 TS *Neg* : *négatif sans anticorps primaire mais avec l'anticorps secondaire*

En conclusion, ces études bien que préliminaires m'ont permis de confirmer l'obtention de progéniteurs neuronaux en utilisant le protocole de différenciation de Badja et al. (2014). La caractérisation sera complétée en réalisant d'autres marquages immunocytochimiques pour vérifier l'absence de protéine CAV-3 dans les progéniteurs neuronaux exprimant la vimentine et la nestine. Pour compléter la caractérisation des progéniteurs neuronaux, nous souhaitons utiliser la technique de cytométrie de flux afin de quantifier, sur des cellules perméabilisées, le pourcentage de cellule exprimant la nestine mais également la protéine CAV-3 et la protéine GFAP par rapport aux progéniteurs neuronaux.

L'étape suivante sera la maturation en neurones des progéniteurs obtenus. Nous avons choisi la maturation en neurones dopaminergiques tout d'abord, car ce protocole est utilisé au sein de notre laboratoire. Cependant, nous souhaitons en parallèle tester d'autres protocoles de différenciation et en particulier ceux conduisant aux neurones glutamatergiques qui semblent un meilleur modèle pour étudier l'épilepsie (Dingledine, 2012).

DISCUSSION

DISCUSSION

Mon travail de thèse a eu pour objectif de contribuer à une meilleure compréhension des bases génétiques des encéphalopathies épileptiques précoces (EEP) en se plaçant aux niveaux clinique, génétique et cellulaire. Ainsi, j'ai utilisé une approche intégrée allant de la recherche de nouveaux gènes impliqués dans les EEP à la caractérisation fonctionnelle de mutations et à l'identification de composés pharmacologiques sur modèles cellulaires. Ce travail a soulevé de nombreuses questions, principalement sur la variabilité qui existe dans ces pathologies neurologiques et du lien possible entre le génotype et phénotype. Cette variabilité est à la fois clinique, différents phénotypes pour un même gène, mais également génétique, différents gènes pour un même phénotype.

Tout d'abord, je me suis intéressée au gène *WDR45* et à son implication dans deux pathologies, les EEP et les BPAN, qui diffèrent dans leurs symptômes associés mais également dans les catégories d'âge qui sont touchées. Cette variabilité a également été au cœur des investigations que j'ai menées pour l'étude fonctionnelle du gène *KCNQ2* et ses mutations. Jusqu'au début de ma thèse, l'idée qu'il existait une corrélation génotype-phénotype pour les patients porteurs de mutations dans le gène *KCNQ2* était assez fréquente. Or, nous avons montré que cette corrélation était très difficile à prouver puisque nos résultats mettent en évidence que, d'une part, des mutations EEP et BPAN peuvent avoir les mêmes conséquences et que, d'autre part, des mutations du même gène, *KCNQ2*, sont responsables d'une même pathologie mais peuvent avoir des conséquences opposées sur la fonction du canal.

Tout au long de ce travail, je me suis interrogée sur les raisons qui conduisent à l'arrêt de l'épilepsie chez une majorité de patients atteints d'EEP, alors que leur pronostic neurologique reste sévèrement engagé. Une des questions principales est de comprendre si la survenue de crises dans un cerveau immature est directement responsable des déficits cognitifs et moteurs observés chez les patients ou si les mécanismes pathologiques provoqués par les mutations entraînent directement les déficits cognitifs et moteurs qui sont également accompagnés d'une épilepsie. Pour cela, je me suis attelée à la compréhension des mécanismes moléculaires dans ces épilepsies ce qui ouvre de nombreuses pistes pour

progresser encore dans ce domaine. La réponse aux questions soulevées aura des conséquences importantes en terme de recherche préclinique et de développement thérapeutique.

I. Variabilité clinique dans les pathologies liées à *WDR45*

La neurodégénérescence associée à une protéine bêta-propeller (BPAN) est une pathologie caractérisée par deux phases : une première phase durant l'enfance, avec un retard de développement et une déficience intellectuelle (avec un quotient intellectuel compris entre 30 et 50) associée pour 70% des patients à une épilepsie. Ensuite, une seconde phase apparaît à l'adolescence avec une détérioration clinique caractérisée par un début de parkinsonisme et un déclin cognitif progressif associé à une perte de langage et une dystonie (Hayflick, 2013 ; Haack, 2012). Au cours de cette phase des dépôts de fer peuvent être visualisés très tôt à l'IRM dans la substance noire et le *globus pallidus* (Haack, 2012).

Les mutations du gène *WDR45*, localisées sur le chromosome X, sont impliquées dans cette pathologie. Un biais de sex-ratio est décrit, avec de nombreux cas de filles (>30) et uniquement 3 cas de garçons répertoriés à ce jour. Ainsi, le postulat de départ était que les mutations du gène *WDR45* pourraient être létales chez les garçons et que les 3 cas seraient dus à des mutations en mosaïque du gène. Au cours de ce travail, j'ai montré qu'une délétion du gène *WDR45* est viable à l'état non mosaïque chez un garçon et peut être responsable d'EEP. Le patient que nous avons examiné présente un phénotype clinique plus sévère et plus précoce que ceux décrits pour les patients garçons ou filles présentant un BPAN. Le phénotype clinique initial comprenait une épilepsie à trois mois et un début de dépôt de fer dans les ganglions de la base à 5 ans.

J'ai émis l'hypothèse que l'absence d'expression de la protéine *WDR45* chez notre patient hémizygote pour la délétion Xp11.23 pouvait expliquer la survenue d'une l'épilepsie néonatale. Le BPAN chez ce patient est plus sévère et accompagné de dépôts de fer associés à un défaut très précoce des acquisitions motrices et sensorielles, sans une phase de détérioration progressive spécifique. Les autres patients décrits dans la littérature qui

présentent un phénotype clinique aussi précoce et sévère sont principalement des filles (Tableau 14).

Tableau 14 : Liste des patients diagnostiqués avec une neurodégénérescence associée à une protéine bêta-propeller en pédiatrie dans la littérature (Hoffjan, 2016)

Pediatric patients carrying *WDR45* mutations (modified from Ref. [19]).

Pediatric patient with <i>WDR45</i> mutation	Originally suspected diagnosis	<i>WDR45</i> mutation	Mutation type	Inheritance	Age at mutation detection	Sex	Age at MRI iron deposition	Additional MRI findings	Micro-cephaly	Epilepsy	Facial dysmorphism
Present study	Rett-like syndrome	c.440-2 A > G	Splicing	<i>de novo</i>	5y	f	n.a.	Thin corpus callosum, atrophy of pons	+	+	(+)
Ohba et al. [4]	Rett syndrome	c.830+1 G > A	Splicing	<i>de novo</i>	14y	f	11y	–	–	+	–
Okamoto et al. [20]	Rett syndrome	c.868 C > T, p.Q290*	Nonsense	<i>de novo</i>	6y	f	6y	Delayed myelination, enlarged lateral ventricles	+	+	+
Khalifa et al. [21]	Rett(-like) syndrome	c.587-588del ^a	Frameshift	<i>de novo</i>	11y	f	11y	Thin corpus callosum, hypomyelination	+	–	(–)
Uchino et al. [24]	Severe developmental delay, stereotypic hand movements	c.1056 C > G, p.Y352*	Nonsense	<i>de novo</i>	9y	f	9y	–	–	+	n.a.
Hamdan et al. [25]	Severe ID	c.19 C > T, p.R7*	Nonsense	<i>de novo</i>	4y	f	n.a.	–	–	+	–
Rathore et al. [12]	Severe ID, dystonia	c.345-2 A > C ^b	Splicing	<i>de novo</i>	15y	f	13y	Cerebellar atrophy, hypomyelination	n.a.	+	n.a.
Takano et al. [19]	Severe developmental delay	c.831-1 G > C	Splicing	<i>de novo</i>	3y	f	3y	Thin corpus callosum, delayed myelination	+	–	+
Zarate et al. [10]	ID	c.161_163delTGG	In-frame deletion	inherited ^c	14y	f	14	–	n.a.	n.a.	–
Long et al. [5]	Mild cognitive delay	c.251 A > G, p.D84G	Missense	<i>de novo</i> ^d	17y	f	17y	–	–	–	–
Abidi et al. [6]	Early-onset epileptic encephalopathy	19.9 kb microdeletion including <i>WDR45</i>	Complete deletion	<i>de novo</i>	5y	m	5y	Global brain atrophy	–	+	n.a.
Xixis et al. [22]	Epileptic spasms	c.400 C > T, p.R134*	Nonsense	<i>de novo</i>	6y	f	n.a.	–	n.a.	+	n.a.

ID: intellectual disability; y: years; ms: months; f: female, m: male; n.a.: not available.

^a Patient additionally carries three mutations in the *POLR3A* gene.

^b Originally described as as c.342-2 A > C.

^c 20-year-old brother carrying the same mutation is more severely affected; mother is mosaic for the mutation.

^d Mother does not carry the mutation, father is unavailable for testing.

Cette précocité chez les filles peut être due à un défaut d'inactivation du chromosome X, ce qui a été confirmé pour 3 patientes qui présentent une forme tronquée de *WDR45* (Saitsu, 2013). Ce défaut d'inactivation n'est jamais complet chez ces patientes ce qui peut expliquer que leur phénotype clinique reste moins sévère que le patient que nous avons décrit. Le phénotype clinique de ces patientes consiste en une déficience intellectuelle sévère et un retard de développement important débutant entre 6 et 18 mois. Le diagnostic de l'épilepsie a été confirmé pour deux de ces patientes. Cependant, aucune IRM n'a été réalisée dans l'enfance et ne permet d'estimer de la présence de dépôts de fer précoces. Pour toutes ces patientes, je pense que l'expression très réduite de la protéine *WDR45* sauvage (ou une absence totale de celle-ci dans le cas de la délétion) en comparaison à la forme mutée, peut conduire à une apparition plus précoce du phénotype clinique. Pour le confirmer, il faudra réaliser des études systématiques du gène *WDR45* chez les patients présentant un retard de

développement précoce. Cette investigation aura pour but d'orienter ensuite les patients dès la petite enfance vers une IRM avec des séquences de susceptibilité magnétique pour mettre en évidence les dépôts de fer. L'implication des ganglions de la base dans les épilepsies est fortement étudiée dans la littérature (Deransart, 1998 ; Bouilleret, 2005 ; Chen, 2014) et des anomalies de cette structure ont été montrées pour des épilepsies liées à des mutations dans le gène *KCNQ2* (Meurs-van der Schoor, 2014). Dans les autres neurodégénérescence liées à des dépôts de fer dans les ganglions de la base (NBIA) l'épilepsie n'est pas toujours présente (Gregory et Hayflick, 2011). Ces données suggèrent que les dépôts de fer dans les ganglions de la base ne sont pas responsables de l'épilepsie chez le patient, ce qui est appuyé par la présence de crises précoces, avant les dépôts de fer, chez les autres patients atteints de BPAN.

L'absence totale de protéine chez notre patient pourrait conduire à une accélération de l'accumulation des dépôts de fer et aurait pour conséquence un phénotype clinique encore plus précoce que chez les filles avec un biais d'inactivation partiel. Le rapport entre protéine WDR45 et dépôts de fer n'a pas encore été élucidé. Cependant, cette protéine appartient à une famille à domaines WD (Tryptophane-Acide aspartique) qui aurait un rôle dans l'autophagie en permettant la formation du phagophore (Figure 27 ; Tanida, 2011 ; Kiriya et Nochi, 2015). De plus, une réduction de l'activité autophagique dans des lignées cellulaires lymphoblastoïdes de patientes a été mise en évidence (Saito, 2013). En outre, la protéine WDR45 pourrait être directement impliquée dans les dépôts de fer, puisqu'il existe un mécanisme particulier de l'autophagie appelé ferritinophagie. Cette dégradation permet la libération de fer par dégradation de la ferritine qui lui est associée (Figure 28 ; Kaur et Debnath, 2015). Des expériences restent nécessaires pour impliquer le rôle de la protéine WDR45 dans ce mécanisme.

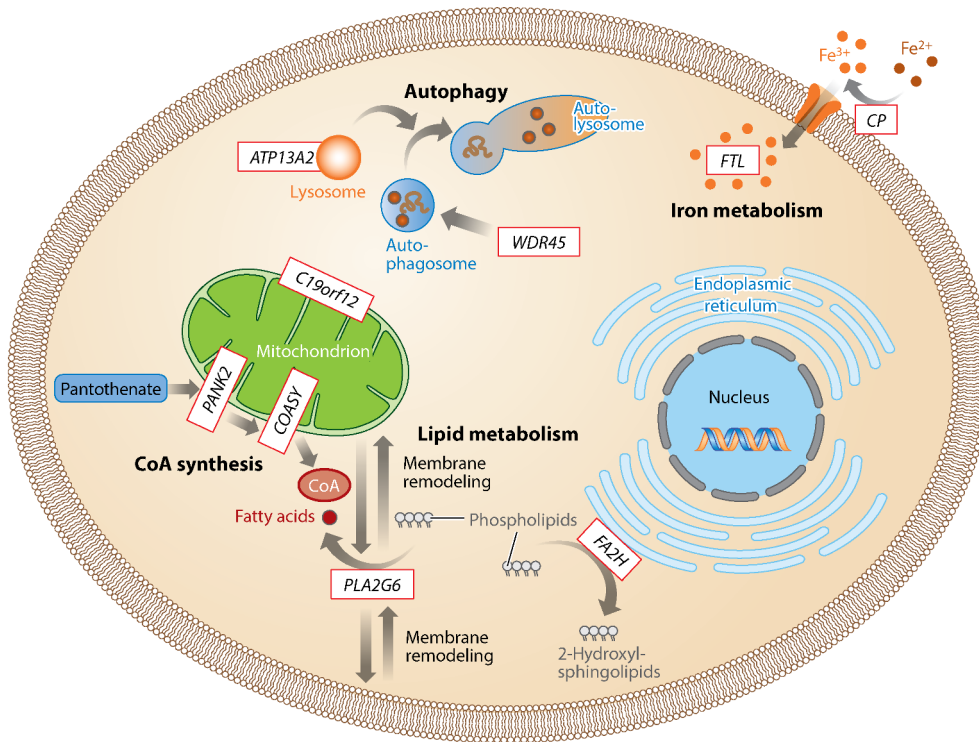


Figure 27 Représentation schématique d'une cellule montrant les différentes voies et mécanismes physiopathologiques impliqués dans les pathologies NBIA. Des mutations dans 9 gènes codant pour différentes protéines impliquées dans différentes voies métaboliques (*encadré en rouge*) ont été reportées. Abréviations : ATP13A2, ATPase type 13A2; C19orf12, chromosome 19 open reading frame 12; CoA, coenzyme A; COASY, CoA synthase; CP, ceruloplasmin; FA2H, fatty acid 2-hydroxylase; FTL, ferritin light polypeptide; PANK2, pantothenate kinase 2; PLA2G6, phospholipase A2 group VI; WDR45, WD repeat domain 45. (Meyer, 2015)

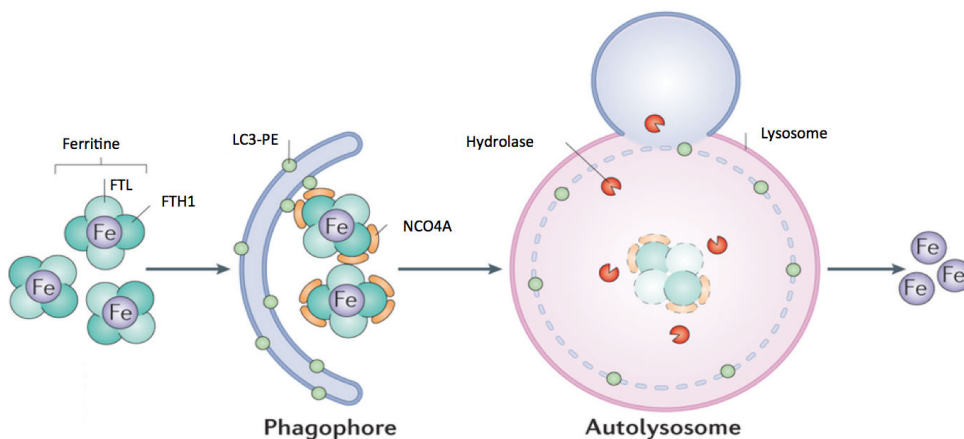


Figure 28 : Dégradation de la ferritine ou ferritinophagie

La dégradation de la ferritine permet de libérer le fer contenu dans le complexe Ferritine-fer. Elle est réalisée par la liaison d'une protéine cargo appelée NCO4A (*nuclear receptor co-activator-4*) aux complexes Ferritine-fer. Ces complexes seront ensuite acheminés vers le phagophore et seront reconnus par la protéine LC3-PE (*microtubule-associated protein 1 light chain 3-phosphatidylethanolamine*) présente sur la membrane du phagosome en formation. Les protéines NCO4A et la ferritine seront ensuite dégradées par l'autolysosome qui permettra la sortie de fer libre. La protéine WDR45 pourrait être associée à la membrane du phagophore. (Kaur et Debnath, 2015)

Cette diminution d'activité autophagique peut-elle être responsable des manifestations épileptiques et de l'encéphalopathie épileptique précoce observées chez les patients BPAN et chez notre patient ? Depuis peu, un garçon dont le diagnostic initial a été posé à l'âge de 3 ans, est décrit avec une mutation germinale du gène *WDR45*, c.161_163delTGG, p.V54del, dans une fratrie de deux enfants (Zarate, 2015). Ce patient n'est pas mosaïque puisque la mère est porteuse de la mutation et qu'il souffre d'un BPAN plus sévère et plus précoce que dans les cas classiques. En comparaison au patient atteint d'EEP que nous avons précédemment décrit, le patient porteur de la mutation p.V54del présente une épilepsie plus tardive. De ce fait, il se pourrait que la délétion de *WDR45* observée chez notre patient n'ait qu'un rôle mineur dans l'EEP et que la délétion des deux autres gènes localisés en Xp11.23, *PRAF2* et *CCDC120*, participe à l'expressivité de l'épilepsie précoce. Le rôle de ces deux gènes est mieux connu à présent et pourrait expliquer la sévérité accrue des symptômes observés chez notre patient.

- *CCDC120* code pour une protéine constituée de 3 motifs superhélices. Cette protéine interagirait, via son domaine coiled-coil 1 (CC1), avec une protéine appelée Cytohesin-2 qui permet l'échange GDP/GTP sur les protéines ARF1, ARF3 et ARF6. Cette dernière est notamment impliquée dans le développement des dendrites et des épines dendritiques en agissant dans le remodelage du cytosquelette d'actine (Hernández-Deviez, 2002 ; Torii, 2014). Cette protéine pourrait donc participer également au phénotype neurologique observé, en provoquant une atteinte des réseaux neuronaux immatures. Cette hypothèse est d'autant plus séduisante que les mutations dans le gène *TBC1D24*, impliquées dans une forme d'EEP, conduisent à une protéine qui ne lie plus ARF6 et à des défauts de formation des neurites durant le développement (Falace, 2014).

- *PRAF2* code pour une protéine dont la fonction a été décrite récemment. Elle aurait un rôle inhibiteur dans l'expression à la surface cellulaire de la sous-unité GB1 du récepteur GABA_B qui participe au contrôle du potentiel membranaire en régulant les canaux potassiques Kir (Kohl et Paulsen, 2010). Des souris surexprimant la protéine Praf2 dans l'aire tegmentale du cerveau montrent une hyperactivité. Celle-ci est due à un défaut d'expression de la sous-unité GB1 contrôlée par Praf2 ce qui provoquerait un défaut d'inhibition neuronale (Figure 29A ; Doly, 2015). En parallèle, des expériences d'inhibition de l'expression de la protéine

Praf2 sur des neurones en culture ont montré une augmentation de l'expression des récepteurs GABA_B formés de la sous-unité GB1 uniquement. Ces récepteurs homomériques GB1 sont non fonctionnels et ne génèrent pas de courant. Chez notre patient, l'absence de la protéine PRAF2 pourrait conduire à une augmentation de la quantité de récepteurs GABA_B membranaires (Figure 29B). L'association des sous unités GB1 et GB2 étant strictement nécessaire pour le transport du récepteur à la membrane (Emson, 2007), il est probable qu'une dérégulation de l'expression de GB1 perturbe l'adressage correct du récepteur et aboutisse à un défaut d'inhibition qui pourrait diminuer les influx nerveux entre les neurones. Ces défauts d'influx nerveux peuvent modifier les réseaux et pourraient être responsables directement de la déficience intellectuelle sévère chez ce patient. Néanmoins, la délétion du gène *PRAF2* ne permet pas d'expliquer l'encéphalopathie épileptique précoce. A l'inverse, la délétion du gène *CCDC120* pourrait être l'anomalie génétique qui serait responsable de l'EEP tandis que la délétion du gène *WDR45* serait responsable du BPAN précoce. A l'avenir, il sera intéressant d'étudier les conséquences fonctionnelles de ces délétions et d'observer si d'autres patients avec des mutations dans l'un ou l'autre de ces deux gènes ont un phénotype similaire à celui observé chez notre patient.

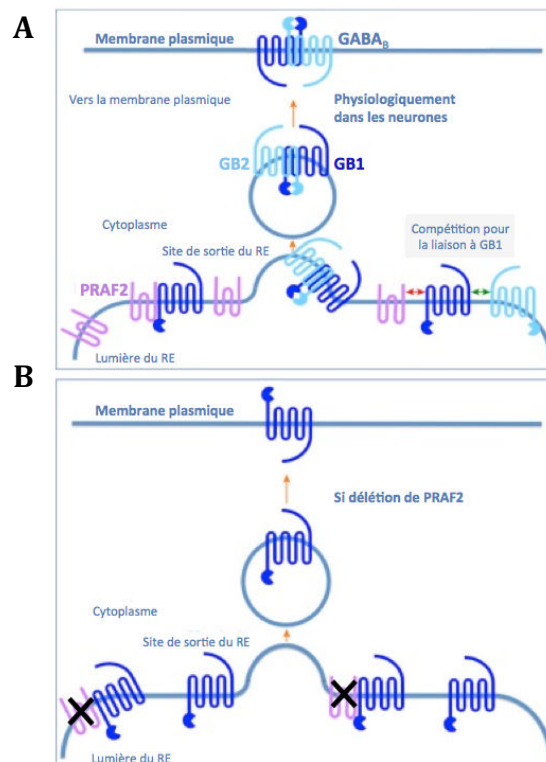


Figure 29 : Rôle de la protéine PRAF2 dans la sortie du réticulum endoplasmique de la sous-unité GB1 du récepteur GABA_B (D'après Doly, 2015).

A ce jour, la physiopathologie des BPAN est complexe. En effet, le biais d'inactivation du chromosome X chez les filles ainsi que les mosaïques somatiques chez les garçons rendent difficile la comparaison entre patients. Nos résultats indiquent également que l'analyse génétique systématique des mutations/délétions du gène *WDR45* devrait être effectuée chez les patients présentant un retard de développement et une épilepsie associée. Elle devrait être accompagnée d'une analyse du biais d'inactivation du chromosome X chez les filles ou de la vérification de la présence d'une mosaïque somatique chez les garçons. Il sera alors possible d'étudier la corrélation qui peut exister entre les mutations de ce gène et les tableaux cliniques associés.

II. Variabilité dans les épilepsies liées à *KCNQ2*

Au cours de cette thèse, j'ai pu étudier de façon plus approfondie un autre gène impliqué dans les EEP, le gène *KCNQ2*. Tout au long de mon travail, j'ai pu observer la très grande variabilité clinique qui existe aussi bien entre les patients porteurs d'une mutation dans ce gène qu'au niveau des conséquences fonctionnelles de ces mutations.

II.1. VARIABILITE CLINIQUE DES PATIENTS PORTEURS DE MUTATIONS DANS LE GENE *KCNQ2*

Mon travail de thèse a étudié la mutation p.A294V présente chez 7 patients atteints d'EEP. Ce travail a mis en évidence la variabilité qui existe dans le phénotype clinique des patients porteurs de la même mutation (Milh, 2013 ; Abidi, 2015). Il existe également une variabilité clinique intrafamiliale pour la sévérité des épilepsies liées à *KCNQ2* (pour les BFNS). Il en résulte une difficulté à établir un pronostic clinique (Dedek, 2003 ; Steinlein, 2007).

La mutation p.A294V conduit à des signes cliniques communs chez les patients qui ont tous un retard de développement et un début de crises durant les quatre premiers jours de vie. Les crises initiales sont majoritairement de type toniques et asymétriques. Cependant, l'un

des patients est décédé d'une mort soudaine probablement due à son épilepsie (SUDEP) tandis que le moins sévèrement atteint est toujours en vie et peut se déplacer avec une aide. Ces deux patients sont donc différents au niveau clinique et le diagnostic moléculaire a clarifié la cause de leur épilepsie. Actuellement, il semble donc difficile de conclure à une homogénéité de phénotype pour une même mutation dans le gène *KCNQ2*.

En parallèle, il existe des cas très particuliers de BFNS qui sont associés à un phénotype clinique bénin et à une déficience intellectuelle (Seinlein, 2007). Dans l'étude de Steinlein et al., les patients d'une même famille sont porteurs de la mutation c.939_940insG, or une variabilité intrafamiliale a été relevée. Les enfants de cette fratrie présentent des différences importantes dans le phénotype : un frère est très sévèrement atteint, déficient intellectuel, scolarisé dans un établissement spécial et sa sœur a eu quelques crises d'épilepsies à l'âge de 1 an et ne montre pas de déficience intellectuelle sévère. Leur mère a eu un développement psychomoteur normal tandis que leur tante a eu une épilepsie sévère. Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette variabilité. Tout d'abord, mon équipe a montré qu'un mosaïcisme somatique pouvait être responsable, au sein d'une même famille, d'individus souffrant d'une épilepsie néonatale bénigne au cours de leur vie et d'autres présentant une EEP (Milh, 2015). Ce type d'anomalie génétique rend le pronostic clinique plus difficile et même impossible pour les nouvelles mutations. Il serait donc intéressant d'observer systématiquement la relation entre les mutations associées à un phénotype bénin-sévère et le mosaïcisme.

D'autres hypothèses concerneraient l'expressivité variable des mutations décrites. Celle-ci peut s'expliquer par la présence de gènes modificateurs pouvant influencer l'excitabilité neuronale. Les gènes modificateurs pourraient agir de façon directe ou indirecte, soit directement par impact sur le fonctionnement du courant M, l'adressage du canal et/ou l'interaction avec des protéines partenaires soit indirectement, en codant pour des protéines influençant l'excitabilité neuronale déjà modifiée par une mutation du gène *KCNQ2*. Par exemple, un modèle de souris transgéniques pour le gène *Scn2a*, canal sodique impliqué dans les EEP, montre une exacerbation des crises lorsque les souris sont également mutées pour le gène *Kcnq2*. Cet effet serait expliqué par une diminution du courant M et une susceptibilité aux crises (Kearney, 2006). Ce modèle montre que des mutations dans des

gènes codant pour des protéines impliquées dans l'excitabilité neuronale peuvent aggraver le phénotype. Jusqu'à présent, l'implication des gènes modificateurs dans les pathologies a peu été étudiée, du fait de la multitude d'interactions qui pourraient intervenir entre les protéines impliquées et l'absence d'outils de prédiction bioinformatique pour les détecter rapidement. Une étude de ces gènes modificateurs est possible chez l'homme, en comparant les patients d'une même fratrie et chez l'animal, par comparaison de différentes lignées de souris porteuses de la même mutation. Pour les canaux ioniques, il est intéressant d'étudier le « canalome » et ses mutations via les techniques de séquençage haut-débit (Meisler, 2010). Ces études pourraient permettre de mettre en évidence les gènes modificateurs impliqués dans la modulation de la susceptibilité aux crises.

La variabilité au sein des épilepsies liées à *KCNQ2* est soupçonnée depuis que les mutations du gène ont été impliquées dans les BFNS. Avant l'article décrivant pour la première fois des mutations du gène *KCNQ2* dans les EEP (Weckhuysen, 2012), il existait quelques cas de patients présentant une déficience intellectuelle (Borgatti, 2004 ; Steinlein, 2007 ; Dedek, 2003). Le phénotype clinique des mutations du gène *KCNQ2* apparaît comme un continuum clinique. Il est difficile de comprendre pourquoi la variabilité intrafamiliale est aussi importante mais cela souligne l'importance de l'étude des mutations de *KCNQ2* pour essayer de comprendre, entre autre, les bases moléculaires de cette hétérogénéité clinique.

II.2. VARIABILITE DES CONSEQUENCES FONCTIONNELLES DES MUTATIONS DU GENE *KCNQ2*

Le courant I_M est-il vraiment le paramètre à étudier ?

Le phénotype des patients atteints d'EEP porteurs de mutations dans le gène *KCNQ2* est caractérisé par un arrêt des crises après quelques mois, mais le développement moteur et cognitif reste sévèrement impacté et la déficience intellectuelle est profonde. Ainsi, l'arrêt tardif des crises ne marque pas une amélioration des symptômes cliniques. Il est donc possible que les mutations du gène *KCNQ2* aient un impact important, soit directement sur le développement cérébral anténatal, soit indirectement via l'émergence de crises impactant négativement le développement cérébral chez le nouveau-né. Nous avons supposé au

départ que le degré d'altération du courant I_M permettrait d'établir une corrélation génotype-phénotype. En effet, le rôle du courant I_M est important dans le contrôle des potentiels d'action et de la phase d'hyperpolarisation. Une altération des propriétés intrinsèques du canal KCNQ/M conduisant à la diminution de la densité du courant ou présentant un seuil d'activation à des potentiels plus dépolarisés, pourrait conduire à une hyperexcitabilité des neurones et donc une épilepsie. Par conséquent, le degré d'altération du courant est susceptible d'expliquer la différence entre les phénotypes BFNS et EEP. Cette hypothèse est appuyée par de nombreux articles montrant des défauts plus importants dans l'activation du courant (Miceli, 2013) ou de la densité de courant (Orhan, 2014).

Contrairement à ces résultats, nous avons montré que l'épilepsie sévère ne résulte pas toujours d'un défaut de densité du courant plus important. Les mutations p.A294V et p.A294G provoquent une diminution similaire de densité de courant alors qu'elles ont été caractérisées chez des patients atteints d'EEP et de BFNS, respectivement. Le fait que la différence de réduction du courant entre les BFNS et les EEP soit similaire, sous-tend l'hypothèse que l'altération du courant I_M n'est pas le seul paramètre affecté pouvant expliquer le phénotype plus sévère des EEP. Nous avons recherché un autre mécanisme et dans ce cas précis, la délocalisation excessive du canal au compartiment somatodendritique pourrait être à l'origine du phénotype sévère. Ce mécanisme est nouveau et conduit à une délocalisation des sous-unités sauvages. Les conséquences fonctionnelles des mutations de *KCNQ2* sont donc très diverses et ne peuvent pas se résumer à une altération du courant.

Lors de l'étude de la mutation p.V175L, nous avons montré à nouveau qu'une diminution de l'activité du canal n'est pas le seul mécanisme qui peut être responsable d'EEP. Cette mutation entraîne un gain de fonction et trois autres mutations sont décrites et présentent le même effet gain de fonction sur le courant potassique I_M (Tableau 15 ; Miceli, 2015). En comparant le phénotype clinique des patients porteurs de ces mutations (Tableau 15), j'ai pu noter que le pronostic vital était très défavorable et deux patients sur les quatre sont décédés précocement (notre patient à 17 mois et le patient 2 à 2 ans et 5 mois). De plus, les effets de la mutation sur le courant M sont plus importants pour ces deux patients, tandis que le patient 4 (Tableau 16) dont l'épilepsie est survenue plus tardivement, est celui où les conséquences fonctionnelles sont les moins importantes. Il pourrait exister une corrélation

entre le décalage hyperpolarisant du voltage provoqué par la mutation et le phénotype clinique sévère chez ces patients.

De manière intuitive, on pourrait penser qu'un gain de fonction serait plutôt protecteur vis-à-vis d'une hyperexcitabilité et non responsable d'une épilepsie. Je n'ai pas pu déterminer comment ces mutations entraînent un décalage dans l'activation du canal vers des valeurs plus négatives. Une hypothèse serait qu'il y aurait un défaut d'interaction électrostatique entre les segments S4 et S2-S3 à l'état de repos du canal. En effet, au niveau du segment S4, il existe des résidus arginines qui peuvent interagir avec les résidus chargés négativement en créant une liaison électrostatique au niveau des segments S2 (E130 et E140) et S3 (D172) ce qui stabiliserait le canal dans à l'état de repos (Miceli, 2015). Le résidu leucine (de la mutation p.V175L) est plus encombrant que le résidu valine, car il possède un atome de carbone supplémentaire. Il est proche du résidu acide aspartique 172, ce qui pourrait conduire à une déstabilisation de l'interaction électrostatique entre S3 et S4 au potentiel de repos du canal et conduire à une ouverture précoce. Cette hypothèse a été soulevée par Miceli et al. (2015). Pour le démontrer, je pense qu'il serait nécessaire de réaliser des expériences de mutagenèse sur les deux segments afin d'observer si d'autres mutations peuvent modifier l'interaction avec S4.

Tableau 15 Profil clinique des patients présentant une mutation de *KCNQ2* de type gain de fonction *ND* : non décrit

	Patient 1 (Milh, 2013) Notre patient	Patient 2 (Weckhuysen, 2013)	Patient 3 (Carvill, 2013)	Patient 4 (Epi4K Consortium)	
Mutation	c.523G>T, p.V175L	c.601C>T, p.Arg201Cys	p.Arg201His	p.Arg144Gln	
Domaine de la protéine	Segment S3	Segment S4	Segment S4	Segment S2	
Sexe du patient	F	F	F	M	
Examen clinique à la naissance	Détresse fœtale, apnée, mouvements anormaux	Normal	ND	Normal	
Age à la première crise	15 jours	2 jours	ND	6 mois	
Type de crises initiales	Crise myocloniques (pas de myoclonies erratiques)	Apnée, myoclonies erratiques suivies de contractions toniques	Spasmes infantiles	Spasmes infantiles	
Suivi des crises	Crises audiogéniques réflexes, spasmes épileptiques puis crises myocloniques	Spasmes infantiles	ND	ND	
EEG initial	Discontinu	<i>Suppression-burst</i>	ND	ND	
Dernier EEG	Hypsarythmies après 7 mois	Activités épileptiques multifocales	ND	ND	
Développement	Pas de contact visuel, pas de soutien de la tête Décès à 17 mois	Hypotonie axiale, mouvements spontanés, pas de contact visuel, Incapacité à s'asseoir Décès à 2 ans et 5 mois	Pas de contact visuel, retard global	ND	
Résumé des études électrophysiologiques					
Effet de la mutation	Kv7.2*	Décalage de potentiel de -37 mV	Canal n'ayant plus de dépendance du voltage	Décalage de potentiel de -30 mV	Décalage de potentiel de -20 mV
	Kv7.2* -Kv7.2	Décalage de potentiel de -15 mV	Canal n'ayant plus de dépendance du voltage	Décalage de potentiel de -15 mV	Décalage de potentiel de -11 mV
	Kv7.2* -Kv7.3	Décalage de potentiel de -26 mV	Canal n'ayant plus de dépendance au voltage	Décalage de potentiel de -12 mV	Décalage de potentiel de -9 mV
	Kv7.2* -Kv7.2 - Kv7.3	Décalage de potentiel de -11 mV	Canal n'ayant plus de dépendance du voltage	Décalage de potentiel de -7 mV	Pas de décalage

Perturbations dans la localisation du canal : un nouveau mécanisme responsable d'EEP ?

L'étude de la localisation des canaux Kv7.2-Kv7.3 porteurs des deux mutations, p.A294V et p.A294G, a permis de démontrer une différence dans l'adressage des canaux au segment initial de l'axone (AIS). La mutation p.A294V provoque une augmentation de la quantité de sous-unités mutantes et de sous-unités sauvages au compartiment somatodendritique et une diminution de quantité de sous-unités à l'AIS et dans l'axone. La transfection de sous-unités sauvages avec les sous-unités mutées ne restaure pas la quantité attendue au segment initial de l'axone. Ces expériences montrent donc que, contrairement aux résultats d'électrophysiologie, la mutation p.A294V a un effet dominant important sur les sous-unités Kv7.2 sauvages quant à la localisation subcellulaire des canaux (Tableau 9).

La cause de la délocalisation n'est pas encore connue, il serait possible d'expliquer ce défaut de localisation comme la conséquence d'une altération de la liaison à des protéines partenaires ou comme une diminution d'hétéromérisation. La sortie du réticulum endoplasmique et l'adressage au segment initial sont contrôlés par la calmoduline (Liu, 2014). Des mutations BFNS ont montré une perte d'interaction entre la sous-unité Kv7.2 et la calmoduline (Etxeberria, 2008). La CaM se lie au domaine C-terminal de la sous-unité Kv7.2 (Figure 10), or le domaine qui est impliqué dans le cas de la mutation p.A294V est le segment S6. Il est connu par ailleurs qu'une déstabilisation du domaine C-terminal peut conduire à un défaut de localisation au segment initial de l'axone (Liu et Devaux, 2014). Je suppose que la mutation localisée dans le segment S6 conduit à un défaut de conformation de la protéine ce qui a pour conséquence une diminution de liaison à la calmoduline. La polarité des résidus valine et glycine ne permet pas d'expliquer une différence d'interaction avec la CaM. En effet, les acides aminés alanine, valine et glycine sont tous les trois neutres au pH utilisé lors de nos expériences (proche du pH physiologique pH7,3). Cependant, le résidu valine occupe plus d'espace que les résidus alanine et glycine ce qui entraîneraient un encombrement significativement plus important. Cet encombrement pourrait avoir un impact conformationnel sur la structure de l'hélice S6.

L'altération de l'interaction avec l'ankyrine G pourrait contribuer à une déstabilisation de la rétention à l'AIS (Figure 30 ; Chung, 2006). Une diminution de la quantité de Kv7.2 au niveau

de l'axone distal a été décrite pour des mutations responsables de BFNS, situées sur la boucle P (p.Y284C) et sur le segment S6 (p.A306T) mais aucune n'a montré de diminution de quantité de protéines à l'AIS (Chung, 2006). Le mécanisme pathologique consécutif à la présence de la mutation p.A294V est donc différent et pourrait concerner, comme pour la CaM, un défaut de conformation.

Pour étudier la liaison entre la sous-unité Kv7.2 et la CaM ou l'ankyrine G, des expériences de co-immunoprécipitation sont indispensables. De plus, pour compléter cette étude, il serait nécessaire d'observer l'impact d'autres mutations de *KCNQ2* sur la localisation des canaux afin d'observer si ce mécanisme peut être reproduit à d'autres mutations responsables d'EEP.

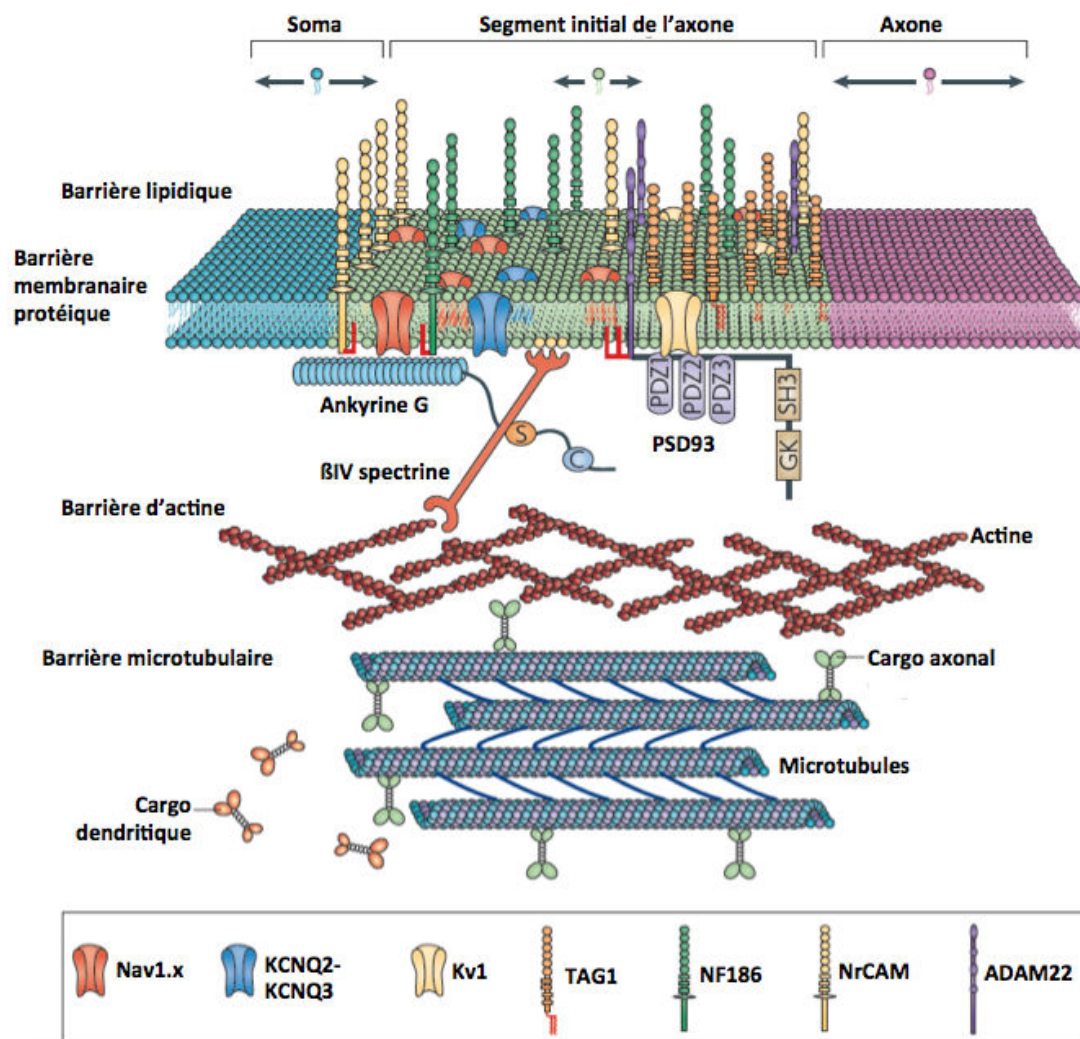


Figure 30 : Représentation schématique du segment initial de l'axone avec les différentes molécules d'ancrage des canaux. Le canal Kv7.2-Kv7.3 est ancré à l'ankyrine G et à la BIV spectrine (D'après Rasband, 2010)

La deuxième hypothèse concerne l'hétéromérisation des canaux par diminution de la liaison avec la sous-unité Kv7.3. En effet, il est connu que l'homomérisation des canaux Kv7.2 provoque une localisation des canaux au niveau présynaptique et au compartiment somatodendritique tandis que la liaison à la sous-unité Kv7.3 permet l'enrichissement à l' AIS. Il est donc possible de supposer que cette mutation pourrait rendre déficiente la liaison des sous-unités Kv7.2 et Kv7.3 entre elles. Il y a cependant deux arguments en défaveur de ce défaut de liaison. Tout d'abord, les sites de liaison pour l'hétéromérisation sont situés dans les domaines C et D localisés dans le domaine C-terminal de la sous-unité protéique. De plus, nos données d'électrophysiologie sur les hétéromères Kv7.2-Kv7.3 ne sont pas en accord avec un défaut d'hétéromérisation. En effet, si les sous-unités Kv7.2^{A294V} mutantes étaient incapables de se lier aux sous-unités Kv7.3, la configuration Kv7.2^{A294V}-Kv7.3 serait à l'origine d'un courant similaire au courant formé par les canaux Kv7.2^{A294V} homomériques ou par les canaux Kv7.3 homomériques, le courant serait complètement aboli. Or, il persiste un faible courant correspondant à 30% du courant généré par Kv7.2-Kv7.3 (Tableau 8). Ces données sont donc en faveur d'une hétéromérisation possible et conservée pour les sous-unités Kv7.2^{A294V}. Des expériences complémentaires d'immunoprécipitation seront nécessaires pour confirmer le fait que ces deux mutations n'altèrent pas la capacité d'hétéromérisation des sous-unités Kv7.2-Kv7.3.

La diminution d'excitabilité est-elle à l'origine d'EEP ?

Nos deux articles sur les mutations p.V175L et p.A294V, nous ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme potentiel qui pourrait expliquer la pathologie. Au niveau du neurone, les influx nerveux appelés potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) et potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSI) sont acheminés via les dendrites jusqu'au soma (Figure 6). Puis une intégration synaptique, permettant la sommation de tous ces PPSE et PPSI amène le potentiel membranaire au seuil de décharge, et permet la génération du potentiel d'action. Les canaux Kv7.2 localisés à l' AIS mais également au compartiment somato-dendritique régulent physiologiquement cette intégration synaptique (Figure 31; Shah, 2011). Le mécanisme d'action que nous avons mis en évidence pourrait intervenir dans ce processus. En effet, une augmentation de localisation du canal Kv7.2 au niveau des

dendrites, comme pour la mutation p.A294V, entraîne une augmentation de courant qui peut provoquer une réduction des PPSE en diminuant la résistance membranaire. Cette diminution pourrait affecter les processus d'intégration synaptique et réduire la capacité des PPSE à générer des potentiels d'action.

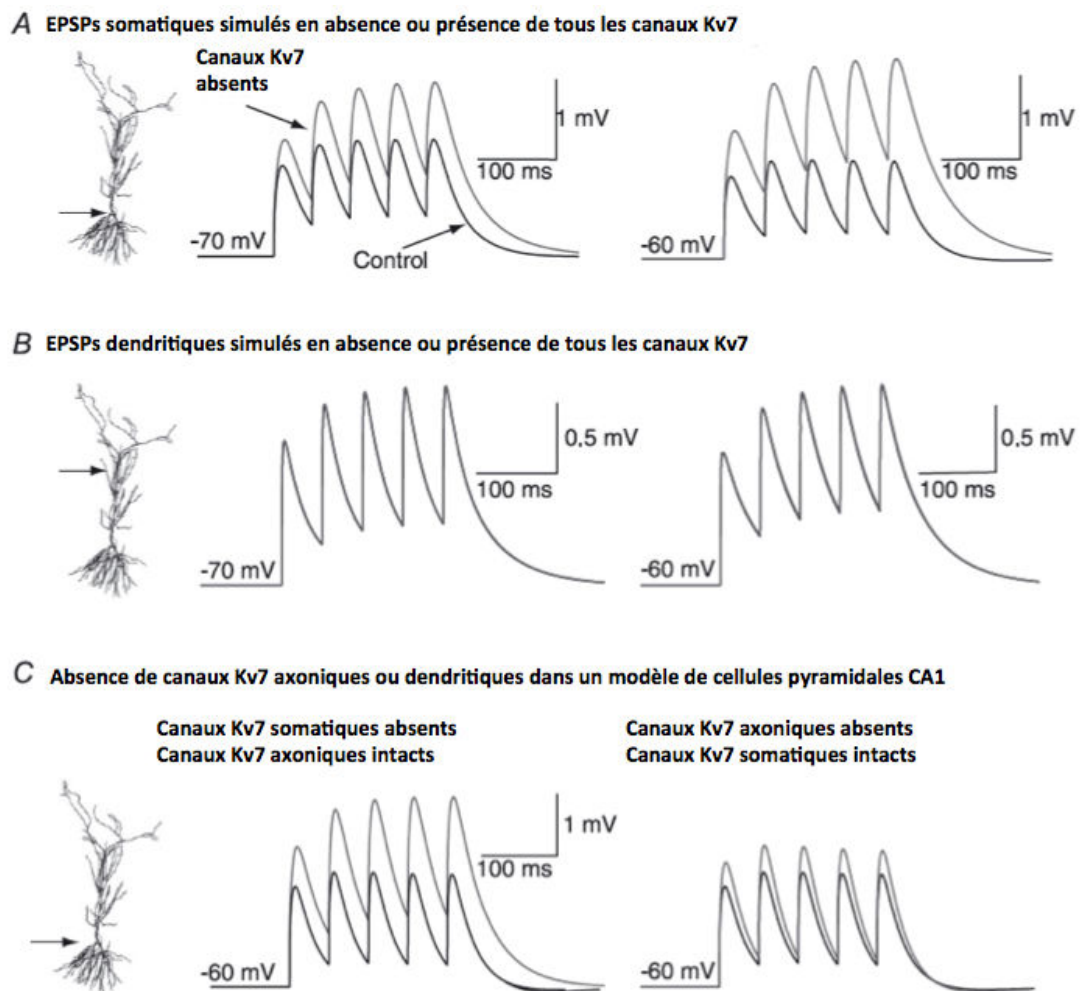


Figure 31 Expériences de simulation par ordinateur de l'impact des canaux Kv7 sur l'intégration synaptique (D'après Shah, 2011)

De façon très similaire, le gain de fonction du canal provoqué par la mutation p.V175L peut rendre la cellule moins excitable en hyperpolarisant le potentiel de membrane au niveau de l' AIS mais également au niveau somatodendritique, ce qui aurait un effet sur la génération des PA. En effet, même s'ils sont peu nombreux, ces canaux KCNQ/M au compartiment somatodendritique pourraient être actifs au potentiel de repos du neurone, ce qui entrainerait le même effet que dans le cas de la délocalisation du canal. Ces deux mécanismes, défaut de localisation et gain de fonction, bien que différents peuvent conduire

probablement tous deux à une diminution de l'excitabilité et donc des influx nerveux. Ces hypothèses n'ont pour l'instant pas été étudiées et l'utilisation de modèles plus complexes sera nécessaire pour permettre de les valider. Ces mécanismes peuvent expliquer la déficience intellectuelle chez les patients par diminution des influx nerveux et donc altération des réseaux neuronaux. Cependant, ils ne peuvent expliquer l'épilepsie chez les patients sauf à considérer l'expression des sous-unités Kv7.2 au sein des interneurons (Saganich, 2001 ; Lawrence, 2006 ; Grigorov, 2014). Dans ces neurones, une baisse d'excitabilité pourrait entraîner une dérégulation de la balance excitation-inhibition et provoquer l'épilepsie chez ce patient ce qui est appuyé par une expérience de modélisation de l'impact de ces mutations (Miceli, 2015).

Pour la formation des réseaux neuronaux chez le nouveau-né, il existe des rythmes précoces qui participent au développement cortical au cours de la première semaine de vie chez les rongeurs lorsque l'activité sensori-motrice est encore restreinte (Khazipov, 2004 ; Khazipov et Luhmann, 2006). Parmi ces rythmes, il existe des oscillations de fréquence lente appelées « *spindle-burst* » qui sont générées spontanément et également par des contractions musculaires ou des mouvements sporadiques. Dans le cortex cérébral, la génération de ces activités est soutenue par des influx de neurones glutamatergiques et encadrés par des influx de neurones GABAergiques (Minlebaev, 2007). Chez l'homme, ces rythmes appelés « *delta brush* » sont présents à partir de la vingt-huitième semaine de gestation chez les prématurés (Milh, 2007). Ces rythmes apparaissent lors de stimulations sensorielles et de mouvements sporadiques, puis vont ensuite disparaître chez l'adulte (Khazipov et Luhmann, 2006 ; Milh, 2007). Il est donc possible que les mutations de *KCNQ2* affectent ces rythmes et conduisent à une altération future des fonctions sensori-motrice.

Chez une souris transgénique qui présente une expression conditionnelle d'une protéine *Kcnq2* mutée et dominante-négative (Peters, 2005 ; Marguet, 2015), les activités « *spindle-burst* » sont anormalement élevées et l'activité des réseaux neuronaux est altérée (Marguet, 2015). Cette augmentation de rythmes pourrait être le reflet d'une exacerbation de l'activité de certains neurones d'une part, et une diminution de l'activité d'autres neurones d'autre part, ce qui déstabiliserait la maturation cérébrale. De manière similaire, les mutations p.A294V et p.V175L que nous avons étudiées pourraient influencer et déstabiliser ces activités « *delta brush* » chez l'homme, ce qui aurait un impact sévère sur le développement

du cerveau et résulterait en déficits cognitifs et moteurs, comme cela a été observé chez les patients atteints d'EEP. Dans ce cadre, l'épilepsie ne serait "que" la conséquence d'un mécanisme pathologique plus général qui résulterait d'un défaut dans la construction des circuits neuronaux. De plus, il est possible d'émettre l'hypothèse que des mécanismes compensateurs de la surexcitabilité tendent à se mettre en place chez le patient dont le développement s'est constitué autour de cette dérégulation de l'excitabilité. Cette hypothèse peut être appuyée par le fait que l'épilepsie s'arrête rapidement chez les enfants mais qu'ils restent cependant très atteints.

II.3. LES MODELES UTILISES POUR LES ETUDES DE *KCNQ2*

La variabilité de l'impact des mutations de *KCNQ2* est-elle due au choix du modèle ?

De nombreux modèles *in vitro* sont utilisés pour les expériences de caractérisation des mutations du gène *KCNQ2*. Ces modèles utilisent soit des lignées cellulaires (tels que les cellules HEK, COS-7, CHO et les oocytes de xénope) ou des neurones primaires. Ces modèles sont transfectés soit en utilisant des plasmides de surexpression (cellules CHO, HEK, COS-7, neurones primaires) soit en utilisant des ARN (oocytes de xénope). Ils ont été utilisés car ils sont simples et rapide à mettre en œuvre pour une étude en série des mutations du gène *KCNQ2*. De plus, en ce qui concerne les lignées cellulaires, elles n'expriment pas de canaux dépendants au voltage. Cependant, ils entraînent des limitations qui diffèrent en fonction du modèle choisi: 1- les modèles transfectés par une forme exogène de *KCNQ2*, surexpriment la protéine, 2- ce sont principalement des modèles non neuronaux ou des neurones primaires isolés qui n'établissent pas un réseau intercellulaire représentatif de ce qui est observé dans le cerveau, 3- ces modèles sont hétérologues, sauf pour les cellules HEK, 4- pour les modèles hétérologues et notamment les oocytes de xénope, ils ne permettent que l'étude des propriétés intrinsèques du canal indépendamment de la présence de protéines partenaires de Kv7.2.

Au début de cette étude, notre choix s'est orienté sur les cellules CHO, car nous souhaitons écarter les influences des autres canaux qui peuvent parasiter le signal. L'étude des propriétés intrinsèques du canal est nécessaire, cependant, elle ne permet pas, à elle seule,

de conclure sur la physiopathologie de la maladie. Ces cellules CHO sont transfectées par un plasmide permettant la surexpression de la sous-unité Kv7.2 mutée et/ou sauvage. La dose génique ne peut pas être pleinement contrôlée et n'est pas représentative de ce que l'on observe chez le patient à cause du taux de transfection qui peut être variable.

Certaines cellules expriment des partenaires protéiques de Kv7.2-Kv7.3 (comme les cellules HEK) et vont permettre une meilleure expression à la membrane plasmique que les oocytes de xénope qui expriment peu de protéines. Ces différences peuvent avoir pour conséquence une variabilité dans l'analyse des propriétés intrinsèques du canal. La mutation p.R216Q qui a été étudiée à la fois par Miceli et al. (Miceli, 2013) et Orhan et al. (Orhan, 2014) n'a pas conduit aux mêmes résultats pour les deux études. La densité de courant des canaux homomériques était affectée pour Miceli et al. tandis qu'elle ne l'était pas pour Orhan et al. Cette différence était due au choix des cellules de départ, les oocytes de xénope et les cellules CHO respectivement. Les cellules de mammifères (cellules CHO) pourraient diluer l'effet de certaines mutations, en exprimant des protéines partenaires permettant un meilleur adressage à la membrane plasmique. Ces informations posent la question de la réalité physiologique de l'étude de ces canaux, car même les propriétés intrinsèques du courant peuvent être influencées par le modèle.

Nous avons transfecté des neurones primaires en culture, afin d'étudier la localisation du canal Kv7.2 et l'influence de mutations de ce canal dans l'excitabilité neuronale. La localisation neuronale a été étudiée à l'aide d'une étiquette marquant les sous-unités transfectées nous permettant de les distinguer des sous-unités Kv7.2 endogènes. Nous ne pouvons donc pas écarter la possibilité qu'il y ait une dilution ou une exacerbation de la délocalisation à cause de l'utilisation de cette étiquette et/ou de la présence de protéines endogènes Kv7.2-Kv7.3 à l'AIS. De plus, les neurones primaires ont l'avantage d'être un modèle excitable et nous avons également souhaité étudier les effets des canaux Kv7.2-Kv7.3 mutés par des études électrophysiologiques. Après de nombreux essais en culture, il nous a été difficile, et même impossible, de provoquer une décharge des neurones, le profil de décharge ressemblant à celui de neurones immatures car les sauts de potentiel dépolarisant ne génèrent qu'un ou deux potentiels d'action. Ce modèle de neurones aurait

pu nous permettre d'étudier la fonction de Kv7.2 dans les cellules excitables et il aurait également été possible d'étudier les réseaux neuronaux.

Ces lignées cellulaires permettent jusqu'à aujourd'hui une première approche sur l'étude des défauts du canal. Cependant, les données générées doivent être considérées avec beaucoup de précaution et des études plus intégrées sont nécessaires.

Quels nouveaux modèles sont nécessaires pour étudier les mutations de *KCNQ2* et proposer de nouvelles approches thérapeutiques ?

Au sein du laboratoire, nous avons souhaité créer des modèles qui nous permettraient de nous affranchir des biais de la transfection que sont la surexpression protéique et la variabilité du taux de transfection. En effet, il devient aujourd'hui nécessaire d'observer les effets des mutations de *KCNQ2* dans des cellules neuronales. Le tissu d'intérêt n'étant pas accessible chez l'humain, les cellules iPS offrent l'opportunité de travailler à la fois sur un modèle cellulaire, non transfecté, humain et excitable. Cette méthode est une avancée technologique qui rend possible l'observation directe des caractéristiques des neurones. Elle a été utilisée dans le cadre d'une autre épilepsie, le syndrome de Dravet, et a permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme pathologique d'hyperexcitabilité (Liu, 2013).

J'ai commencé la différenciation de progéniteurs neuronaux à partir de cellules iPS issues de la reprogrammation des fibroblastes de patients atteints d'EEP liées à des mutations du gène *KCNQ2*. Le protocole de différenciation utilisé au sein du laboratoire permet l'obtention de neurones dopaminergiques. La facilité d'accès à ce protocole nous a donc orienté au départ dans la maturation des progéniteurs neuronaux en neurones dopaminergiques. Chez la souris, les neurones dopaminergiques expriment les sous-unités Kv7.2 et le courant M a un rôle dans le relargage des vésicules contenant la dopamine (Martire, 2007). Il sera intéressant d'étudier ce relargage dans les neurones dopaminergiques différenciés à partir de cellules iPS. A terme, nous souhaitons également différencier les cellules iPS en neurones glutamatergiques et en interneurones. En parallèle de la maturation en neurones dopaminergiques, nous allons débiter prochainement un protocole pour différencier nos cellules en neurones glutamatergiques. Sur ces cellules, il sera intéressant de tester en électrophysiologie si les propriétés de décharge sont affectées par les mutations du gène

KCNQ2. De plus, nous souhaitons observer la localisation des canaux KCNQ/M dans les cellules iPS pour ces deux mutations (p.L203P et p.T287N). Si elle est présente, l'hyperexcitabilité pourrait avoir un impact sur l'état général des neurones et notamment sur l'expression des gènes. Il est également intéressant d'étudier l'influence des mutations du gène *KCNQ2* sur le programme transcriptionnel des neurones glutamatergiques en comparaison à celui de neurones contrôles.

La caractérisation des progéniteurs neuronaux que nous avons obtenu a confirmé l'engagement des cellules iPS vers la lignée neuronale et il semble que la sous-unité Kv7.2 soit exprimée dans les progéniteurs neuronaux. Ainsi, il serait possible dès à présent de réaliser des études électrophysiologiques sur ces progéniteurs neuronaux pour observer le fonctionnement du courant M muté dans les neurones immatures. Ces iPS en cours de différenciation neuronale permettent également d'étudier l'impact des mutations du gène *KCNQ2* sur la maturation des neurones. Ces résultats permettront d'identifier des dérégulations différentes de l'altération du courant I_M et de mieux connaître la physiopathologie pour tester de nouvelles molécules thérapeutiques. Les neurones différenciés issus de cellules iPS permettront de mieux comprendre les mécanismes régissant les épilepsies liées à *KCNQ2* dans un modèle excitable et exprimant la machinerie protéique nécessaire au fonctionnement du canal.

Ces modèles de cellules iPS différenciées posent néanmoins de nombreuses limites notamment en terme de différenciation ciblée. Les protocoles disponibles actuellement pour la différenciation ne permettent pas d'obtenir des cellules d'un type neuronal homogène. J'ai donc choisi pour la caractérisation des progéniteurs neuronaux, de nombreux marqueurs spécifiques de plusieurs tissus. Cette caractérisation nous a permis de confirmer que même après plusieurs passages, il persiste des progéniteurs musculaires et quelques cellules gliales. Ces données seront donc à prendre en considération lors de l'étude des canaux KCNQ/M, nous pourrons également utiliser ces cellules qui sont un autre type cellulaire pour l'étude des mécanismes pathologiques provoqués par les mutations du gène *KCNQ2*. Nous souhaitons à terme réaliser la caractérisation des neurones différenciés à partir de cellules iPS issus de patients, afin de déterminer précisément le pourcentage de chaque population cellulaire et principalement neuronale (dans le cas où plusieurs populations apparaîtraient après maturation). Une autre limite de ce modèle est la difficulté à obtenir des neurones

complètement matures ce qui limite les expériences d'observation de l'excitabilité. Il existe quelques protocoles de neurones différenciés issus d'iPS qui sont toutefois capables de créer des trains de PA (Bardy, 2015). De plus, comme expliqué précédemment, il serait également intéressant d'étudier l'effet délétère de ces mutations du gène *KCNQ2* sur des neurones moins matures afin de déterminer s'il existe des défauts anténatals dans les progéniteurs neuronaux. La troisième difficulté de ce modèle est l'absence de réseaux neuronaux dans les cultures *in vitro*. Pour compléter cette étude, nous avons généré une souris Knock-in (KI) portant la mutation p.T274M de *Kcnq2* qui est décrite chez l'homme et provoque un phénotype sévère (Weckhuysen, 2012 ; Milh, 2013).

A l'heure actuelle, il n'existe aucune souris présentant une mutation diagnostiquée chez un patient atteint d'EEP. Cinq modèles de souris avec une mutation dans le gène *Kcnq2* ont été décrits dans la littérature :

- Le premier modèle qui a été créé est une souris présentant une délétion du gène *Kcnq2* (*Knock-out* pour le gène *Kcnq2*), les souris homozygotes ne sont pas viables dans cette étude et meurent d'atélectasie pulmonaire (affaissement des alvéoles) dès la naissance. Les souris hétérozygotes quant à elles, n'ont pas un phénotype sévère, elles présentent un EEG similaire aux souris sauvages et aucune crise d'épilepsie spontanée (Watanabe, 2000). Ce modèle reproduirait les épilepsies de type BFNS, avec une délétion d'une copie du gène *KCNQ2*.
- Le deuxième modèle murin a été généré par mutagenèse avec *N-ethyl-N-nitrosourea* (ENU), il est porteur d'une mutation p.V182M localisée dans le segment S3 qui n'a pas été décrite chez l'homme (Kearney, 2006). Cette souris présente le même phénotype que pour la délétion de *Kcnq2*, chez les individus homozygotes et hétérozygotes (Watanabe, 2000).
- Deux souris transgéniques ont été générées avec la même mutation p.G279S (Peters, 2005 ; Bi, 2011), cette mutation aurait un effet dominant-négatif sur le courant en supprimant le courant I_M . Elle n'a pas encore été décrite chez l'homme à ce jour, il est à noter que l'un des patients de notre cohorte présente la mutation p.G279C (Milh, 2015). L'un de ces deux modèles a été modifié en utilisant un transgène sous le contrôle du promoteur de l'alphaCAMKII qui permet l'expression de la forme mutée dans le prosencéphale (Bi, 2011). Cette souris a été créée afin de permettre l'étude de la douleur

neuropathique viscérale, néanmoins, il semblerait qu'elle présente une hyperexcitabilité neuronale.

- L'autre modèle murin porteur de la même mutation présente un transgène de *Kcnq2*^{G279S} sous le contrôle du promoteur du virus prion avec un système inductible Tet-off (Peters, 2005). L'étude de cette souris transgénique conditionnelle a permis de montrer que l'expression de ce transgène pouvait entraîner un phénomène d'hyperexcitabilité neuronale accompagné de crises spontanées et d'une mémoire spatiale affectée (Peters, 2005 ; Maguet, 2015). Ce modèle est intéressant car il a permis de mettre en évidence une période critique pour l'expression de la forme mutée de *Kcnq2*. En effet, une expression du transgène *Kcnq2*^{G279S} uniquement restreinte à la première semaine de vie chez la souris peut entraîner les mêmes impacts qu'une expression continue (Peters, 2005). Cette première semaine de vie correspond à une période de maturation anténatale chez l'homme, ce qui a permis d'émettre l'hypothèse que le phénotype clinique des patients serait dû à des défauts précoces au cours du développement. Cependant, ce modèle est équivalent à la caractérisation de la surexpression de *KCNQ2* muté, ce qui ne permet pas de conclure à une « réalité » physiologique. Néanmoins, une étude récente sur ce modèle, a soulevé la possibilité que l'utilisation de thérapies en prophylaxie pourrait restaurer les paramètres physiologiques affectés dans les encéphalopathies épileptiques liées à des mutations dans le gène *KCNQ2*. La même équipe a ainsi utilisé un traitement utilisant le bumétanide chez ces souris âgées d'une semaine. Dans ce modèle, ce médicament a permis de diminuer les anomalies structurales, physiologiques et cognitives en réduisant l'activité dépolarisante du neurotransmetteur GABA (uniquement au cours de cette phase de développement) (Marguet, 2015). Des études restent à réaliser en utilisant un modèle, avec des mutations décrites chez l'homme dans le gène *KCNQ2*, ce qui serait plus proche de la situation génétique des patients. De plus, chez l'homme, l'utilisation du bumétanide ne pourrait se faire en prophylaxie que chez la femme enceinte. Un tel traitement serait difficile à mettre en œuvre chez les patients, puisque les mutations sont principalement *de novo*.

- Un dernier modèle de souris a été généré par une délétion conditionnelle de *Kcnq2* dans les neurones pyramidaux du cortex (Soh, 2014). Ce modèle a permis de mettre en évidence que le rôle de la protéine *Kcnq2* dans le contrôle de l'excitabilité des neurones pyramidaux et que son absence dans ce type de neurones conduit à une activité

électroencéphalographique anormale et à une mortalité précoce après trois semaines de vie chez la souris (Soh, 2014).

Concernant la souris que nous avons générée, nous avons choisi la mutation p.T274M car elle est décrite comme ayant un effet dominant-négatif sur le courant. Dans un premier temps, il sera intéressant d'étudier la présence de crises chez cette souris, celles-ci ne sont pas forcément néonatales puisque la souris est immature au niveau cérébral jusqu'au quatorzième jour de vie. En parallèle, nous réaliserons sur les souris plus âgées, des tests comportementaux, permettant d'étudier la mémoire, la locomotion et l'anxiété. Les souris seront ensuite sacrifiées et l'excitabilité neuronale sur les cerveaux de ces souris sera étudiée en utilisant les techniques d'électrophysiologie. Il sera également intéressant de mesurer les rythmes précoces appelé « *spindle-bursts* » évoqués dans le chapitre précédent. La caractérisation du phénotype de cette souris sera nécessaire pour comprendre les mécanismes pathologiques provoqués par cette mutation du gène *KCNQ2*.

II.4. RECHERCHE DE NOUVELLES THERAPIES POUR LES PATIENTS PORTEURS DE MUTATIONS DE *KCNQ2*

Actuellement, il existe peu de médicaments permettant de traiter les épilepsies des patients atteints d'EEP et porteurs de mutations dans le gène *KCNQ2*. Les traitements comprennent l'utilisation de médicaments anti-épileptiques (AED, *anti-epileptic drug*) à spectre large, qui sont majoritairement des bloqueurs du canal sodique. Ces AED sont efficaces pour arrêter les crises chez 50 % des patients (Kato, 2013 ; Pisano, 2015), les patients traités ont ensuite une évolution plus favorable avec une déficience intellectuelle modérée. L'arrêt des crises de façon rapide permettrait d'influencer positivement le phénotype clinique (Pisano, 2015). Le rôle des bloqueurs du canal sodique dans les épilepsies liées à *KCNQ2* est peu connu, la localisation au segment initial de l'axone des canaux Nav et des canaux KCNQ/M pourrait faciliter leur effet. L'utilisation combinée de ces AED et d'un médicament ciblant le canal KCNQ/M (Figure 32) pourrait améliorer l'évolution clinique des patients. A ce jour, la seule molécule utilisée en clinique est la rétigabine mais elle n'est plus autorisée chez le nourrisson car elle provoque une pigmentation bleue définitive de la peau, des lèvres et de

la rétine (Splinter, 2013). D'autres molécules sont également connues, mais ne sont actuellement pas utilisées chez l'homme comme AED, notamment le zinc pyrithione et le diclofénac (Peretz, 2005 ; Xiong, 2007 ; Peretz, 2010).

La recherche de nouvelles molécules thérapeutiques est absolument nécessaire pour répondre aux besoins des patients atteints d'EEP et porteurs de mutations dans le gène *KCNQ2*. Nous avons choisi un modèle permettant de sélectionner des molécules sur la base de leur efficacité sur le courant M. Pour les mutations provoquant des altérations du courant M, il est aisé d'agir sur le canal potassique, soit en augmentant la probabilité d'ouverture au voltage, soit en augmentant la densité de courant. Pour tester des molécules par une technique à haut-débit, nous avons choisi le kit fluxOR (*Life Technologies*) qui permet de mesurer de façon standardisée le courant M en utilisant des lignées de cellules CHO exprimant de façon stable la protéine Kv7.2 sauvage ou mutée. Ces lignées stables ont également l'avantage de pouvoir être utilisées dans plusieurs expériences en s'affranchissant de la variabilité du taux de transfection présent lors d'une expression transitoire, ce qui permet de comparer les résultats. Cette technique a déjà été utilisée pour la sélection de molécules ciblant le canal Kv7.2 et a permis d'identifier deux molécules thérapeutiques (Yue, 2016). Nous avons souhaité rechercher de nouvelles molécules ciblant les canaux Kv7.2-Kv7.3 sauvages mais également mutés. Notre choix s'est porté sur deux mutations qui sont les mutations p.T274M et p.T287N qui abolissent complètement le courant (nos résultats Tableau 7 ; Orhan, 2014), afin d'identifier s'il existe des molécules pouvant contrecarrer les effets des mutations dominantes-négatives. Nous testerons des molécules issues d'une bibliothèque de composés chimiques mais également des médicaments déjà utilisés chez l'homme.

Les modèles présentés dans le chapitre précédent permettront également de mieux connaître la pharmacologie des canaux KCNQ/M. Les molécules qui seront découvertes par les techniques précédentes seront ensuite validées sur les deux modèles que nous sommes en train d'établir, les neurones différenciés issus de cellules iPS et la souris porteuse d'une mutation dans le gène *Kcnq2* (Figure 32). D'une part, il sera intéressant de tester *in vitro* sur les cellules iPS la capacité de ces molécules à normaliser les défauts découverts au cours de la caractérisation initiale. D'autre part, nous testerons la capacité de ces molécules à arrêter les crises, s'il y en a, et à restaurer les capacités cognitives et motrices chez la souris.

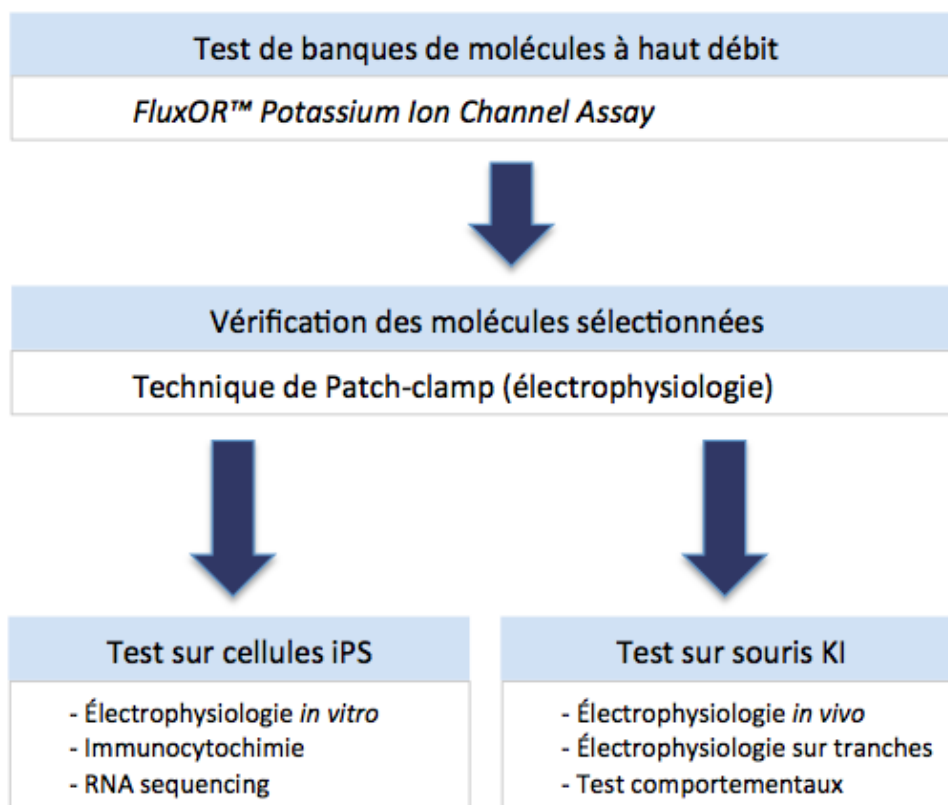


Figure 32 Diagramme représentant la stratégie d'étude pour les molécules ciblant le canal KCNQ/M

Cependant, ces composés ciblant la protéine Kv7.2-Kv7.3 permettront de cibler uniquement les mutations entraînant un défaut de courant M. Pour les autres mutations, provoquant d'autres altérations comme une délocalisation du canal, il sera nécessaire de tester des molécules de façon spécifique et il n'est pas envisageable aujourd'hui d'utiliser pour cela des techniques à haut-débit. Une approche intéressante pour ces mutations atypiques serait l'utilisation de la technique d'interférence par ARN. En effet, les délétions d'une copie du gène *KCNQ2* sont responsables de BFNS. Il pourrait être intéressant de cibler directement les transcrits du gène *KCNQ2* par des shRNA accompagné d'un transgène exprimant une forme sauvage de *KCNQ2*. Cette technique, qui est déjà en cours d'étude pour d'autres pathologies (Li, 2011), aura l'avantage de pouvoir cibler toutes les mutations du gène *KCNQ2* et une

expression de 50% de *KCNQ2* sera suffisante pour éviter un phénotype sévère (comme pour les BFNS).

Pour le moment, en l'absence de molécules thérapeutiques spécifiques à chaque conséquence fonctionnelle des mutations du gène *KCNQ2*, il est nécessaire de rester vigilant sur les médicaments proposés aux patients. En effet, si la rétigabine avait été utilisée chez le patient porteur de la mutation p.V175L, les effets sur le courant auraient pu être dramatiques et inverses de ce qui était attendu. De plus, pour la mutation p.A294V, du fait de la mauvaise localisation des canaux mutés, l'utilisation d'une molécule permettant d'augmenter le courant I_M pourrait être délétère sur le patient par augmentation du courant au niveau du compartiment somatodendritique. Pour ce type de mutations, il est donc nécessaire de connaître les mécanismes pathologiques afin de sélectionner préalablement la molécule adaptée, ce qui est possible grâce aux études fonctionnelles.

La variabilité de tous ces mécanismes et notre incapacité actuelle à proposer un médicament spécifique pour les patients porteurs de mutations dans le gène *KCNQ2* dévoile l'importance de séquencer systématiquement les patients atteints d'EEP afin de mieux comprendre le champ mutationnel de ces pathologies. L'exemple de la variabilité clinique et fonctionnelle des mutations du gène *KCNQ2* est représentatif de ce qui est présent au sein des EEP.

III. Variabilité clinique dans les EEP

La classification de l'épilepsie selon la cause, proposée par l'ILAE, n'est pas toujours représentative de la pathologie. En effet, il existe des limites diagnostiques aux différents groupes proposée par l'ILAE et séparés selon l'origine génétique, structurale/métabolique ou inconnue (Tableau 2). Le classement se complique par l'existence d'un gène pour plusieurs types de pathologies accompagnées ou non de syndromes épileptiques.

Le gène *STXBP1* est un exemple de gène impliqué dans plusieurs pathologies épileptiques et non épileptiques à différents âges, il est à la fois décrit dans les EEP (Saito, 2008), dans la déficience intellectuelle sans épilepsie (Hamdan, 2011) et dans le syndrome de Dravet (Carvill, 2014). De plus, un cas d'hypo-myélinisation a été décrit et est associé à une

mutation de ce gène (Saitsu, 2008). Ces différents phénotypes correspondent donc aux anomalies d'un même gène et la classification structurale versus génétique n'est finalement que peu utile. Des pathologies d'origine génétique peuvent être classées comme pathologies métaboliques, ce qui apporte encore de la complexité au diagnostic. Par exemple, des mutations dans le gène *PNPO* sont responsables d'une diminution de la synthèse de l'activité de la pyridoxamine-phosphate oxydase (Mills, 2005). Cependant, ces épilepsies sont classées dans les épilepsies d'origine métabolique, alors que la composante génétique est essentielle. Ces deux exemples soulignent la difficulté de constituer une classification basée sur les catégories de type génétiques ou structural/métabolique telle que celles conçues par l'ILAE.

Il existe de nombreuses disparités au sein même des syndromes électrocliniques et de leur période d'apparition (Tableau 2). Des pathologies génétiques auparavant décrites dans des épilepsies plus tardives chez l'enfant sont décrites chez le nouveau-né et le nourrisson. Des mutations du gène *GABRA1* sont impliquées dans les épilepsies myocloniques avec absence de l'enfant (Maljevic, 2006) et les épilepsies myocloniques juvéniles (Cossette, 2002). Ces pathologies sont caractérisées par une épilepsie avec crises tonico-cloniques généralisées durant l'enfance et à la puberté (Cossette, 2002). Des mutations de *GABRA1* ont été récemment décrites chez des patients atteints du syndrome de Dravet avec des crises initiales entre 8 et 11 mois (Carvill, 2014). Cette variabilité souligne combien il est difficile de relier les mutations d'un gène à un syndrome électroclinique décrit par l'ILAE.

Cette notion rend nécessaire l'investigation de tous les gènes d'épilepsies pour un patient donné, indépendamment de son syndrome électro-clinique. Ces limites sont reconnues par l'ILAE et une commission de génétique, nommée « *epilepsiome* » s'est récemment formée afin de réfléchir à une classification des syndromes selon le gène impliqué. En effet, il ne faudrait plus regrouper les épilepsies en plusieurs pathologies selon la cause ou l'âge d'apparition, mais réaliser le génotypage des patients pour des listes de gènes élargies à toutes les épilepsies et à la déficience intellectuelle. Ce travail est désormais rendu possible par l'avènement des techniques de séquençage ciblé de gènes à haut-débit (par panel), celles-ci sont utilisées dans notre laboratoire pour le diagnostic. Il sera nécessaire de réaliser une future classification prenant en compte des groupes de patients avec un même gène muté plutôt que des groupes de patients avec un profil clinique particulier. Celle-ci permettra alors, de former des groupes de tableaux cliniques en fonction d'un gène et

d'étudier l'évolution des patients et la réponse aux médicaments reliée à l'anomalie génétique identifiée. A terme, ceci permettra de définir précisément la variabilité qui existe entre les phénotypes cliniques, de comprendre les mécanismes pathologiques régissant les différents types d'épilepsies et de réaliser un diagnostic, un pronostic, et si possible, d'obtenir un traitement personnalisé pour chaque patient.

IV. Conclusion

Au cours de ce travail de thèse, j'ai contribué à l'identification et à la validation de mutations de deux gènes impliquées dans les encéphalopathies épileptiques précoces.

Tout d'abord, j'ai montré qu'une délétion du gène *WDR45* était viable chez un garçon et pouvait être responsable d'encéphalopathie épileptique précoce. Nous avons également mis en évidence que ce garçon souffrait d'une neurodégénérescence avec dépôts de fer dans les ganglions de la base, pathologie auparavant décrite uniquement chez les filles. Cette étude a donc permis de préciser le diagnostic et de souligner l'importance du séquençage de *WDR45* chez les patients atteints d'EEP.

J'ai ensuite étudié les conséquences fonctionnelles des mutations de *KCNQ2*, gène dont de nombreuses mutations sont décrites dans la littérature. J'ai montré qu'un nouveau mécanisme pathologique conduit à une relocalisation des canaux mais également, que les mutations peuvent être responsable d'un gain de fonction du canal. Ces données ont soulevé de nombreuses questions qui seront étudiées à la suite de ce travail.

A terme, de nouveaux modèles d'études vont être mis en place pour étudier la physiopathologie des mutations du gène *KCNQ2*. Ces modèles comprennent des lignées cellulaires exprimant le gène *KCNQ2* sauvage ou muté de façon stable afin de tester de nouvelles molécules thérapeutiques dans un système de mesure du courant à haut-débit. Cette technique permettra d'étudier la pharmacologie du canal potassique. Deux autres modèles sont en cours d'élaboration, les cellules iPS issues de fibroblastes de patients qui seront différenciées en neurones, et une souris présentant une mutation pathogène de *Kcnq2*. Ces modèles sont nécessaires à la compréhension de la pathologie, à la validation des molécules thérapeutiques mises en évidence par les tests de banques de composés chimiques sur les lignées stables.

L'étude de ces deux gènes m'a permis de montrer l'importance de l'approche génétique dans ces pathologies. Il existerait pour un même gène un continuum de phénotypes allant du plus atteint au moins sévère. Ceci implique que des gènes candidats importants ne sont parfois pas étudiés car les symptômes cliniques ne correspondent pas aux cas

précédemment répertoriés. Il est donc nécessaire que des études approfondies soient réalisées pour comprendre la maladie, pour obtenir un diagnostic fiable et également pour proposer aux patients le traitement adéquat.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Aicardi, J., & Goutières, F. (1978). Encéphalopathie myoclonique néonatale. *Rev EEG Neurophysiol*.
- Aicardi, J., & Ohtahara, S. (2005). Les syndromes épileptiques du nouveau né avec tracé de «*suppression-burst*». In J. Roger, M. Bureau, C. Dravet, P. Genton, C. A. Tassinari, & P. Wolf, *Les syndromes épileptiques de l'enfant et de l'adolescent* (4ième édition, p. 39-50). John Libbey Eurotext.
- Alaimo, A., Alberdi, A., Gomis-Perez, C., Fernández-Orth, J., Gómez-Posada, J. C., Areso, P., & Villarroel, A. (2013). Cooperativity between calmodulin-binding sites in Kv7.2 channels. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 1), 244:253.
- Alaimo, A., Gómez-Posada, J. C., Aivar, P., Etxeberría, A., Rodríguez-Alfaro, J. A., Areso, P., & Villarroel, A. (2009). Calmodulin activation limits the rate of KCNQ2 K⁺ channel exit from the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(31), 20668-20675.
- Alam, S., & Lux, A. L. (2012). Epilepsies in infancy. *Archives of Disease in Childhood*, 97(11), 985-992.
- Alazami, A. M., Hijazi, H., Kentab, A. Y., & Alkuraya, F. S. (2014). NECAP1 loss of function leads to a severe infantile epileptic encephalopathy. *Journal of Medical Genetics*, 51(4), 224-228.
- Ambrosino, P., Alaimo, A., Bartollino, S., Manocchio, L., De Maria, M., Mosca, I., ... Soldovieri, M. V. (2015). Epilepsy-causing mutations in Kv7.2 C-terminus affect binding and functional modulation by calmodulin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1852(9), 1856-1866.
- Badja, C., Maleeva, G., El-Yazidi, C., Barruet, E., Lasserre, M., Tropel, P., ... Magdinier, F. (2014). Efficient and cost-effective generation of mature neurons from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 3(12), 1467:1472.
- Bagal, S. K., Marron, B. E., Owen, R. M., Storer, R. I., & Swain, N. A. (2015). Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. *Channels (Austin, Tex.)*, 9(6), 360:366.
- Bähler, M., & Rhoads, A. (2002). Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Letters*, 513(1), 107:113.
- Banerjee, P. N., & Hauser, W. A. (2007). Chapter 5: Incidence and Prevalence.
- Barcia, G., Fleming, M. R., Deligniere, A., Gazula, V.-R., Brown, M. R., Langouet, M., ... Nabbout, R. (2012). De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nature Genetics*, 44(11), 1255:1259.
- Bardy, C., van den Hurk, M., Eames, T., Marchand, C., Hernandez, R. V., Kellogg, M., ... Gage, F. H. (2015). Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(20), E2725:2734.
- Basel-Vanagaite, L., Hershkovitz, T., Heyman, E., Raspall-Chaure, M., Kakar, N., Smirin-Yosef, P., ... Borck, G. (2013). Biallelic SZT2 mutations cause infantile encephalopathy with epilepsy and dysmorphic corpus callosum. *American Journal of Human Genetics*, 93(3), 524:529.
- Battefeld, A., Tran, B. T., Gavrilis, J., Cooper, E. C., & Kole, M. H. P. (2014). Heteromeric Kv7.2/7.3 channels differentially regulate action potential initiation and conduction in neocortical myelinated

- axons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(10), 3719-3732.
- Beghi, E., Berg, A., Carpio, A., Forsgren, L., Hesdorffer, D. C., Hauser, W. A., ... Tomson, T. (2005). Comment on epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(10), 1698-1699; author reply 1701:1702.
- Beguín, S., Crépel, V., Aniksztejn, L., Becq, H., Pelosi, B., Pallesi-Pocachard, E., ... Represa, A. (2013). An epilepsy-related ARX polyalanine expansion modifies glutamatergic neurons excitability and morphology without affecting GABAergic neurons development. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 23(6), 1484-1494.
- Belet, S., Fieremans, N., Yuan, X., Van Esch, H., Verbeeck, J., Ye, Z., ... Froyen, G. (2014). Early frameshift mutation in PIGA identified in a large XLID family without neonatal lethality. *Human Mutation*, 35(3), 350-355.
- Bellini, G., Miceli, F., Soldovieri, M. V., Miraglia del Giudice, E., Coppola, G., & Tagliatela, M. (1993). KCNQ2-Related Disorders. In R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, S. E. Wallace, A. Amemiya, L. J. Bean, ... K. Stephens (éd.), *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32534/>
- Bennett, V., & Healy, J. (2008). Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin. *Trends in Molecular Medicine*, 14(1), 28:36.
- Bennett, V., & Healy, J. (2009). Membrane domains based on ankyrin and spectrin associated with cell-cell interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), a003012.
- Berg, A. T., Berkovic, S. F., Brodie, M. J., Buchhalter, J., Cross, J. H., van Emde Boas, W., ... Scheffer, I. E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4), 676:685.
- Biervert, C., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Berkovic, S. F., Propping, P., Jentsch, T. J., & Steinlein, O. K. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5349), 403:406.
- Bi, Y., Chen, H., Su, J., Cao, X., Bian, X., & Wang, K. (2011). Visceral hyperalgesia induced by forebrain-specific suppression of native Kv7/KCNQ/M-current in mice. *Molecular Pain*, 7, 84.
- Borgatti, R., Zucca, C., Cavallini, A., Ferrario, M., Panzeri, C., Castaldo, P., ... Bassi, M. T. (2004). A novel mutation in KCNQ2 associated with BFNC, drug resistant epilepsy, and mental retardation. *Neurology*, 63(1), 57:65.
- Boullieret, V., Semah, F., Biraben, A., Taussig, D., Chassoux, F., Syrota, A., & Ribeiro, M.-J. (2005). Involvement of the basal ganglia in refractory epilepsy: an 18F-fluoro-L-DOPA PET study using 2 methods of analysis. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 46(3), 540:547.
- Brown, D. A., & Adams, P. R. (1980). Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature*, 283(5748), 673:676.
- Brown, D. A., Hughes, S. A., Marsh, S. J., & Tinker, A. (2007). Regulation of M(Kv7.2/7.3) channels in neurons by PIP(2) and products of PIP(2) hydrolysis: significance for receptor-mediated inhibition. *The Journal of Physiology*, 582(Pt 3), 917:925.

- Brown, D. A., & Passmore, G. M. (2009). Neural KCNQ (Kv7) channels. *British Journal of Pharmacology*, 156(8), 1185:1195.
- Bruch, R. C. (1996). Phosphoinositide second messengers in olfaction. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 113(3), 451:459.
- Carvill, G. L., Heavin, S. B., Yendle, S. C., McMahon, J. M., O'Roak, B. J., Cook, J., ... Mefford, H. C. (2013). Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nature Genetics*, 45(7), 825:830.
- Carvill, G. L., Weckhuysen, S., McMahon, J. M., Hartmann, C., Møller, R. S., Hjalgrim, H., ... Mefford, H. C. (2014). GABRA1 and STXBP1: novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology*, 82(14), 1245:1253.
- Cavaretta, J. P., Sherer, K. R., Lee, K. Y., Kim, E. H., Issema, R. S., & Chung, H. J. (2014). Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ potassium channels is regulated by calmodulin interaction with KCNQ2 subunit. *PLoS One*, 9(7), e103655.
- Charlier, C., Singh, N. A., Ryan, S. G., Lewis, T. B., Reus, B. E., Leach, R. J., & Leppert, M. (1998). A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nature Genetics*, 18(1), 53:55.
- Chen, M., Guo, D., Wang, T., Jing, W., Xia, Y., Xu, P., ... Yao, D. (2014). Bidirectional control of absence seizures by the basal ganglia: a computational evidence. *PLoS Computational Biology*, 10(3), e1003495.
- Chung, H. J. (2014). Role of calmodulin in neuronal Kv7/KCNQ potassium channels and epilepsy. *Frontiers in Biology*, 9(3), 205:215.
- Chung, H. J., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2006). Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ channels is mediated by multiple signals in the KCNQ2 and KCNQ3 C-terminal domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23), 8870:8875.
- Conroy, J., Allen, N. M., Gorman, K. M., Shahwan, A., Ennis, S., Lynch, S. A., & King, M. D. (2016). NAPB - a novel SNARE-associated protein for early-onset epileptic encephalopathy. *Clinical Genetics*, 89(2), E1:3.
- Cooper, E. C., Aldape, K. D., Abosch, A., Barbaro, N. M., Berger, M. S., Peacock, W. S., ... Jan, L. Y. (2000). Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4914:4919.
- Cooper, E. C., Harrington, E., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2001). M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(24), 9529:9540.
- Coppola, G. (2009). Malignant migrating partial seizures in infancy: an epilepsy syndrome of unknown etiology. *Epilepsia*, 50 Suppl 5, 49:51.
- Coppola, G. (2013). Malignant migrating partial seizures in infancy. *Handbook of Clinical Neurology*, 111, 605:609.
- Coppola, G., Plouin, P., Chiron, C., Robain, O., & Dulac, O. (1995). Migrating partial seizures in infancy: a malignant disorder with developmental arrest. *Epilepsia*, 36(10), 1017:1024.

- Cossette, P., Liu, L., Brisebois, K., Dong, H., Lortie, A., Vanasse, M., ... Rouleau, G. A. (2002). Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nature Genetics*, 31(2), 184:189.
- Dalen Meurs-van der Schoor, C., van Weissenbruch, M., van Kempen, M., Bugiani, M., Aronica, E., Ronner, H., & Vermeulen, R. J. (2014). Severe Neonatal Epileptic Encephalopathy and KCNQ2 Mutation: Neuropathological Substrate, *Frontiers in Pediatrics*, 2, 136.
- Debanne, D. (2011). The nodal origin of intrinsic bursting. *Neuron*, 71(4), 569:570.
- Dedek, K., Fusco, L., Teloy, N., & Steinlein, O. K. (2003). Neonatal convulsions and epileptic encephalopathy in an Italian family with a missense mutation in the fifth transmembrane region of KCNQ2. *Epilepsy Research*, 54(1), 21:27.
- Dedek, K., Kunath, B., Kananura, C., Reuner, U., Jentsch, T. J., & Steinlein, O. K. (2001). Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K⁺ channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 12272:12277.
- De Ligt, J., Willemsen, M. H., van Bon, B. W. M., Kleefstra, T., Yntema, H. G., Kroes, T., ... Vissers, L. E. L. M. (2012). Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *The New England Journal of Medicine*, 367(20), 1921:1929.
- Delmas, P., & Brown, D. A. (2005). Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(11), 850:862.
- Deprez, L., Weckhuysen, S., Holmgren, P., Suls, A., Van Dyck, T., Goossens, D., ... De Jonghe, P. (2010). Clinical spectrum of early-onset epileptic encephalopathies associated with STXBP1 mutations. *Neurology*, 75(13), 1159:1165.
- Deransart, C., Vercueil, L., Marescaux, C., & Depaulis, A. (1998). The role of basal ganglia in the control of generalized absence seizures. *Epilepsy Research*, 32(1-2), 213:223.
- Devaux, J. J. (2010). The C-terminal domain of β IV-spectrin is crucial for KCNQ2 aggregation and excitability at nodes of Ranvier. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 23), 4719-4730. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.196022>
- Devaux, J. J., Kleopa, K. A., Cooper, E. C., & Scherer, S. S. (2004). KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(5), 1236:1244.
- Dibbens, L. M., Tarpey, P. S., Hynes, K., Bayly, M. A., Scheffer, I. E., Smith, R., ... Gécz, J. (2008). X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. *Nature Genetics*, 40(6), 776:781.
- Di Meglio, C., Lesca, G., Villeneuve, N., Lacoste, C., Abidi, A., Cacciagli, P., ... Milh, M. (2015). Epileptic patients with de novo STXBP1 mutations: Key clinical features based on 24 cases. *Epilepsia*, 56(12), 1931:1940.
- Dingledine, R. (2012). Glutamatergic Mechanisms Related to Epilepsy: Ionotropic Receptors. In J. L. Noebels, M. Avoli, M. A. Rogawski, R. W. Olsen, & A. V. Delgado-Escueta (éd.), *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (4th éd.). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98189/>
- Doly, S., & Marullo, S. (2015). Gatekeepers Controlling GPCR Export and Function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(10), 636:644.

- Doly, S., Shirvani, H., Gäta, G., Meye, F. J., Emerit, M.-B., Enslin, H., ... Marullo, S. (2015). GABA_B receptor cell-surface export is controlled by an endoplasmic reticulum gatekeeper. *Molecular Psychiatry*.
- Donat, J. F. (1992). The age-dependent epileptic encephalopathies. *Journal of Child Neurology*, 7(1), 7:21.
- Duflocq, A., Chareyre, F., Giovannini, M., Couraud, F., & Davenne, M. (2011). Characterization of the axon initial segment (AIS) of motor neurons and identification of a para-AIS and a juxtapara-AIS, organized by protein 4.1B. *BMC Biology*, 9, 66.
- Dulac, O. (2005). Issues in paediatric epilepsy. *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum*, 182, 9:11.
- Dulac, O., & Tuxhorn, I. (2005). Infantile spasms and West syndrome. In *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence* (3e éd., p. 47-64).
- Duru, N., Iseri, S. A. U., Selçuk, N., & Tolun, A. (2010). Early-onset progressive myoclonic epilepsy with dystonia mapping to 16pter-p13.3. *Journal of Neurogenetics*, 24(4), 207:215.
- Eadie, M. J. (2008). Samuel Wilks (1824-1911): neurologist and generalist of the Mid-Victorian Era. *Journal of Medical Biography*, 16(4), 215:220.
- Eadie, M. J. (2012). Sir Charles Locock and potassium bromide. *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 42(3), 274:279.
- Edvardson, S., Baumann, A.-M., Mühlenhoff, M., Stephan, O., Kuss, A. W., Shaag, A., ... Elpeleg, O. (2013). West syndrome caused by ST3Gal-III deficiency. *Epilepsia*, 54(2), e24:27.
- Emson, P. C. (2007). GABA(B) receptors: structure and function. *Progress in Brain Research*, 160, 43:57.
- Endele, S., Rosenberger, G., Geider, K., Popp, B., Tamer, C., Stefanova, I., ... Kutsche, K. (2010). Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nature Genetics*, 42(11), 1021:1026.
- Engel, J., & International League Against Epilepsy (ILAE). (2001). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, 42(6), 796:803.
- Epi4K Consortium, Epilepsy Phenome/Genome Project, Allen, A. S., Berkovic, S. F., Cossette, P., Delanty, N., ... Winawer, M. R. (2013). De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*, 501(7466), 217:221.
- Estacion, M., O'Brien, J. E., Conravey, A., Hammer, M. F., Waxman, S. G., Dib-Hajj, S. D., & Meisler, M. H. (2014). A novel de novo mutation of SCN8A (Nav1.6) with enhanced channel activation in a child with epileptic encephalopathy. *Neurobiology of Disease*, 69, 117:123.
- Etxeberria, A., Aivar, P., Rodriguez-Alfaro, J. A., Alaimo, A., Villacé, P., Gómez-Posada, J. C., ... Villarroya, A. (2008). Calmodulin regulates the trafficking of KCNQ2 potassium channels. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(4), 1135:1143.
- Etzioni, A., Siloni, S., Chikvashvili, D., Strulovich, R., Sachyani, D., Regev, N., ... Lotan, I. (2011). Regulation of neuronal M-channel gating in an isoform-specific manner: functional interplay between

calmodulin and syntaxin 1A. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(40), 14158:14171.

EuroEPINOMICS-RES Consortium, Epilepsy Phenome/Genome Project, & Epi4K Consortium. (2014). De novo mutations in synaptic transmission genes including DNMT1 cause epileptic encephalopathies. *American Journal of Human Genetics*, 95(4), 360:370.

Falace, A., Buhler, E., Fadda, M., Watrin, F., Lippiello, P., Pallesi-Pocachard, E., ... Cardoso, C. (2014). TBC1D24 regulates neuronal migration and maturation through modulation of the ARF6-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), 2337:2342.

Fehr, S., Wilson, M., Downs, J., Williams, S., Murgia, A., Sartori, S., ... Christodoulou, J. (2013). The CDKL5 disorder is an independent clinical entity associated with early-onset encephalopathy. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 21(3), 266:273.

Fenster, S. D., Chung, W. J., Zhai, R., Cases-Langhoff, C., Voss, B., Garner, A. M., ... Garner, C. C. (2000). Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron*, 25(1), 203:214.

Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., ... Wiebe, S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475:482.

Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470:472.

Fo, C. S., Coleman, C. S., Wallick, C. J., Vine, A. L., & Bachmann, A. S. (2006). Genomic organization, expression profile, and characterization of the new protein PRA1 domain family, member 2 (PRAF2). *Gene*, 371(1), 154:165.

Gamper, N., Stockand, J. D., & Shapiro, M. S. (2003). Subunit-specific modulation of KCNQ potassium channels by Src tyrosine kinase. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(1), 84:95.

Garofalo, S., Cornacchione, M., & Di Costanzo, A. (2012). From genetics to genomics of epilepsy. *Neurology Research International*, 2012, 876234.

Geiger, J., Weber, Y. G., Landwehrmeyer, B., Sommer, C., & Lerche, H. (2006). Immunohistochemical analysis of KCNQ3 potassium channels in mouse brain. *Neuroscience Letters*, 400(1-2), 101:104.

Gómez-Posada, J. C., Aivar, P., Alberdi, A., Alaimo, A., Etxeberria, A., Fernández-Orth, J., ... Villarroel, A. (2011). Kv7 channels can function without constitutive calmodulin tethering. *PloS One*, 6(9), e25508.

Gregory, A., & Hayflick, S. J. (2011). Genetics of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 11(3), 254:261.

Gross-Tsur, V., Ben-Zeev, B., & Shalev, R. S. (2004). Malignant migrating partial seizures in infancy. *Pediatric Neurology*, 31(4), 287:290.

Guerrini, R. (2006). Epilepsy in children. *Lancet (London, England)*, 367(9509), 499:524.

- Gu, N., Vervaeke, K., Hu, H., & Storm, J. F. (2005). Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Physiology*, 566(Pt 3), 689:715.
- Haack, T. B., Hogarth, P., Kruer, M. C., Gregory, A., Wieland, T., Schwarzmayr, T., ... Hayflick, S. J. (2012). Exome sequencing reveals de novo WDR45 mutations causing a phenotypically distinct, X-linked dominant form of NBIA. *American Journal of Human Genetics*, 91(6), 1144:1149.
- Hamdan, F. F., Gauthier, J., Dobrzyniecka, S., Lortie, A., Mottron, L., Vanasse, M., ... Michaud, J. L. (2011). Intellectual disability without epilepsy associated with STXBP1 disruption. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 19(5), 607:609.
- Hamdan, F. F., Perrault, I., Rio, M., Capo-Chichi, J.-M., Boddaert, N., Décarie, J.-C., ... Michaud, J. L. (2015). Mutations in DOCK7 in individuals with epileptic encephalopathy and cortical blindness. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 47(Pt A), 119:120.
- Hansen, J., Snow, C., Tuttle, E., Ghoneim, D. H., Yang, C.-S., Spencer, A., ... Paciorkowski, A. R. (2015). De novo mutations in SIK1 cause a spectrum of developmental epilepsies. *American Journal of Human Genetics*, 96(4), 682:690.
- Hansen, S. B., Tao, X., & MacKinnon, R. (2011). Structural basis of PIP2 activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature*, 477(7365), 495:498.
- Harding, B. N., & Boyd, S. G. (1991). Intractable seizures from infancy can be associated with dentato-olivary dysplasia. *Journal of the Neurological Sciences*, 104(2), 157:165.
- Harkin, L. A., McMahon, J. M., Iona, X., Dibbens, L., Pelekanos, J. T., Zuberi, S. M., ... Scheffer, I. E. (2007). The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain: A Journal of Neurology*, 130(Pt 3), 843-852. <http://doi.org/10.1093/brain/awm002>
- Hauser, W. A. (1994). The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia*, 35 Suppl 2, S1:6.
- Hayflick, S. J., Kruer, M. C., Gregory, A., Haack, T. B., Kurian, M. A., Houlden, H. H., ... Hogarth, P. (2013). β -Propeller protein-associated neurodegeneration: a new X-linked dominant disorder with brain iron accumulation. *Brain: A Journal of Neurology*, 136(Pt 6), 1708:1717.
- Hedstrom, K. L., Ogawa, Y., & Rasband, M. N. (2008). AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *The Journal of Cell Biology*, 183(4), 635:640.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., & MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophysical Journal*, 66(4), 1061:1067.
- Helbig, I., & Lowenstein, D. H. (2013). Genetics of the epilepsies: where are we and where are we going? *Current Opinion in Neurology*, 26(2), 179:185.
- Herlenius, E., Heron, S. E., Grinton, B. E., Keay, D., Scheffer, I. E., Mulley, J. C., & Berkovic, S. F. (2007). SCN2A mutations and benign familial neonatal-infantile seizures: the phenotypic spectrum. *Epilepsia*, 48(6), 1138:1142.
- Hernandez, C. C., Zaika, O., Tolstykh, G. P., & Shapiro, M. S. (2008). Regulation of neural KCNQ channels: signalling pathways, structural motifs and functional implications. *The Journal of Physiology*, 586(Pt 7), 1811:1821.

- Hernández-Deviez, D. J., Casanova, J. E., & Wilson, J. M. (2002). Regulation of dendritic development by the ARF exchange factor ARNO. *Nature Neuroscience*, 5(7), 623:624.
- Higashida, H., Hoshi, N., Zhang, J.-S., Yokoyama, S., Hashii, M., Jin, D., ... Robbins, J. (2005). Protein kinase C bound with A-kinase anchoring protein is involved in muscarinic receptor-activated modulation of M-type KCNQ potassium channels. *Neuroscience Research*, 51(3), 231:234.
- Hoffjan, S., Ibsler, A., Tschentscher, A., Dekomien, G., Bidinost, C., & Rosa, A. L. (2016). WDR45 mutations in Rett (-like) syndrome and developmental delay: Case report and an appraisal of the literature. *Molecular and Cellular Probes*.
- Hoshi, N., Langeberg, L. K., & Scott, J. D. (2005). Distinct enzyme combinations in AKAP signalling complexes permit functional diversity. *Nature Cell Biology*, 7(11), 1066:1073.
- Hoshi, N., Zhang, J.-S., Omaki, M., Takeuchi, T., Yokoyama, S., Wanaverbecq, N., ... Higashida, H. (2003). AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists. *Nature Neuroscience*, 6(6), 564:571.
- Howard, R. J., Clark, K. A., Holton, J. M., & Minor, D. L. (2007). Structural insight into KCNQ (Kv7) channel assembly and channelopathy. *Neuron*, 53(5), 663:675.
- Hunter, J., Maljevic, S., Shankar, A., Siegel, A., Weissman, B., Holt, P., ... Escayg, A. (2006). Subthreshold changes of voltage-dependent activation of the K(V)7.2 channel in neonatal epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 24(1), 194:201.
- Jenke, M., Sánchez, A., Monje, F., Stühmer, W., Weseloh, R. M., & Pardo, L. A. (2003). C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *The EMBO Journal*, 22(3), 395:403.
- Jentsch, T. J. (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 1(1), 21:30.
- Jurado, L. A., Chockalingam, P. S., & Jarrett, H. W. (1999). Apocalmodulin. *Physiological Reviews*, 79(3), 661:682.
- Kaminska, A. (2009). Encéphalopathies épileptiques : quelques hypothèses physiopathologiques. *Epileptologie*, 26, 174:181.
- Kanaumi, T., Takashima, S., Iwasaki, H., Itoh, M., Mitsudome, A., & Hirose, S. (2008). Developmental changes in KCNQ2 and KCNQ3 expression in human brain: possible contribution to the age-dependent etiology of benign familial neonatal convulsions. *Brain & Development*, 30(5), 362:369.
- Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., Allalunis-Turner, J., & Weinfeld, M. (2007). Human polynucleotide kinase participates in repair of DNA double-strand breaks by nonhomologous end joining but not homologous recombination. *Cancer Research*, 67(14), 6619:6625.
- Kass, R. S. (2005). The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(8), 1986:1989.
- Kato, M., Saitoh, S., Kamei, A., Shiraishi, H., Ueda, Y., Akasaka, M., ... Hayasaka, K. (2007). A longer polyalanine expansion mutation in the ARX gene causes early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern (Ohtahara syndrome). *American Journal of Human Genetics*, 81(2), 361:366.

- Kato, M., Saitsu, H., Murakami, Y., Kikuchi, K., Watanabe, S., Iai, M., ... Matsumoto, N. (2014). PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology*, 82(18), 1587:1596.
- Kato, M., Yamagata, T., Kubota, M., Arai, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., ... Saitsu, H. (2013). Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia*, 54(7), 1282:1287.
- Kearney, J. A., Yang, Y., Beyer, B., Bergren, S. K., Claes, L., Dejonghe, P., & Frankel, W. N. (2006). Severe epilepsy resulting from genetic interaction between *Scn2a* and *Kcnq2*. *Human Molecular Genetics*, 15(6), 1043:1048.
- Kevelam, S. H., Bierau, J., Salvarinova, R., Agrawal, S., Honzik, T., Visser, D., ... van der Knaap, M. S. (2015). Recessive ITPA mutations cause an early infantile encephalopathy. *Annals of Neurology*, 78(4), 649:658.
- Khazipov, R., & Luhmann, H. J. (2006). Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends in Neurosciences*, 29(7), 414:418.
- Khazipov, R., Sirota, A., Leinekugel, X., Holmes, G. L., Ben-Ari, Y., & Buzsáki, G. (2004). Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature*, 432(7018), 758:761.
- Kim, J.-B. (2014). Channelopathies. *Korean Journal of Pediatrics*, 57(1), 1:18.
- Kiriyama, Y., & Nochi, H. (2015). The Function of Autophagy in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26797:26812.
- Kodera, H., Nakamura, K., Osaka, H., Maegaki, Y., Haginoya, K., Mizumoto, S., ... Saitsu, H. (2013). De novo mutations in *SLC35A2* encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. *Human Mutation*, 34(12), 1708:1714.
- Kohl, M. M., & Paulsen, O. (2010). The roles of GABAB receptors in cortical network activity. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 58, 205:229.
- Koomoa, D.-L. T., Go, R. C. V., Wester, K., & Bachmann, A. S. (2008). Expression profile of PRAF2 in the human brain and enrichment in synaptic vesicles. *Neuroscience Letters*, 436(2), 171:176.
- Korff, C. M., & Nordli, D. R. (2006). Epilepsy syndromes in infancy. *Pediatric Neurology*, 34(4), 253:263.
- Kosenko, A., & Hoshi, N. (2013). A change in configuration of the calmodulin-KCNQ channel complex underlies Ca²⁺-dependent modulation of KCNQ channel activity. *PLoS One*, 8(12), e82290.
- Kosenko, A., Kang, S., Smith, I. M., Greene, D. L., Langeberg, L. K., Scott, J. D., & Hoshi, N. (2012). Coordinated signal integration at the M-type potassium channel upon muscarinic stimulation. *The EMBO Journal*, 31(14), 3147:3156.
- Kubisch, C., Schroeder, B. C., Friedrich, T., Lütjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., ... Jentsch, T. J. (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, 96(3), 437:446.
- Kurian, M. A., Meyer, E., Vassallo, G., Morgan, N. V., Prakash, N., Pasha, S., ... Maher, E. R. (2010). Phospholipase C beta 1 deficiency is associated with early-onset epileptic encephalopathy. *Brain: A Journal of Neurology*, 133(10), 2964:2970.

- Lawrence, J. J., Saraga, F., Churchill, J. F., Statland, J. M., Travis, K. E., Skinner, F. K., & McBain, C. J. (2006). Somatodendritic Kv7/KCNQ/M channels control interspike interval in hippocampal interneurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(47), 12325:12338.
- Lerche, H., Weber, Y. G., Jurkat-Rott, K., & Lehmann-Horn, F. (2005). Ion channel defects in idiopathic epilepsies. *Current Pharmaceutical Design*, 11(21), 2737:2752.
- Lesca, G., & Depienne, C. (2015). Epilepsy genetics: the ongoing revolution. *Revue Neurologique*, 171(6-7), 539:557.
- Li, C., Xiao, P., Gray, S. J., Weinberg, M. S., & Samulski, R. J. (2011). Combination therapy utilizing shRNA knockdown and an optimized resistant transgene for rescue of diseases caused by misfolded proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(34), 14258:14263.
- Liu, W., & Devaux, J. J. (2014). Calmodulin orchestrates the heteromeric assembly and the trafficking of KCNQ2/3 (Kv7.2/3) channels in neurons. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 58, 40:52.
- Liu, W.-X., Deng, E.-Z., Chen, W., & Lin, H. (2014). Identifying the subfamilies of voltage-gated potassium channels using feature selection technique. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 12940:12951.
- Liu, Y., Lopez-Santiago, L. F., Yuan, Y., Jones, J. M., Zhang, H., O'Malley, H. A., ... Parent, J. M. (2013). Dravet syndrome patient-derived neurons suggest a novel epilepsy mechanism. *Annals of Neurology*, 74(1), 128:139.
- Liu, Y., Vidensky, S., Ruggiero, A. M., Maier, S., Sitte, H. H., & Rothstein, J. D. (2008). Reticulon RTN2B regulates trafficking and function of neuronal glutamate transporter EAAC1. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6561:6571.
- Magiorkinis, E., Diamantis, A., Sidiropoulou, K., & Panteliadis, C. (2014). Highlights in the history of epilepsy: the last 200 years. *Epilepsy Research and Treatment*, 2014, 582039.
- Maljevic, S., Krampfl, K., Cobilanschi, J., Tilgen, N., Beyer, S., Weber, Y. G., ... Heils, A. (2006). A mutation in the GABA(A) receptor alpha(1)-subunit is associated with absence epilepsy. *Annals of Neurology*, 59(6), 983:987.
- Maljevic, S., & Lerche, H. (2014). Potassium channel genes and benign familial neonatal epilepsy. *Progress in Brain Research*, 213, 17:53.
- Maljevic, S., Naros, G., Yalçin, Ö., Blazevic, D., Loeffler, H., Çağlayan, H., ... Lerche, H. (2011). Temperature and pharmacological rescue of a folding-defective, dominant-negative KV 7.2 mutation associated with neonatal seizures. *Human Mutation*, 32(10), E2283:2293.
- Maljevic, S., Wuttke, T. V., & Lerche, H. (2008). Nervous system KV7 disorders: breakdown of a subthreshold brake. *The Journal of Physiology*, 586(Pt 7), 1791:1801.
- Mantegazza, M., Rusconi, R., & Cestèle, S. (2015). Mutations of Ion Channels in Genetic Epilepsies. In *Epilepsy towards the Next Decade* (p. 15:24). Springer International Publishing Switzerland.
- Marguet, S. L., Le-Schulte, V. T. Q., Merseburg, A., Neu, A., Eichler, R., Jakovcevski, I., ... Isbrandt, D. (2015). Treatment during a vulnerable developmental period rescues a genetic epilepsy. *Nature Medicine*, 21(12), 1436:1444.

- Marrion, N. V. (1997). Control of M-current. *Annual Review of Physiology*, 59, 483:504.
- Marsh, E., Melamed, S. E., Barron, T., & Clancy, R. R. (2005). Migrating partial seizures in infancy: expanding the phenotype of a rare seizure syndrome. *Epilepsia*, 46(4), 568:572.
- Martin, H. C., Kim, G. E., Pagnamenta, A. T., Murakami, Y., Carvill, G. L., Meyer, E., ... Taylor, J. C. (2014). Clinical whole-genome sequencing in severe early-onset epilepsy reveals new genes and improves molecular diagnosis. *Human Molecular Genetics*, 23(12), 3200:3211.
- Martire, M., Castaldo, P., D'Amico, M., Preziosi, P., Annunziato, L., & Tagliatela, M. (2004). M channels containing KCNQ2 subunits modulate norepinephrine, aspartate, and GABA release from hippocampal nerve terminals. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(3), 592:597.
- Martire, M., D'Amico, M., Panza, E., Miceli, F., Viggiano, D., Lavergata, F., ... Tagliatela, M. (2007). Involvement of KCNQ2 subunits in [³H]dopamine release triggered by depolarization and pre-synaptic muscarinic receptor activation from rat striatal synaptosomes. *Journal of Neurochemistry*, 102(1), 179:193.
- Mastrangelo, M. (2015). Novel Genes of Early-Onset Epileptic Encephalopathies: From Genotype to Phenotypes. *Pediatric Neurology*, 53(2), 119:129.
- Mefford, H. C., Yendle, S. C., Hsu, C., Cook, J., Geraghty, E., McMahon, J. M., ... Scheffer, I. E. (2011). Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies. *Annals of Neurology*, 70(6), 974:985.
- Meisler, M. H., O'Brien, J. E., & Sharkey, L. M. (2010). Sodium channel gene family: epilepsy mutations, gene interactions and modifier effects. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 11), 1841:1848.
- Meyer, E., Kurian, M. A., & Hayflick, S. J. (2015). Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation: Genetic Diversity and Pathophysiological Mechanisms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 16, 257:279.
- Miceli, F., Soldovieri, M. V., Ambrosino, P., Barrese, V., Migliore, M., Cilio, M. R., & Tagliatela, M. (2013). Genotype-phenotype correlations in neonatal epilepsies caused by mutations in the voltage sensor of K(v)7.2 potassium channel subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(11), 4386:4391.
- Miceli, F., Soldovieri, M. V., Ambrosino, P., De Maria, M., Migliore, M., Migliore, R., & Tagliatela, M. (2015). Early-onset epileptic encephalopathy caused by gain-of-function mutations in the voltage sensor of Kv7.2 and Kv7.3 potassium channel subunits. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(9), 3782:3793
- Miceli, F., Soldovieri, M. V., Lugli, L., Bellini, G., Ambrosino, P., Migliore, M., ... Tagliatela, M. (2009). Neutralization of a unique, negatively-charged residue in the voltage sensor of K V 7.2 subunits in a sporadic case of benign familial neonatal seizures. *Neurobiology of Disease*, 34(3), 501:510.
- Miceli, F., Striano, P., Soldovieri, M. V., Fontana, A., Nardello, R., Robbiano, A., ... Mangano, S. (2015). A novel KCNQ3 mutation in familial epilepsy with focal seizures and intellectual disability. *Epilepsia*, 56(2), e15:20.
- Mignot, C., Lambert, L., Pasquier, L., Bienvu, T., Delahaye-Duriez, A., Keren, B., ... Philippe, C. (2015). WWOX-related encephalopathies: delineation of the phenotypical spectrum and emerging genotype-phenotype correlation. *Journal of Medical Genetics*, 52(1), 61:70.

- Milh, M., Boutry-Kryza, N., Sutera-Sardo, J., Mignot, C., Auvin, S., Lacoste, C., ... Villard, L. (2013). Similar early characteristics but variable neurological outcome of patients with a de novo mutation of KCNQ2. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8, 80.
- Milh, M., Kaminska, A., Huon, C., Lapillonne, A., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (2007). Rapid cortical oscillations and early motor activity in premature human neonate. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 17(7), 1582:1594.
- Milh, M., Lacoste, C., Cacciagli, P., Abidi, A., Sutera-Sardo, J., Tzelepis, I., ... Villard, L. (2015). Variable clinical expression in patients with mosaicism for KCNQ2 mutations. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 167A(10), 2314:2318.
- Milh, M., Villeneuve, N., Chouchane, M., Kaminska, A., Laroche, C., Barthez, M. A., ... Villard, L. (2011). Epileptic and nonepileptic features in patients with early onset epileptic encephalopathy and STXBP1 mutations. *Epilepsia*, 52(10), 1828:1834.
- Miller, C. (2000). An overview of the potassium channel family. *Genome Biology*, 1(4), REVIEWS0004.
- Mills, P. B., Surtees, R. A. H., Champion, M. P., Beesley, C. E., Dalton, N., Scambler, P. J., ... Clayton, P. T. (2005). Neonatal epileptic encephalopathy caused by mutations in the PNPO gene encoding pyridox(am)ine 5'-phosphate oxidase. *Human Molecular Genetics*, 14(8), 1077:1086.
- Minlebaev, M., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (2007). Network mechanisms of spindle-burst oscillations in the neonatal rat barrel cortex in vivo. *Journal of Neurophysiology*, 97(1), 692:700.
- Mohapatra, D. P., Vacher, H., & Trimmer, J. S. (2007). The surprising catch of a voltage-gated potassium channel in a neuronal SNARE. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2007(393), pe37.
- Molinari, F., Raas-Rothschild, A., Rio, M., Fiermonte, G., Encha-Razavi, F., Palmieri, L., ... Colleaux, L. (2005). Impaired mitochondrial glutamate transport in autosomal recessive neonatal myoclonic epilepsy. *American Journal of Human Genetics*, 76(2), 334:339.
- Nakajo, K., & Kubo, Y. (2008). Second coiled-coil domain of KCNQ channel controls current expression and subfamily specific heteromultimerization by salt bridge networks. *The Journal of Physiology*, 586(Pt 12), 2827:2840.
- Nakamura, K., Kodera, H., Akita, T., Shiina, M., Kato, M., Hoshino, H., ... Saitsu, H. (2013). De Novo mutations in GNAO1, encoding a G α subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *American Journal of Human Genetics*, 93(3), 496:505.
- Nakashima, M., Kouga, T., Lourenço, C. M., Shiina, M., Goto, T., Tsurusaki, Y., ... Matsumoto, N. (2016). De novo DNM1 mutations in two cases of epileptic encephalopathy. *Epilepsia*, 57(1), e18:e23.
- Nava, C., Dalle, C., Rastetter, A., Striano, P., de Kovel, C. G. F., Nabbout, R., ... Depienne, C. (2014). De novo mutations in HCN1 cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nature Genetics*, 46(6), 640:645.
- Neligan, A., & Sander, J. W. (2001). Chapter 1 - The incidence and prevalence of epilepsy.
- Nieh, S. E., & Sherr, E. H. (2014). Epileptic encephalopathies: new genes and new pathways. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 11(4), 796:806.
- Noebels, J. (2015). Pathway-driven discovery of epilepsy genes. *Nature Neuroscience*, 18(3), 344:350.

- Numis, A. L., Angriman, M., Sullivan, J. E., Lewis, A. J., Striano, P., Nabbout, R., & Cilio, M. R. (2014). KCNQ2 encephalopathy: delineation of the electroclinical phenotype and treatment response. *Neurology*, 82(4), 368:370.
- Ohba, C., Nabatame, S., Iijima, Y., Nishiyama, K., Tsurusaki, Y., Nakashima, M., ... Matsumoto, N. (2014). De novo WDR45 mutation in a patient showing clinically Rett syndrome with childhood iron deposition in brain. *Journal of Human Genetics*, 59(5), 292:295.
- Ohtahara, S., & Yamatogi, Y. (2003). Epileptic encephalopathies in early infancy with suppression-burst. *Journal of Clinical Neurophysiology: Official Publication of the American Electroencephalographic Society*, 20(6), 398:407.
- Ohtahara, S., Yamatogi, Y., & Ohtsuka, Y. (1976). Prognosis of the Lennox syndrome-long-term clinical and electroencephalographic follow-up study, especially with special reference to relationship with the West syndrome. *Folia Psychiatrica Et Neurologica Japonica*, 30(3), 275:287.
- Ohtsuka, Y., Ohno, S., & Oka, E. (1999). Electroclinical characteristics of hemimegalencephaly. *Pediatric Neurology*, 20(5), 390:393.
- Orhan, G., Bock, M., Schepers, D., Ilina, E. I., Reichel, S. N., Löffler, H., ... Maljevic, S. (2014). Dominant-negative effects of KCNQ2 mutations are associated with epileptic encephalopathy. *Annals of Neurology*, 75(3), 382:394.
- Otsuka, M., Oguni, H., Liang, J.-S., Ikeda, H., Imai, K., Hirasawa, K., ... Yamamoto, T. (2010). STXBP1 mutations cause not only Ohtahara syndrome but also West syndrome--result of Japanese cohort study. *Epilepsia*, 51(12), 2449:2452.
- Pan, Z., Kao, T., Horvath, Z., Lemos, J., Sul, J.-Y., Cranstoun, S. D., ... Cooper, E. C. (2006). A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(10), 2599:2613.
- Pan, Z., Selyanko, A. A., Hadley, J. K., Brown, D. A., Dixon, J. E., & McKinnon, D. (2001). Alternative splicing of KCNQ2 potassium channel transcripts contributes to the functional diversity of M-currents. *The Journal of Physiology*, 531(Pt 2), 347:358.
- Papetti, L., Parisi, P., Leuzzi, V., Nardecchia, F., Nicita, F., Ursitti, F., ... Spalice, A. (2013). Metabolic epilepsy: an update. *Brain & Development*, 35(9), 827:841.
- Patzke, C., Han, Y., Covy, J., Yi, F., Maxeiner, S., Wernig, M., & Südhof, T. C. (2015). Analysis of conditional heterozygous STXBP1 mutations in human neurons. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3560:3571.
- Peretz, A., Degani, N., Nachman, R., Uziyel, Y., Gibor, G., Shabat, D., & Attali, B. (2005). Meclofenamic acid and diclofenac, novel templates of KCNQ2/Q3 potassium channel openers, depress cortical neuron activity and exhibit anticonvulsant properties. *Molecular Pharmacology*, 67(4), 1053:1066.
- Peretz, A., Pell, L., Gofman, Y., Haitin, Y., Shamgar, L., Patrich, E., ... Attali, B. (2010). Targeting the voltage sensor of Kv7.2 voltage-gated K⁺ channels with a new gating-modifier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15637:15642.
- Peretz, A., Sheinin, A., Yue, C., Degani-Katzav, N., Gibor, G., Nachman, R., ... Attali, B. (2007). Pre- and postsynaptic activation of M-channels by a novel opener dampens neuronal firing and transmitter release. *Journal of Neurophysiology*, 97(1), 283:295.

- Perrault, I., Hamdan, F. F., Rio, M., Capo-Chichi, J.-M., Boddaert, N., Décarie, J.-C., ... Michaud, J. L. (2014). Mutations in DOCK7 in individuals with epileptic encephalopathy and cortical blindness. *American Journal of Human Genetics*, 94(6), 891:897.
- Peters, H. C., Hu, H., Pongs, O., Storm, J. F., & Isbrandt, D. (2005). Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nature Neuroscience*, 8(1), 51:60.
- Pippucci, T., Parmeggiani, A., Palombo, F., Maresca, A., Angius, A., Crisponi, L., ... Carelli, V. (2013). A novel null homozygous mutation confirms CACNA2D2 as a gene mutated in epileptic encephalopathy. *PloS One*, 8(12), e82154.
- Pisano, T., Numis, A. L., Heavin, S. B., Weckhuysen, S., Angriman, M., Suls, A., ... Cilio, M. R. (2015). Early and effective treatment of KCNQ2 encephalopathy. *Epilepsia*, 56(5), 685:691.
- Plouin, P., & Anderson, E. (2005). Les crises néonatales idiopathiques bénignes, familiales ou non. In J. Roger, M. Bureau, C. Dravet, P. Genton, & C. A. Tassinari, *Les syndromes épileptiques de l'enfant et de l'adolescent* (4ième édition, p. 3:16). John Libbey Eurotext.
- Psenka, T. M., & Holden, K. R. (1996). Benign familial neonatal convulsions; psychosocial adjustment to the threat of recurrent seizures. *Seizure*, 5(3), 243:245.
- Rasband, M. N. (2010). The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(8).
- Rasmussen, H. B., Frøkjær-Jensen, C., Jensen, C. S., Jensen, H. S., Jørgensen, N. K., Misonou, H., ... Schmitt, N. (2007). Requirement of subunit co-assembly and ankyrin-G for M-channel localization at the axon initial segment. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 6), 953:963.
- Regev, N., Degani-Katzav, N., Korngreen, A., Etzioni, A., Siloni, S., Alaimo, A., ... Lotan, I. (2009). Selective interaction of syntaxin 1A with KCNQ2: possible implications for specific modulation of presynaptic activity. *PloS One*, 4(8), e6586.
- Rett, A., & Teubel, R. (1964). Neugeborenenkrämpfe im Rahmen einer epileptisch belasten Familie. *Wien Klin Wochenschr*, (74), 609:613.
- Reynolds, J. J., Walker, A. K., Gilmore, E. C., Walsh, C. A., & Caldecott, K. W. (2012). Impact of PNKP mutations associated with microcephaly, seizures and developmental delay on enzyme activity and DNA strand break repair. *Nucleic Acids Research*, 40(14), 6608:6619.
- Rhoads, A. R., & Friedberg, F. (1997). Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(5), 331:340.
- Richards, M. C., Heron, S. E., Spendlove, H. E., Scheffer, I. E., Grinton, B., Berkovic, S. F., ... Davy, A. (2004). Novel mutations in the KCNQ2 gene link epilepsy to a dysfunction of the KCNQ2-calmodulin interaction. *Journal of Medical Genetics*, 41(3), e35.
- Rizo, J. (2008). A dynamic t-SNARE complex. *Structure* (London, England: 1993), 16(2), 163:165.
- Robbins, J. (2001). KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*, 90(1), 1:19.
- Rogawski, M. A. (2000). KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. *Trends in Neurosciences*, 23(9), 393:398.

- Rubtsov, A. M., & Lopina, O. D. (2000). Ankyrins. *FEBS Letters*, 482(1-2), 1:5.
- Ruggiero, A. M., Liu, Y., Vidensky, S., Maier, S., Jung, E., Farhan, H., ... Rothstein, J. D. (2008). The endoplasmic reticulum exit of glutamate transporter is regulated by the inducible mammalian Yip6b/GTRAP3-18 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6175:6183.
- Safiulina, V. F., Zacchi, P., Tagliatalata, M., Yaari, Y., & Cherubini, E. (2008). Low expression of Kv7/M channels facilitates intrinsic and network bursting in the developing rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 586(Pt 22), 5437:5453.
- Saganich, M. J., Machado, E., & Rudy, B. (2001). Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K⁺ channels in brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(13), 4609:4624.
- Saitsu, H., Kato, M., Koide, A., Goto, T., Fujita, T., Nishiyama, K., ... Matsumoto, N. (2012). Whole exome sequencing identifies KCNQ2 mutations in Ohtahara syndrome. *Annals of Neurology*, 72(2), 298:300.
- Saitsu, H., Kato, M., Mizuguchi, T., Hamada, K., Osaka, H., Tohyama, J., ... Matsumoto, N. (2008). De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nature Genetics*, 40(6), 782:788.
- Saitsu, H., Nishimura, T., Muramatsu, K., Kadera, H., Kumada, S., Sugai, K., ... Matsumoto, N. (2013). De novo mutations in the autophagy gene WDR45 cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nature Genetics*, 45(4), 445:449, 449e1.
- Schlumberger, E., Dulac, O., & Plouin, P. (1992). Early infantile syndrome(s) with suppression-burst : nosological considerations. In J. Roger, M. Bureau, C. Dravet, F. Dreifuss, A. Perret, & P. Wolf, *Epileptic syndromes of infancy, childhood and adolescence (2ième édition, p. 35:42)*. John Libbey London.
- Schmitt, B., Wohlrab, G., Sander, T., Steinlein, O. K., & Hajnal, B. L. (2005). Neonatal seizures with tonic clonic sequences and poor developmental outcome. *Epilepsy Research*, 65(3), 161:168.
- Schroeder, B. C., Hechenberger, M., Weinreich, F., Kubisch, C., & Jentsch, T. J. (2000). KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 24089:24095.
- Schroeder, B. C., Kubisch, C., Stein, V., & Jentsch, T. J. (1998). Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature*, 396(6712), 687:690.
- Schwake, M., Athanasiadu, D., Beimgraben, C., Blanz, J., Beck, C., Jentsch, T. J., ... Friedrich, T. (2006). Structural determinants of M-type KCNQ (Kv7) K⁺ channel assembly. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(14), 3757:3766.
- Schwake, M., Jentsch, T. J., & Friedrich, T. (2003). A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO Reports*, 4(1), 76:81.
- Schwake, M., Pusch, M., Kharkovets, T., & Jentsch, T. J. (2000). Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K⁺ channels involved in epilepsy. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13343:13348.
- Seifert, G., Carmignoto, G., & Steinhäuser, C. (2010). Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Research Reviews*, 63(1-2), 212:221.

- Serino, D., Specchio, N., Pontrelli, G., Vigeveno, F., & Fusco, L. (2013). Video/EEG findings in a KCNQ2 epileptic encephalopathy: a case report and revision of literature data. *Epileptic Disorders: International Epilepsy Journal with Videotape*, 15(2), 158:165.
- Shahidullah, M., Santarelli, L. C., Wen, H., & Levitan, I. B. (2005). Expression of a calmodulin-binding KCNQ2 potassium channel fragment modulates neuronal M-current and membrane excitability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16454:16459.
- Shah, M. M., Migliore, M., & Brown, D. A. (2011). Differential effects of Kv7 (M-) channels on synaptic integration in distinct subcellular compartments of rat hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 24), 6029:6038.
- Shah, M. M., Migliore, M., Valencia, I., Cooper, E. C., & Brown, D. A. (2008). Functional significance of axonal Kv7 channels in hippocampal pyramidal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(22), 7869:7874.
- Shah, M. M., Mistry, M., Marsh, S. J., Brown, D. A., & Delmas, P. (2002). Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *The Journal of Physiology*, 544(Pt 1), 29:37.
- Shakirullah, Niaz, A., Aslam, K., & Muhammad, N. (2014). The Prevalence, Incidence and Etiology of Epilepsy. *International Journal of Clinical and Experimental Neurology*, 2(2), 29:39.
- Sharma, S., & Prasad, A. N. (2013). Genetic testing of epileptic encephalopathies of infancy: an approach. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 40(1), 10:16.
- Shen, J., Gilmore, E. C., Marshall, C. A., Haddadin, M., Reynolds, J. J., Eyaid, W., ... Walsh, C. A. (2010). Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nature Genetics*, 42(3), 245:249.
- Shieh, C. C., Coghlan, M., Sullivan, J. P., & Gopalakrishnan, M. (2000). Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 557:594.
- Shimajima, K., Sugawara, M., Shichiji, M., Mukaida, S., Takayama, R., Imai, K., & Yamamoto, T. (2011). Loss-of-function mutation of collybistin is responsible for X-linked mental retardation associated with epilepsy. *Journal of Human Genetics*, 56(8), 561:565.
- Sijben, A. E. J., Sithinamsuwan, P., Radhakrishnan, A., Badawy, R. A. B., Dibbens, L., Mazarib, A., ... Scheffer, I. E. (2009). Does a SCN1A gene mutation confer earlier age of onset of febrile seizures in GEFS+? *Epilepsia*, 50(4), 953:956.
- Simons, C., Griffin, L. B., Helman, G., Golas, G., Pizzino, A., Bloom, M., ... Vanderver, A. (2015). Loss-of-function alanyl-tRNA synthetase mutations cause an autosomal-recessive early-onset epileptic encephalopathy with persistent myelination defect. *American Journal of Human Genetics*, 96(4), 675:681.
- Singh, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B. R., Leach, R. J., Melis, R., ... Leppert, M. (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature Genetics*, 18(1), 25:29.
- Singh, N. A., Westenskow, P., Charlier, C., Pappas, C., Leslie, J., Dillon, J., ... BFNC Physician Consortium. (2003). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal

convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain: A Journal of Neurology*, 126(Pt 12), 2726:2737.

Smith, J. S., Iannotti, C. A., Dargis, P., Christian, E. P., & Aiyar, J. (2001). Differential expression of *kcnq2* splice variants: implications to m current function during neuronal development. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(4), 1096:1103.

Soh, H., Pant, R., LoTurco, J. J., & Tzingounis, A. V. (2014). Conditional deletions of epilepsy-associated *KCNQ2* and *KCNQ3* channels from cerebral cortex cause differential effects on neuronal excitability. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(15), 5311:5321.

Soldovieri, M. V., Boutry-Kryza, N., Milh, M., Doummar, D., Heron, B., Bourel, E., ... Lesca, G. (2014). Novel *KCNQ2* and *KCNQ3* mutations in a large cohort of families with benign neonatal epilepsy: first evidence for an altered channel regulation by syntaxin-1A. *Human Mutation*, 35(3), 356:367.

Soldovieri, M. V., Castaldo, P., Iodice, L., Miceli, F., Barrese, V., Bellini, G., ... Tagliatela, M. (2006). Decreased subunit stability as a novel mechanism for potassium current impairment by a *KCNQ2* C terminus mutation causing benign familial neonatal convulsions. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(1), 418:428.

Soldovieri, M. V., Miceli, F., Bellini, G., Coppola, G., Pascotto, A., & Tagliatela, M. (2007). Correlating the clinical and genetic features of benign familial neonatal seizures (BFNS) with the functional consequences of underlying mutations. *Channels (Austin, Tex.)*, 1(4), 228:233.

Soldovieri, M. V., Miceli, F., & Tagliatela, M. (2011). Driving with no brakes: molecular pathophysiology of *Kv7* potassium channels. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 26(5), 365:376.

Song, M.-K., Cui, Y.-Y., Zhang, W.-W., Zhu, L., Lu, Y., & Chen, H.-Z. (2009). The facilitating effect of systemic administration of *Kv7/M* channel blocker XE991 on LTP induction in the hippocampal CA1 area independent of muscarinic activation. *Neuroscience Letters*, 461(1), 25:29.

Splinter, M. Y. (2013). Efficacy of retigabine in adjunctive treatment of partial onset seizures in adults. *Journal of Central Nervous System Disease*, 5, 31:41.

Steinlein, O. K., Conrad, C., & Weidner, B. (2007). Benign familial neonatal convulsions: always benign? *Epilepsy Research*, 73(3), 245:249.

Stöberg, T., McTague, A., Ruiz, A. J., Hirata, H., Zhen, J., Long, P., ... Kurian, M. A. (2015). Mutations in *SLC12A5* in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Nature Communications*, 6, 8038.

Su, J., Cao, X., & Wang, K. (2011). A novel degradation signal derived from distal C-terminal frameshift mutations of *KCNQ2* protein which cause neonatal epilepsy. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(50), 42949:42958.

Syrbe, S., Hedrich, U. B. S., Riesch, E., Djémié, T., Müller, S., Møller, R. S., ... Lemke, J. R. (2015). De novo loss- or gain-of-function mutations in *KCNA2* cause epileptic encephalopathy. *Nature Genetics*, 47(4), 393:399.

Takahashi, S., Yamamoto, S., Okayama, A., Araki, A., Saito, H., Matsumoto, N., & Azuma, H. (2015). Electroclinical features of epileptic encephalopathy caused by *SCN8A* mutation. *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 57(4), 758:762.

- Takashima, H., Boerkoel, C. F., John, J., Saifi, G. M., Salih, M. A. M., Armstrong, D., ... Lupski, J. R. (2002). Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nature Genetics*, 32(2), 267:272.
- Tanida, I. (2011). Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(11), 2201:2214.
- Thevenon, J., Milh, M., Feillet, F., St-Onge, J., Duffourd, Y., Jugé, C., ... Rivière, J.-B. (2014). Mutations in SLC13A5 cause autosomal-recessive epileptic encephalopathy with seizure onset in the first days of life. *American Journal of Human Genetics*, 95(1), 113:120.
- Tinel, N., Lauritzen, I., Chouabe, C., Lazdunski, M., & Borsotto, M. (1998). The KCNQ2 potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with KCNQ3. *FEBS Letters*, 438(3), 171:176.
- Tohyama, J., Akasaka, N., Osaka, H., Maegaki, Y., Kato, M., Saito, N., ... Ohno, K. (2008). Early onset West syndrome with cerebral hypomyelination and reduced cerebral white matter. *Brain & Development*, 30(5), 349:355.
- Torii, T., Miyamoto, Y., Tago, K., Sango, K., Nakamura, K., Sanbe, A., ... Yamauchi, J. (2014). Arf6 guanine nucleotide exchange factor cytohesin-2 binds to CCDC120 and is transported along neurites to mediate neurite growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(49), 33887:33903.
- Trudeau, M. M., Dalton, J. C., Day, J. W., Ranum, L. P. W., & Meisler, M. H. (2006). Heterozygosity for a protein truncation mutation of sodium channel SCN8A in a patient with cerebellar atrophy, ataxia, and mental retardation. *Journal of Medical Genetics*, 43(6), 527:530.
- Tu, L., & Deutsch, C. (1999). Evidence for dimerization of dimers in K⁺ channel assembly. *Biophysical Journal*, 76(4), 2004:2017.
- Ule, J., Ule, A., Spencer, J., Williams, A., Hu, J.-S., Cline, M., ... Darnell, R. B. (2005). Nova regulates brain-specific splicing to shape the synapse. *Nature Genetics*, 37(8), 844:852.
- Van Goethem, G., Livingston, J. H., Warren, D., Ojageer, A. J., Rice, G. I., & Crow, Y. J. (2014). Basal ganglia calcification in a patient with beta-propeller protein-associated neurodegeneration. *Pediatric Neurology*, 51(6), 843:845. <http://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.08.017>
- Veeramah, K. R., O'Brien, J. E., Meisler, M. H., Cheng, X., Dib-Hajj, S. D., Waxman, S. G., ... Hammer, M. F. (2012). De novo pathogenic SCN8A mutation identified by whole-genome sequencing of a family quartet affected by infantile epileptic encephalopathy and SUDEP. *American Journal of Human Genetics*, 90(3), 502:510.
- Veneselli, E., Perrone, M. V., Di Rocco, M., Gaggero, R., & Biancheri, R. (2001). Malignant migrating partial seizures in infancy. *Epilepsy Research*, 46(1), 27:32.
- Verhoeven, W. M. A., Egger, J. I. M., Koolen, D. A., Yntema, H., Olgiati, S., Breedveld, G. J., ... van de Warrenburg, B. P. C. (2014). Beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN), a rare form of NBIA: novel mutations and neuropsychiatric phenotype in three adult patients. *Parkinsonism & Related Disorders*, 20(3), 332:336.
- Vervaeke, K., Gu, N., Agdestein, C., Hu, H., & Storm, J. F. (2006). Kv7/KCNQ/M-channels in rat glutamatergic hippocampal axons and their role in regulation of excitability and transmitter release. *The Journal of Physiology*, 576(Pt 1), 235:256.

- Volkers, L., Rook, M. B., Das, J. H. G., Verbeek, N. E., Groenewegen, W. A., van Kempen, M. J. A., ... Koeleman, B. P. C. (2009). Functional analysis of novel KCNQ2 mutations found in patients with Benign Familial Neonatal Convulsions. *Neuroscience Letters*, 462(1), 24:29.
- Wang, H. S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B. S., Wymore, R. S., Cohen, I. S., ... McKinnon, D. (1998). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5395), 1890:1893.
- Watanabe, H., Nagata, E., Kosakai, A., Nakamura, M., Yokoyama, M., Tanaka, K., & Sasai, H. (2000). Disruption of the epilepsy KCNQ2 gene results in neural hyperexcitability. *Journal of Neurochemistry*, 75(1), 28:33.
- Watanabe, R., Inoue, N., Westfall, B., Taron, C. H., Orlean, P., Takeda, J., & Kinoshita, T. (1998). The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of PIG-A, PIG-H, PIG-C and GPI1. *The EMBO Journal*, 17(4), 877:885.
- Weber, Y. G., Geiger, J., Kämpchen, K., Landwehrmeyer, B., Sommer, C., & Lerche, H. (2006). Immunohistochemical analysis of KCNQ2 potassium channels in adult and developing mouse brain. *Brain Research*, 1077(1), 1:6.
- Weckhuysen, S., Ivanovic, V., Hendrickx, R., Van Coster, R., Hjalgrim, H., Møller, R. S., ... KCNQ2 Study Group. (2013). Extending the KCNQ2 encephalopathy spectrum: clinical and neuroimaging findings in 17 patients. *Neurology*, 81(19), 1697:1703.
- Weckhuysen, S., Mandelstam, S., Suls, A., Audenaert, D., Deconinck, T., Claes, L. R. F., ... de Jonghe, P. (2012). KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Annals of Neurology*, 71(1), 15:25.
- Wen, H., & Levitan, I. B. (2002). Calmodulin is an auxiliary subunit of KCNQ2/3 potassium channels. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(18), 7991:8001.
- West, W. (1841). On a particular form of infantile convulsions. *Lancet (London, England)*, p. 724:725.
- Wimmer, V. C., Reid, C. A., So, E. Y.-W., Berkovic, S. F., & Petrou, S. (2010). Axon initial segment dysfunction in epilepsy. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 11), 1829:1840.
- Wolf, N. I., Bast, T., & Surtees, R. (2005). Epilepsy in inborn errors of metabolism. *Epileptic Disorders: International Epilepsy Journal with Videotape*, 7(2), 67:81.
- Wong, W., & Scott, J. D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(12), 959:970.
- Xiong, Q., Sun, H., & Li, M. (2007). Zinc pyrithione-mediated activation of voltage-gated KCNQ potassium channels rescues epileptogenic mutants. *Nature Chemical Biology*, 3(5), 287:296.
- Xu, M., & Cooper, E. C. (2015). An Ankyrin-G N-terminal Gate and Protein Kinase CK2 Dually Regulate Binding of Voltage-gated Sodium and KCNQ2/3 Potassium Channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(27), 16619:16632.
- Xu, Q., Chang, A., Tolia, A., & Minor, D. L. (2013). Structure of a Ca²⁺/CaM:Kv7.4 (KCNQ4) B-helix complex provides insight into M current modulation. *Journal of Molecular Biology*, 425(2), 378:394.
- Yang, W. P., Levesque, P. C., Little, W. A., Conder, M. L., Ramakrishnan, P., Neubauer, M. G., & Blarar, M. A. (1998). Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(31), 19419:19423.

Yue, C., & Yaari, Y. (2004). KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(19), 4614:4624.

Yue, J.-F., Qiao, G.-H., Liu, N., Nan, F.-J., & Gao, Z.-B. (2016). Novel KCNQ2 channel activators discovered using fluorescence-based and automated patch-clamp-based high-throughput screening techniques. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(1), 105:110.

Yus-Najera, E., Santana-Castro, I., & Villarroel, A. (2002). The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 28545:28553.

Zaika, O., Lara, L. S., Gamper, N., Hilgemann, D. W., Jaffe, D. B., & Shapiro, M. S. (2006). Angiotensin II regulates neuronal excitability via phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent modulation of Kv7 (M-type) K⁺ channels. *The Journal of Physiology*, 575(Pt 1), 49-67.

Zarate, Y. A., Jones, J. R., Jones, M. A., Millan, F., Juusola, J., Vertino-Bell, A., ... Kruer, M. C. (2015). Lessons from a pair of siblings with BPAN. *European Journal of Human Genetics: EJHG*.

Zhang, H., Craciun, L. C., Mirshahi, T., Rohács, T., Lopes, C. M. B., Jin, T., & Logothetis, D. E. (2003). PIP₂ activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron*, 37(6), 963:975.

Zhang, J., & Shapiro, M. S. (2012). Activity-dependent transcriptional regulation of M-Type (Kv7) K⁽⁺⁾ channels by AKAP79/150-mediated NFAT actions. *Neuron*, 76(6), 1133:1146.

Zhang, Q., Zhou, P., Chen, Z., Li, M., Jiang, H., Gao, Z., & Yang, H. (2013). Dynamic PIP₂ interactions with voltage sensor elements contribute to KCNQ2 channel gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(50), 20093:20098.

Sites internet

<http://www.ilae.org>

<http://www.rikee.org/> (Base de données répertorient les mutations de *KCNQ2*)

<http://epilepsygenetics.net/> (Epilepsiome)

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Liste des amorces utilisées

Amorces utilisées pour la PCR quantitative

Nom de l'amorce	Séquence	Utilisation
ADORA2B-2F	5'-GTCACCTCTTTCCAGCCAGC-3'	PCR quantitative du gène <i>WDR45</i>
ADORA2B-2R	5'- AAGTCTCGGTTCCGGTAAGC-3'	PCR quantitative du gène <i>WDR45</i>
WDR45-qPCRg-F	5'-GCAGCATCTCAGAATGGACA-3'	PCR quantitative du gène <i>WDR45</i>
WDR45-qPCRg-F	5'-GCTTATCGTGGAGGGTTGAA -3'	PCR quantitative du gène <i>WDR45</i>
GAPDHcDNAqPCR-F	5'- CTCTGCTCCTCTGTTGAC-3'	RT-qPCR de l'ADNc de <i>WDR45</i>
GAPDHcDNAqPCR-R	5'- ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'	RT-qPCR de l'ADNc de <i>WDR45</i>
WDR45qPCR-4F	5'-GCGGTGGTAGTAGTCCCAAGT-3'	RT-qPCR de l'ADNc de <i>WDR45</i>
WDR45qPCR-5R	5'-ACAGAAAGCACTGGCTTGGT-3'	RT-qPCR de l'ADNc de <i>WDR45</i>

Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage des plasmides pKCNQ2 et pKCNQ3

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce sens (5'→3')	Séquence de l'amorce anti-sens (5'→3')	Température d'hybridation des amorces (°C)
pKCNQ2			
CMV F KCNQ2-1R	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	TCCGAGCTCTTCATACTC	60
KCNQ2-2	AACGCCTTCTACCGCAAGC	CGCAGATGTGGCAAAGACG	60
KCNQ2-3	TGCTCATCGCCTCCATTGC	AAAGTGCTTCTGCCTGTGC	58
KCNQ2-4	GCAACCTTACCCTCATCG	CTTGAGGTTCTCAGCAGC	60
KCNQ2-5	GTGCCATGTACAGTTCGC	CTTGATGCGGAAAGCCTGG	60
KCNQ2-6	GTCTCCAAGTAAAGGCAGCC	ATTCGGGACAGCATGTCCAG	62
KCNQ2-7	AGCGGAAGTTCAAGGAGAGC	TCTTGACAATGCAGCCGTGC	62
KCNQ2-8	TGGAGAAGCAGGTCTTGTCC	ATGGAGATGGACGTGTGC	60
KCNQ2-9	TGTCAAGATCGTGCCTCC	ATGTAGGGCCTGACTTTGGC	60
KCNQ2-10	TTCCTTACGCGGCTTACAGC	TAGAAGGCACAGTCGAGG	60
pKCNQ3			
CMV F KCNQ3-1R	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	GCTTGATTCTGGCTGTCCTG	58
KCNQ3-2	CCAGTCAAGAGAAACAACGC	CCTGGTACATCGGTTTCCT	58
KCNQ3-3	AACCAAGGCAATGTTCTGGC	CCTGGAGGTATTATGCTACC	58
KCNQ3-4	GAGCAACACCGTCAGAAGC	GCCTACGCTTCTGGCAGAG	60
KCNQ3-5	AAGAACCAAAGCCTGTTGGC	CCAGACCATCCACATCAGAA	58
KCNQ3-6	AGTCTCAGAAAGGGTCAGC	GCTTCCACCAGGTGACCATT	58
KCNQ3-7	GCAGGTCACGGAGTATTACC	GCATCTCCAGGACAGAGAT	58
KCNQ3-8F BGH-R	ACAGTGACACACCTCTGTCC	TAGAAGGCACAGTCGAGG	58

Amorces utilisées pour la mutagenèse

Mutation	Séquence de l'amorce sens (5'→3')	Séquence de l'amorce anti-sens (5'→3')
p.V175L	GTGTGATTGACATCATGTTGCTCATCGCTCCATT	AATGGAGGCGATGAGCAACATGATGTCAATCACAC
p.L203P	CCGAGAATCTGCGGGAAGCGCAGGCT	AGCCTGCGCTTCCCGCAGATTCTGCGG
p.G239R	CACTGCCTGGTACATCCGCTTCTTTGTCTCAT	ATGAGACAAAGGAAGCGGATGTACCAGGCAGTG
p.T287N	CAAGTACCCCAAGAACTGGAACGGCAGGC	GCCTGCCGTTCCAGTTCTGGGGTACTTG
p.A294V	GGCAGGCTCCTTGTGGCAACCTTCACC	GGTGAAGGTTGCCACAAGGAGCCTGCC
p.A294G	GGTGAAGGTTGCCCAAGGAGCCTGCC	GGCAGGCTCCTTGGGGCAACCTTCACC
p.F304S	CATCGGTGTCTCCTCCTTCGCGCTGCCTG	CAGGCAGCGCGAAGGAGGAGACACCGATG
p.C774Lfs*91X	GGACACCCCGGGGCTGCAGGCC	GGCCTGCAGCCCCGGGGTGTCC

Amorces utilisées pour les RT-PCR

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce sens (5'→3')	Séquence de l'amorce anti-sens (5'→3')	Température d'hybridation des amorces (°C)
Beta III tubuline	CAGATGTTGATGCCAAGAA	TGCTGTTCTTGCTCTGGATG	58
Nestine	GTCCCCAGAGGACCATGC	CCTTCTAGTGTCTCATGGC	60
NCAM	TTGTTTTCTGGAAGTGC	ATCCTCGCCTGTAACCACAC	60
PAX6	TCTAATCGAAGGGCCAAATG	TGTGAGGGCTGTGTCTGTTC	59
SOX1	CAATGCGGGGAGGAGAAGTC	CTCTGGACCAACTCTGGCG	61
DCX	TGTCTGACAACATCAACCTGC	GCCTGTGCACTGTTGCTGC	60
CAV3	TCGTCAAGGATATCCACTGC	CTGGATCTCGATCAGGTAGC	58
HDAC-5	GTGGCTGAGCGGAGAAGC	TGACCGTGGCCTGCAGC	60
MUSK	AGAAGGAAGTTCGTCTGC	ACTCAGGATGGTGAGGAGC	58
Opsin-1	AGATTTGATGCCAAGCTGGC	GCGCTGGAGAGTTCAGAGC	60
RAX-2	TGACCCAAGTATTCTCAGGC	AGTGCTCACATGGCGAGC	60
KRT19	TGACTTCCTACAGCTATCGC	TGAGGTTCTGCATGGTTAGC	58
HNF1B	GTGTCCAAGCTCACGTGC	AGGTGCGACTGGTTCAGGC	62
Sox17	TTGAACAGTATCTGCACTTCG	TGTGTAACACTGCTTCTGGC	58
KCNQ2-3	TGCTCATCGCTCCATTGC	AAAGTGCTTCTGCCTGTGC	58

Annexe 2 : Protocole de PCR

50 µl de Volume final

8 µl de dNTP à 5 mmol/l
5 µl de Tampon Taq à 10X
1,5 µl MgCl₂ à 50 mmol/l
1 µl d'amorce sens à 25 µM
1 µl d'amorce anti-sens à 25 µM
1 µl Taq polymérase à 5U/µl
X µl d'ADN plasmidique à 10 ng/µl
X µl d'H₂O purifiée

Cycles de PCR

30 cycles	{	(Dénaturation)	95°C	45 secondes
		(Hybridation)	58-62°C	45 secondes
		(Elongation)	72°C	45 secondes

Elongation finale : 72°C 7 minutes

Annexe 3 : Liste des anticorps utilisés

Anticorps primaires

Protéine cible de l'anticorps	Espèce	Fournisseur	Dilution
Kv7.2	Lapin	(collaborateur)	1 :2000
Kv7.3	Lapin	(collaborateur)	1 :2000
Actine	Souris	Millipore (MAB1501R)	1 :2500
Ankyrine G	Lapin	UC Davis/NINDS/NIMH NeuroMab Facility	1 :100
Etiquette V5	Lapin	Sigma Aldrich (V8137)	1 :100
Beta III tubuline	Lapin	Cell Signaling (D71G9)	1 :200
nestine	Poulet	Avès Labs, INC (F-1005)	1 :500
Vimentine	Souris	Sigma Aldrich (V6630)	1 :500
GFAP	Souris	BD Pharmingen (556329)	1 :400
Cav-3	Souris	BD Transduction Laboratories (610421)	1 :100

Anticorps secondaires

Anticorps	Espèce	Fournisseur	Dilution
Anti-souris Alexa Fluor® 547	Chèvre	Life technologies	1 :10 000
Anti-lapin Alexa Fluor® 488	Chèvre	Life technologies	1 :10 000
Anti-poulet Cyanine 5	Ane	Jackson immunoresearch	1 :10 000
Anti-chèvre HRP	Ane	Santa Cruz Biotechnology, SCBT,	1 :10 000
Anti-lapin HRP	Ane	Jackson immunoresearch	1 :10 000
Anti-souris HRP	Ane	Jackson immunoresearch	1 :10 000

HRP : Horseradish peroxidase

Annexe 4 : Solutions pour l'immunoblot

Lower Tris (pour le gel de séparation)

36.3g Tris Base (*Sigma Aldrich*)
8ml à 10% SDS (*Sigma Aldrich*)
Compléter avec un volume d'H₂O pour 200ml

Upper Tris (pour le gel de concentration des protéines)

12.1 g Tris base (*Sigma Aldrich*)
8ml à 10% SDS stock (*Sigma Aldrich*)
Compléter avec un volume d'H₂O pour 200ml; Ajuster le pH à 6.8

Pour un gel d'Acrylamide permettant la séparation des protéines (de concentration 7.5%)

1.0 ml d'Acrylamide à 30% (solution à 30:0.8) (*Sigma Aldrich*)
2.0 ml d'H₂O
1.0 ml de Lower Tris
3µl de TEMED (*Sigma Aldrich*)
15µl de Ammonium Persulfate à 10% (*Sigma Aldrich*)

Pour le gel du haut permettant la concentration des protéines (de concentration 3 %)

0.25 ml d'Acrylamide à 30% (solution à 30:0.8) (*Sigma Aldrich*)
1.625 ml d'H₂O
0.625 ml de Upper Tris
3.5µl de TEMED (*Sigma Aldrich*)
17.5µl de Ammonium Persulfate à 10% (*Sigma Aldrich*)

Tampon de dénaturation 4X

20 ml Glycérol (*Sigma Aldrich*)
10 ml 2-betamercaptoethanol (*Sigma Aldrich*)
6.0g SDS (*Sigma Aldrich*)
25 ml de Upper Tris
Compléter avec un volume d'H₂O pour 100ml

Tampon de migration Laemmli 1X

3.0g Tris base (*Sigma Aldrich*)
14.4g Glycine (*Sigma Aldrich*)
10ml à 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) (*Sigma Aldrich*)
Compléter avec un volume d'H₂O pour 1l

Tampon de transfert 1X

2.4g Tris base (*Sigma Aldrich*)
9g Glycine (*Sigma Aldrich*)
1ml à 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (*Sigma Aldrich*)
200 ml d'éthanol absolu (*Millipore*)
Compléter avec un volume d'H₂O pour 1l, le pH doit être à 8.3

AUTRES ARTICLES

Variable Clinical Expression in Patients with Mosaicism for KCNQ2 Mutations

Mathieu Milh,^{1,2,3} Caroline Lacoste,^{1,2,4} Pierre Cacciagli,^{1,2,4} Affef Abidi,^{1,2} Julie Sutera-Sardo,^{1,2,3} Ilias Tzelepis,^{1,2} Estelle Colin,⁵ Catherine Badens,^{1,2,4} Alexandra Afenjar,⁶ Anne Dieux Coeslier,⁷ Thomas Dailland,⁸ Gaetan Lesca,⁹ Nicole Philip,^{1,2,4} and Laurent Villard^{1,2*}

¹Inserm, UMR_S 910, Génétique Médicale et Génomique Fonctionnelle, Marseille, France

²Aix Marseille Université, GMGF, Faculté de Médecine, Marseille, France

³APHM, Hôpital d'Enfants de La Timone, Service de Neurologie Pédiatrique, Marseille, France

⁴APHM, Hôpital d'Enfants de La Timone, Département de Génétique Médicale, Marseille, France

⁵Département de Biochimie et Génétique, CHU d'Angers, Angers, France

⁶APHP, Hôpital Trousseau, Service de génétique clinique et Service de neuropédiatrie, Paris, France

⁷Clinique de Génétique, Hôpital Jeanne de Flandre, Lille, France

⁸Centre Hospitalier des Pays de Morlaix, Pédiatrie et Néonatalogie, Morlaix, France

⁹Département de Génétique Médicale, Hospices Civils de Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France

Manuscript Received: 24 March 2015; Manuscript Accepted: 9 April 2015

Mutations in the *KCNQ2* gene, encoding a potassium channel subunit, were reported in patients presenting epileptic phenotypes of varying severity. Patients affected by benign familial neonatal epilepsy (BFNE) are at the milder end of the spectrum, they are affected by early onset epilepsy but their subsequent neurological development is usually normal. Mutations causing BFNE are often inherited from affected parents. Early infantile epileptic encephalopathy type 7 (EIEE7) is at the other end of the severity spectrum and, although EIEE7 patients have early onset epilepsy too, their neurological development is impaired and they will present motor and intellectual deficiency. EIEE7 mutations occur de novo. Electrophysiological experiments suggested a correlation between the type of mutation and the severity of the disease but intra and interfamilial heterogeneity exist. Here, we describe the identification of *KCNQ2* mutation carriers who had children affected with a severe epileptic phenotype, and found that these individuals were mosaic for the *KCNQ2* mutation. These findings have important consequences for genetic counseling and indicate that neurological development can be normal in the presence of somatic mosaicism for a *KCNQ2* mutation. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: BFNE; EIEE7; encephalopathy; epilepsy; genetic counseling; *KCNQ2*; somatic mosaicism

INTRODUCTION

KCNQ genes encode voltage-gated potassium channel subunits. Functional *KCNQ* channels are composed of homomeric or heteromeric assemblies of 4 subunits. In neuronal cells, *KCNQ2* and *KCNQ3* heterotetramerize to give rise to the M current (I_M), a key

How to Cite this Article:

Milh M, Lacoste C, Cacciagli P, Abidi A, Sutera-Sardo J, Tzelepis I, Colin E, Badens C, Afenjar A, Coeslier AD, Dailland T, Lesca G, Philip N, Villard L. 2015. Variable clinical expression in patients with mosaicism for *KCNQ2* mutations. *Am J Med Genet Part A* 167A:2314–2318.

player for the regulation of neuronal excitability [Brown and Passmore, 2009]. Until recently, *KCNQ2* (OMIM 602235) and *KCNQ3* (OMIM 602232) mutations had only been reported in benign familial neonatal epilepsy (BFNE, OMIM 121200) [Biervert et al., 1998; Singh et al., 1998] and peripheral nerve hyper excitability or myokymia [Dedek et al., 2001]. Patients suffering from BFNE present stormy partial motor seizures starting few days after birth, normal or subnormal interictal EEG activity and usually normal cognitive development. The epilepsy usually stops before the end of

Conflict of interest: none.

Grant sponsor: Programme Hospitalier de Recherche Clinique 2011 ;

Grant sponsor: Inserm and Aix Marseille University.

*Correspondence to:

Laurent Villard, Inserm UMR_S 910 - Faculté de Médecine de La Timone, 27 bd Jean Moulin - 13385 Marseille cedex 5 - France.

E-mail: laurent.villard@univ-amu.fr

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 10 May 2015

DOI 10.1002/ajmg.a.37152

the 3rd month. In BFNE, *KCNQ2* mutations are transmitted from affected individual to affected individual following a classical autosomal dominant inheritance mode. More recently, mutations in the *KCNQ2* gene were also described in a very severe epileptic phenotype called early infantile epileptic encephalopathy (EIEE) subtype 7 (OMIM 613720) [Dedek et al., 2003; Weckhuysen et al., 2012]. Here, contrary to what is observed in BFNE, the patients present a severe phenotype with most often a suppression burst EEG pattern and frequent polymorphic seizures. In most cases, the evolution is poor with severe neurological impairment accompanied by severe intellectual deficiency. Furthermore, a proportion of patients die within the first years of life. Mutations causing EIEE7 had occurred de novo in most cases [Weckhuysen et al., 2012]. In most cases, the mutations causing BFNE alter a different amino acid than the mutations causing EIEE7, revealing a significant genotype–phenotype correlation for these two epileptic disorders. Given that mutations causing EIEE7 are usually found to have occurred de novo, a variant in the *KCNQ2* gene inherited from a healthy parent would likely be considered to be a non-pathogenic variant. However, we show here that variants in the *KCNQ2* gene can be inherited from an apparently healthy parent and yet cause a severe phenotype, a discovery that has strong implications for pediatric neurologists, clinical geneticists, and genetic counselors.

MATERIALS AND METHODS

Cohort and DNA Samples

The samples used in this study come from a research cohort assembled during the course of a clinical research project (PHRC IR 2011, Marseille University Hospital) and from the diagnostic activity of the departments of Medical Genetics of La Timone Children's Hospital, Marseille and Lyon University Hospital, Lyon, France. Inclusion criteria for the patients were the presence of recurrent seizures occurring before 1 month of age in a patient with a normal metabolic profile and normal MRI. This project was approved by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée II). DNA samples were prepared using standard procedures from blood, and from buccal cells or hair roots when possible.

Sequencing, Cloning and Mosaicism Analysis

Primers used to amplify *KCNQ2* exons were designed starting from reference sequence NM_172107. All exons were amplified using total genomic DNA (primer sequences are available upon request) and sequenced on a 3130XL automated sequencer (Thermo Fisher Inc., Waltham, MA). For carriers where alternative DNA sources were available, the PCR amplicons containing the mutation were subcloned in pGEM-T and transformed into XL1 Blue cells (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA). One hundred clones for each transformation were sequenced using the Big Dye kit (Thermo Fisher).

RESULTS

We used Sanger sequencing to screen the coding exons of *KCNQ2* in DNA samples from patients suffering from epileptic encephalopathy.

All patients had intellectual disability and epilepsy that started before 1 month of age. EEG data could not be collected for all cases. In that cohort, we identified 43 variants in the *KCNQ2* gene in 208 patients (20.6%) (Table I). Among these, 21 variants had arisen de novo, 14 variants were found to be inherited from an unaffected parent and for the remaining eight variants, unavailability of parental DNA did not allow us to determine if the mutation was inherited or de novo. Among the variants inherited from unaffected parents, we identified the c.881C>T/p.A294V mutation in a child (patient 1) with a severe phenotype, with seizure onset in the first days of life and a suppression burst EEG pattern. Patient 1 was initially diagnosed as having Ohtahara syndrome. She became seizure-free within the first year of life, with global developmental delay. Interestingly, the p.A294V mutation is a hotspot mutation in *KCNQ2* that has been identified five times in our diagnostic cohorts and twice in the literature [Steinlein et al., 2007; Kato et al., 2013]. All reported patients had de novo occurrences and all suffered from a severe phenotype. To our surprise, the p.A294V mutation, identified in patient 1 was also found in his unaffected mother (data not shown). We showed that this mutation alters the I_M current and the localization of the *KCNQ2/KCNQ3* tetramers within neurons [Abidi et al., 2015]. The recurrence of the p.A294V mutation in patients with a similar phenotype and its impact on the function of the *KCNQ* channels made it very unlikely to be a benign variant. We thus amplified a DNA segment containing the p.A294V mutation using DNA prepared from buccal swabs, hair root, and the blood of the carrier mother to study tissues of different embryonic origin. PCR products were prepared using two different PCR reactions and were cloned in pGEM-T. For each tissue, 2×50 clones were sequenced and the clones harboring the c.881C>T mutation were counted. The results of this analysis showed that the patient's mother carried the mutation in 30% of clones in the PCR product originating from blood, whereas her affected daughter has 49% of mutant clones in similar conditions, as expected for a heterozygous carrier. The percentage of mutant clones was 29% and 51% in the DNA prepared from buccal cells and hair roots, respectively. These results indicate that the mother of Patient 1 is a mosaic carrier for the c.881C > T mutation. We went back to the available medical files of the mother and found that she had experienced a few neonatal seizures, diagnosed as benign neonatal epilepsy. She had been free of seizures since then. She developed normally, with good social integration but with low educational achievements.

Based on these findings, we retrospectively analyzed the medical files of all the apparently healthy parents who had transmitted a *KCNQ2* variant to a severely affected child (see Table I). In our series, we had eight maternal and six paternal transmissions in 14 patients (including the p.A294V mutation described above). All the variants were different and seven of them were synonymous substitutions considered to be polymorphisms although absent from dbSNP build 141. For the remaining six missense mutations that had been inherited from a healthy parent (p.A253T, p.P420M, p.V422I, p.A501P, p.M551T, and p.R871S), examination of the Sanger sequencing traces revealed similar peak intensities between the affected child and the carrier parent. However, the mother of Patient 2, who was a carrier for the p.A253T mutation, had experienced neonatal seizures that lasted several days. She

TABLE I. Summary of the Variants Identified in the *KCNQ2* Gene in 208 EOE Patients. Mutations are Numbered Based on the Reference Sequence NM_172107. All Variants Were Confirmed Using a Second Sample. Parental Identity was Confirmed Using a set of 5 Highly Polymorphic Microsatellites. The Inheritance Pattern and SNP Referenced in dbSNP Build 141 at the Same Amino Acid Position are Provided

Protein variation	Nucleotide variation	Exon	Inheritance	dbSNP build 141
p.M1V	c.1A>G	1	Unknown	p.M1V ^a , p.M1T ^a
p.V175L	c.523G>T	4	De novo	—
p.G189V	c.566G>T	4	Unknown	—
p.L203P	c.608T>C	4	De novo	—
p.R207Q	c.620G>A	4	De novo	p.R207W ^a , p.R207G ^a
p.R207W	c.619C>T	4	Unknown	p.R207Q ^a , p.R207G ^a
p.R213W	c.637C>T	4	De novo	p.R213W ^a
p.G239R	c.715G>C	5	De novo	—
p.A253T	c.757G>A	5	Maternal	—
p.A265V	c.794C>T	5	De novo	p.A265A
p.A265V	c.794C>T	5	Unknown	p.A265A
p.T274M	c.821C>T	6	De novo	p.T274T
p.T274M	c.821C>T	6	De novo	p.T274T
p.G279C	c.835G>T	6	Unknown	—
p.T287N	c.860C>A	6	De novo	p.T287T
p.G290S	c.868G>A	6	De novo	p.G290D ^a
p.A294V	c.881C>T	6	De novo	p.A294G ^a
p.A294V	c.881C>T	6	De novo	p.A294G ^a
p.A294V	c.881C>T	6	De novo	p.A294G ^a
p.A294V	c.881C>T	6	De novo	p.A294G ^a
p.A294V	c.881C>T	6	Paternal	p.A294G ^a
p.A294V	c.881C>T	6	Maternal	p.A294G ^a
p.G301S	c.901G>A	6	De novo	—
p.F304S	c.911T>C	6	De novo	p.F304F
p.A306V	c.917C>T	6	Unknown	p.A306S ^a , p.A306P ^a , p.A306T ^a
p.A309V	c.926C>T	6	De novo	—
Splicing defect	c.1024-2A>G	8	Unknown	—
p.L351L	c.1053C>T	8	Maternal	—
p.R353H	c.1058G>A	8	De novo	p.R353G ^a
p.L356V	c.1066C>G	8	Unknown	—
p.S401S	c.1203T>C	10	Paternal	—
p.P420M	c.1259C>T	11	Paternal	p.P420L ^a
p.V422I	c.1264G>A	11b	Paternal	—
p.A501P	c.1501G>C	13	Maternal	p.A501A
p.P534P	c.1602G>A	14	Maternal	—
p.R541G	c.1621A>G	14	De novo	—
p.R547R	c.1644G>A	15b	Maternal	—
p.M551T	c.1652T>C	15b	Paternal	—
p.D563N	c.1687G>A	15	De novo	p.D563E
p.D563D	c.1689C>T	15	Maternal	p.D563E
p.P652P	c.1956G>A	17	Paternal	—
p.C774Lfs*91	c.2318insG	17	De novo	—
p.R871S	c.2613G>T	17	Maternal	p.R871G ^a

^aDenotes Predicted Pathogenicity According to dbSNP 141.

developed normally with a normal intellectual state. Her daughter was born at term. She experienced tonic asymmetric seizures in a stormy way beginning during the first day of life. She was admitted in intensive neonatal care unit. Interictal EEG showed multifocal spikes, without suppression-burst. She rapidly became seizure-free with a normal EEG. At 3 years of age, she has a global develop-

mental delay with absence of language. Unfortunately, despite several attempts, we were not able to obtain new samples or samples originating from different tissues for the carrier mother of Patient 2 to study putative somatic mosaicism in different tissues.

In the cohort of patients from Lyon, we found a mosaic state in two parents who had transmitted their respective mutation to a

child with EIEE. Patient 3 experienced tonic and tonic-clonic seizures at day 1. EEG showed slow background activity with bilateral paroxysmal discharges. Seizures were controlled at 3 weeks of age by valproate. At 16 months of age, she had slight motor and speech delay and stereotypic movements of the hands. Brain MRI at 1 month of life was normal. Sanger sequencing showed the presence of the p.A294V mutation, in a 20% mosaic state in the father. He had experienced seizures from the neonatal period that persisted until childhood. This patient is now seizure-free and has normal cognitive development. The second patient from Lyon was born at 31 weeks of pregnancy. She first experienced focal seizures at 1.5 months of age, corresponding to term in corrected age. She had frequent focal tonic seizures and clusters of spasms. EEG showed multifocal spikes. Epilepsy was initially resistant to valproate and was controlled with vigabatrin, and levetiracetam. Brain MRI was normal. At last examination, she was aged two. She has been free of seizures since the age of 6 months with levetiracetam. EEG was normal. Psychomotor development was mildly delayed. Genetic analysis found the c.997C>T/p.R333W mutation. This mutation was also found in low mosaic state (5%) by Sanger sequencing in the mother, who had no history of neonatal seizures. Taken together, we found three confirmed mosaic carriers of a *KCNQ2* mutation and one possible carrier. Three of them were affected by neonatal epilepsy, but with subsequently normal neurological development.

DISCUSSION

Our results demonstrate that a *KCNQ2* mutation can be inherited from an apparently healthy parent and yet cause a severe neurological phenotype in the affected child. A literature survey revealed that two previously published *KCNQ2* mutations were proposed to be mosaic. The first mutation was a c.854C>A/p.P285H mutation in a patient with moderate intellectual disability at 2 years of age [Kato et al., 2013] that was also found in her carrier mother, in whom Sanger sequencing performed in 46 clones showed 28% of mosaicism (13/46 clones were carrying the variant). The second mutation was a c.638G>A/p.R213Q substitution but it was inherited from a symptomatic carrier father, in whom the level of mosaicism was estimated to be 30% as shown by restriction digest of PCR fragments. The carrier father had myokymia, epilepsy between 4 days to 11 weeks and he is still on carbamazepine therapy at age 32 [Weckhuysen et al., 2012]. The same amino acid was affected by the c.637C>T/p.R213W mutation found to have occurred de novo in a severely affected individual in our cohort but also in a family presenting BFNE [Sadewa et al., 2008]. Analysis of the electrophysiological properties of the two mutations suggests that the p.R213W mutation has a milder effect on the function of the potassium channel than the p.R213Q mutation [Miceli et al., 2008]. The presence of that same mutation in a severely affected individual in our cohort is currently unexplained, although intra and interfamilial variability was previously documented for *KCNQ2* mutations [Soldovieri et al., 2014].

In our study, the level of mosaicism detected in blood samples ranges from 5% to 30% of cells. The neurological development of the mosaic carriers was normal in all cases, suggesting that up to 30% of cells carrying a mutation in *KCNQ2* is not sufficient to

impair neurological development. In contrast, it seems that a low rate of mutated neurons is sufficient to cause neonatal seizures. Importantly, the transmission of these mutations to severely affected children indicates that pediatric neurologists, clinical geneticists, and genetic counselors need to consider mosaicism for all inherited variants in the *KCNQ2* gene. Conversely, our results raise new questions in genetic counseling of patients presenting with BFNE. Genetic counseling is easy in case of a familial transmission with all affected individuals presenting the same benign course of the disease. However, when a de novo *KCNQ2* mutation is identified in an individual presenting with BFNE, or when family investigation is not possible, careful attention must be paid to the detection of somatic mosaicism. Such mosaic individuals are potentially at risk of giving birth to children suffering from EIEE7.

In conclusion, we recommend that all inherited mutations in *KCNQ2* be checked for: (1) the presence of subtle epileptic phenotypes in early infancy in the carrier parent; (2) the uneven distribution of the two alleles on Sanger sequencing results (or other mutation screening techniques). Finally, these findings also suggest that in order to cause a neurological disease, *KCNQ2* mutations causing EIEE7 must be present in a sufficient proportion of cells and that the neurological development can proceed normally after birth with up to 30% of abnormal *KCNQ2* subunits.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all patients and their families for their participation in this study. This work was supported by Programme Hospitalier de Recherche Clinique 2011, Inserm and Aix Marseille University. We thank the Centre de Ressources Biologiques of La Timone Children's Hospital (Karine Bertaux, Cécile Mouradian and Andrée Robaglia-Schlupp) for assistance with the samples used in this study and Raphaëlle Lamy for expert technical assistance.

REFERENCES

- Abidi A, Devaux JJ, Molinari F, Alcaraz G, Michon FX, Sutura-Sardo J, Becq H, Lacoste C, Altuzzara C, Afenjar A, Mignot C, Doummar D, Isidor B, NGuyen S, Colin E, De la Vaissière S, Haye D, Trauffer A, Badens C, Prieur F, Lesca G, Villard L, Milh M, Aniksztejn L. 2015. Functional and subcellular consequences of a recurrent *KCNQ2* mutation associated to early epileptic encephalopathy: A moderate effect on M current but a strong impact on Kv7 channels neuronal targeting. *Neurobiol Dis*, in press.
- Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK. 1998. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279:403–406.
- Brown DA, Passmore GM. 2009. Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br J Pharmacol* 156:1185–1195.
- Dedek K, Kunath B, Kananura C, Reuner U, Jentsch TJ, Steinlein OK. 2001. Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the *KCNQ2* K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12272–12277.
- Dedek K, Fusco L, Teloj N, Steinlein OK. 2003. Neonatal convulsions and epileptic encephalopathy in an Italian family with a missense mutation in the fifth transmembrane region of *KCNQ2*. *Epilepsy Res* 54:21–27.
- Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D, Weiss S, Kashii H, Kusano R,

- Matsumoto A, Nakamura K, Oyazato Y, Maeno M, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito K, Hayasaka K, Matsumoto N, Saito H. 2013. Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia* 54:1282–1287.
- Miceli F, Soldovieri MV, Ambrosino P, Barrese V, Migliore M, Cilio MR, Tagliatalata M. 2008. Genotype-phenotype correlations in neonatal epilepsies caused by mutations in the voltage sensor of K(v) 7.2 potassium channel subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:4386–4391.
- Sadewa AH, Sasongko TH, Gunadi, Lee MJ, Daikoku K, Yamamoto A, Yamasaki T, Tanaka S, Matsuo M, Nishio H. 2008. Germ-line mutation of KCNQ2, p.R213W, in a Japanese family with benign familial neonatal convulsion. *Pediatr Int* 50:167–171.
- Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A, Anderson VE, Leppert M. 1998. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 18:25–29.
- Soldovieri MV, Boutry-Kryza N, Milh M, Doummar D, Heron B, Bourel E, Ambrosino P, Miceli F, De Maria M, Dorison N, Auvin S, Echenne B, Oertel J, Riquet A, Lambert L, Gerard M, Roubergue A, Calender A, Mignot C, Tagliatalata M, Lesca G. 2014. Novel KCNQ2 and KCNQ3 mutations in a large cohort of families with benign neonatal epilepsy: first evidence for an altered channel regulation by syntaxin-1A. *Hum Mutat* 35:356–367.
- Steinlein OK, Conrad C, Weidner B. 2007. Benign familial neonatal convulsions: Always benign? *Epilepsy Res* 73:245–249.
- Weckhuysen S, Mandelstam S, Suls A, Audenaert D, Deconinck T, Claes LR, Deprez L, Smets K, Hristova D, Yordanova I, Jordanova A, Ceulemans B, Jansen A, Hasaerts D, Roelens F, Lagae L, Yendle S, Stanley T, Heron SE, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE, de Jonghe P. 2012. KCNQ2 encephalopathy: Emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* 71:15–25.

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nucleotide mutation	c.15delC	c.1439C>T	Na	c.795-2A>G	c.1461+5G>A	c.1720A>C	c.902+1G>A	c.308A>C	c.1162C>T	c.734A>C	c.1093_1094 delCT	c.1630G>C
Protein mutation	p.Leu6Serfs*13	p.Pro480Leu		Intron 9	Intron16	p.Thr574Pro	Intron 10	p.His103Pro	p.Arg388*	p.His245Pro	p.Cys366Profs*13	p.Gly544Arg
Mutation Taster	Disease Causing score=1	Disease Causing score=0,99		Disease Causing score=1	Disease Causing score=1	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=1	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=1	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=1	Disease Causing score=0,99
SIFT	/	Damaging score=0		/	/	Damaging score=0	/	Damaging score=0	/	Damaging score=0	/	Damaging score=0
PolyPhen-2	/	Probably Damaging score=1		/	/	Probably Damaging score=1	/	Probably Damaging score=1	/	Probably Damaging score=1	/	Probably Damaging score=1
JMD Predictor	/	Pathogenic score=90		/	/	Pathogenic score=90	/	Pathogenic score=93	Pathogenic score=100	Pathogenic score=96	/	Pathogenic score=99
Human Splice Finder				Broken WT Acceptor Site	Broken WT Donor Site		Broken WT Donor Site					
dbSNP	No	No		No	No	No	No	No	No	No	No	No
ExacBrowser	No	No		No	No	No	No	No	No	No	No	No

Supplementary table 1 (part 1)

Patient	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Nucleotide mutation	c.548T>G	c.1060T>C	c.1060T>C	c.568C>T	c.1217G>A	c.83G>A	c.1651C>T	Na	c.325+4A>G	c.1439C>T	c.661G>T	c.771dup
Mutation Protein	p.Leu183Arg	p.Cys354Arg	p.Cys354Arg	p.Arg190Trp	p.Arg406His	p.Trp28*	p.Arg551Cys		Intron 5	p.Pro480Leu	p.Glu221*	p.Pro258Alafs*5
Mutation Taster	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=1	Disease Causing score=0,99		Disease Causing score=1	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=1	Disease Causing score=1
SIFT	Damaging score=0	Damaging score=0	Damaging score=0	Damaging score=0	Damaging score=0	/	Damaging score=0		/	Damaging score=0	/	/
PolyPhen-2	Probably Damaging score=1	Probably Damaging score=1	Probably Damaging score=1	Probably Damaging score=1	Probably Damaging score=1	/	Probably Damaging score=1		/	Probably Damaging score=1	/	/
UMD Predictor	Pathogenic score=99	Pathogenic score=96	Pathogenic score=96	Pathogenic score=100	Pathogenic score=81	Pathogenic score=100	Pathogenic score=99		/	Pathogenic score=90	Pathogenic score=100	/
Human Splice Finder									Broken WT Donor Site - New Donor Site			
dbSNP	No	No	No	No	No	No	No		No	No	No	No
ExacBrowser	No	No	No	No	No	No	No		No	No	No	No

Supplementary table 1 (part 2)

Supplementary table 1 : *STXBPI* mutations in the 24 patients with predicted pathogenicity of the mutation according to SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster, UMD Predictor or HSF. The mutations are absent from dbSNP and Exac.



Epileptic patients with de novo *STXBPI* mutations: Key clinical features based on 24 cases

¹Chloé Di Meglio, ²Gaetan Lesca, ¹Nathalie Villeneuve, ^{3,4,5}Caroline Lacoste, ^{3,5}Affef Abidi, ^{3,4,5}Pierre Cacciagli, ⁶Cécilia Altuzarra, ^{7,8}Agathe Roubertie, ⁹Alexandra Afenjar, ⁹Florence Renaldo-Robin, ¹⁰Bertrand Isidor, ¹¹Agnes Gautier, ¹²Marie Husson, ¹³Claude Cances, ¹⁴Julia Metreau, ¹⁵Cécile Laroche, ¹⁶Mondher Chouchane, ¹⁷Dorothee Ville, ¹⁷Stéphanie Marignier, ¹⁷Christelle Rougeot, ¹⁸Marine Lebrun, ¹⁹Anne de Saint Martin, ²⁰Alexandra Perez, ²¹Audrey Riquet, ^{3,4,5}Catherine Badens, ⁴Chantal Missirian, ^{3,4,5}Nicole Philip, ¹Brigitte Chabrol, ^{3,5*}Laurent Villard, and ^{1,3,5*}Mathieu Milh

Epilepsia, 56(12):1931–1940, 2015
doi: 10.1111/epi.13214

SUMMARY

Objective: Mutations in the syntaxin binding protein I gene (*STXBPI*) have been associated mostly with early onset epileptic encephalopathies (EOEEs) and Ohtahara syndrome, with a mutation detection rate of approximately 10%, depending on the criteria of selection of patients. The aim of this study was to retrospectively describe clinical and electroencephalography (EEG) features associated with *STXBPI*-related epilepsies to orient molecular screening.

Methods: We screened *STXBPI* in a cohort of 284 patients with epilepsy associated with a developmental delay/intellectual disability and brain magnetic resonance imaging (MRI) without any obvious structural abnormality. We reported on patients with a mutation and a microdeletion involving *STXBPI* found using array comparative genomic hybridization (CGH).

Results: We found a mutation of *STXBPI* in 22 patients and included 2 additional patients with a deletion including *STXBPI*. In 22 of them, epilepsy onset was before 3 months of age. EEG at onset was abnormal in all patients, suppression-burst and multifocal abnormalities being the most common patterns. The rate of patients carrying a mutation ranged from 25% in Ohtahara syndrome to <5% in patients with an epilepsy beginning after 3 months of age. Epilepsy improved over time for most patients, with an evolution to West syndrome in half. Patients had moderate to severe developmental delay with normal head growth. Cerebellar syndrome with ataxic gait and/or tremor was present in 60%.



Chloé Di Meglio is a resident in pediatrics at Timone Children Hospital, Marseille, France.

Accepted September 11, 2015; Early View publication October 29, 2015.

¹Pediatric Neurology Department, Timone Children Hospital, Marseille, France; ²INSERM, U1028, CNRS, UMR5292, Laboratory of Molecular Genetics, Lyon, France; ³Aix Marseille University, INSERM, UMR_S 910, Marseille, France; ⁴Medical Genetics Department, Timone Children Hospital, Marseille, France; ⁵Aix Marseille University, GMGF, Marseille, France; ⁶Department of Pediatrics, St. Jacques Hospital, Besançon, France; ⁷Pediatric Neurology Department, Montpellier University Hospital, Montpellier, France; ⁸Institute for Neurosciences of Montpellier (INM), INSERM U 1051, Montpellier, France; ⁹Pediatric Neurology Department, Trousseau Hospital, AP-HP, Paris, France; ¹⁰Medical Genetics Department, Nantes University Hospital, Nantes, France; ¹¹Department of Pediatrics, Nantes University Hospital, Nantes, France; ¹²Pediatric Neurology Department, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France; ¹³Pediatric Neurology Department, Toulouse University Hospital, Toulouse, France; ¹⁴Pediatric Neurology Department, Bicêtre Hospital, Kremlin-Bicêtre, France; ¹⁵Department of Pediatrics, Limoges University Hospital, Limoges, France; ¹⁶Department of Pediatrics, Dijon University Hospital, Dijon, France; ¹⁷Pediatric Neurology Department, Lyon University Hospital, Bron, France; ¹⁸Medical Genetics Department, St Etienne University Hospital, Saint Prieux en Jarez, France; ¹⁹Pediatric Neurology Department, Haute-pierre Hospital, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France; ²⁰Pediatric Intensive Care Unit, Haute-pierre Hospital, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France; and ²¹Pediatric Neurology Department, Lille University Hospital, Lille, France

Address correspondence to Mathieu Milh, Faculté de Médecine, Aix Marseille University, INSERM, GMGF UMR_S 910, 13385, Marseille, France. E-mail: mathieu.milh@ap-hm.fr

*These authors contributed equally to the work.

Wiley Periodicals, Inc.

© 2015 International League Against Epilepsy

Significance: Our data confirm that *STXBPI* mutations are associated with neonatal-infantile epileptic encephalopathies. The initial key features highlighted in the cohort of early epileptic patients are motor seizures either focal or generalized, abnormal interictal EEG, and normal head growth. In addition, we constantly found an ongoing moderate to severe developmental delay with normal head growth. Patients often had ongoing ataxic gait with trembling gestures. Altogether these features should help the clinician to consider *STXBPI* molecular screening.

KEY WORDS: Ohtahara syndrome, Early onset epileptic encephalopathy, Genetics, Suppression-burst.

KEY POINTS

- We describe 24 patients carrying a mutation of *STXBPI*, from a large cohort of 284 epileptic patients
- *STXBPI* mutations are found in approximately 10% of patient with an early onset epileptic encephalopathy, with a rate of 25% in Ohtahara syndrome
- Half of the mutated patients evolve to West syndrome, but only one of 24 patient was diagnosed with West syndrome from the beginning of the epilepsy
- Epilepsy improves after the first year of life in most mutated patients
- All of them have moderate to severe developmental delay with normal head circumference

The first mutation in the syntaxin binding protein 1 gene (*STXBPI*) was described in 2008.¹ This mutation was a de novo microdeletion identified using microarray technologies in a girl with early infantile epileptic encephalopathy (EIEE) with a suppression-burst pattern on initial electroencephalography (EEG). When this gene was examined in patients with a similar phenotype, 14 of 43 unrelated patients were found to carry an *STXBPI* mutation.^{1,2} Clinical picture at onset was quite stereotyped: neonatal onset of epilepsy, motor seizures (clonic, tonic, and spasms) occurring in a stormy way, abnormal EEG showing a suppression-burst pattern, and normal findings on brain magnetic resonance imaging (MRI). The implication of *STXBPI* mutations in Ohtahara syndrome (OS) has been confirmed since then (EIEE4, MIM612164).¹⁻⁷ Longitudinal follow-up of patients showed that, in most cases, seizures disappeared or became rare, and EEG dramatically improved in the first year of life. During childhood, severe developmental disability was constant, associated with movements disorders (dyskinesia, stereotypies, and tremor), which could be sometimes misinterpreted as epileptic seizures.^{4,8}

Besides this description, mutations in *STXBPI* were found in various other conditions: infantile spasms with hypsarrhythmia^{3,9} (West syndrome), early onset epileptic

encephalopathy (EOEE) without specific epileptic syndrome,^{10,11} and late-onset infantile spasms with partial respiratory chain complex IV deficiency.¹² Truncating mutations have also been reported in a few patients with nonsyndromic intellectual disability without history of epilepsy.¹³ Recently, Carvill et al.¹⁴ described three patients with Dravet syndrome not mutated for *SCN1A* but with a de novo *STXBPI* mutation. Overall, the proportion of mutated patients was highly variable, according to the clinical presentation: ~10% in cases of EOEE without specific epileptic/EEG features,¹⁰ ~2% in cohorts of West syndrome,³ and <1% in intellectual disability without epilepsy.^{10,13} Key clinical features are needed to warrant molecular investigation of *STXBPI* and to increase the odds of finding a pathogenic mutation.^{3,4}

The aim of this study is to identify the main clinical features associated with *STXBPI*-related epileptic encephalopathies. For that purpose we have screened *STXBPI* in a large cohort of 284 epileptic patients and studied 22 patients with *STXBPI* mutations to extract common key clinical features compared with nonmutated cases. We also reported two additional cases in which we found a microdeletion including *STXBPI* using array comparative genomic hybridization (CGH).

PATIENTS AND METHODS

Patient selection

We received 284 requests from various pediatric neurology centers in France to screen the *STXBPI* gene for mutations between November 2010 and March 2014. The DNAs were initially sent to two groups (Lyon, n = 73; and Marseille, n = 211). The clinical data of non-mutated patients could be retrieved for all the patients whose DNA was sent to Marseille, since a specific questionnaire was sent with the DNA. There were 44 of 211 patients with Ohtahara syndrome, 45 of 211 patients with West syndrome as initial symptom (onset before 3 months in 20 patients), 50 patients with nonspecific EOEE, 6 patients with early myoclonic epilepsy, and 66 patients with nonspecific epileptic features beginning after 3 months. Overall, in the Marseille

group, epilepsy began before 3 months of age in 145 patients, between 3 and 12 months in 51 patients, and after 12 months for only 15 patients. All the patients underwent clinical diagnostic *STXBPI* gene sequencing in this study. The study was approved by the local ethics committee (CPP Sud Méditerranée reference 1153). All blood samples were obtained after receiving informed consent. We included two additional patients in whom a microdeletion including *STXBPI* was found using array CGH analysis. The first (patient 3) was first addressed for *STXBPI* testing (found to be negative using Sanger sequencing); the second (patient 20), had a microdeletion identified without any a priori on a specific abnormality. Most of the patients in the cohort have had an array CGH analysis, but we cannot be certain that it was the case for all the patients. Clinicians ensuring the patient's follow-up described the phenotype of each patient by studying retrospective clinical history and neurologic examination. We paid particular attention to clinical and paraclinical elements associated in the literature with *STXBPI* mutation: classification in epileptic syndrome according to the International League Against Epilepsy (ILAE) classification¹⁵; refractoriness of epilepsy; existence of epileptic spasms and/or hypsarrhythmic pattern on EEG; history of status epilepticus, nonepileptic movements, and fever sensitivity; and developmental status. We also reported on other features easily obtained: evolution of head growth, cerebellar signs (ataxic gait and trembling) and initial brain magnetic resonance imaging (MRI). We paid specific attention to characterize the following:

- (1) Age at seizure onset (before 1 week, before 1 month, or before 3 months),
- (2) Type of seizure,
- (3) Number of seizures according to the age group,
- (4) Electroencephalographic aspects,
- (5) Antiepileptic drug response, and
- (6) Age at the last seizure.

EEG

Patients with active epilepsy had electrophysiologic follow-up at least once a year with awake and sleep tracings. EEG data were analyzed by a pediatric neurologist or a neurophysiologist.

MRI

A first brain MRI was performed in all patients in the first year of the disease, and most often a control MRI was performed a few years after. Because MRI studies were performed in different institutions and sometimes several years ago, the imaging sequences could be quite variable, but all of the examinations contained anatomic sequences (T₁- and T₂-weighted) in the three axes (axial, coronal, and sagittal). The MRI images were analyzed by experienced radiologists.

Molecular analysis

DNA was extracted from peripheral blood for all patients and their parents. The 20 exons of *STXBPI* were amplified using polymerase chain reaction (PCR) (primer sequences are available upon request) and sequenced according to standard procedures on a 3500XL or a 3130XL automated sequencer (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.). All mutations were confirmed using a second sequencing run and compared with parental DNAs to determine inheritance patterns. Mutations are numbered according to the GeneBank reference sequence NM_003165.

Array CGH and quantitative PCR: array CGH was performed using genomic DNA isolated from blood lymphocytes by standard methods, using Agilent 4x180K arrays (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.). Microarrays were hybridized, scanned, and analyzed according to the manufacturer's instructions using an Agilent microarray analysis platform. Regions showing abnormal dosage were compared with regions already known to represent non-pathogenic copy number variations (CNVs) listed in the database of genomic variants (<http://projects.tcag.ca/cgi-bin/variation/gbrowse/hg18>). Deletions were confirmed using quantitative PCR.

RESULTS

STXBPI molecular analysis

Twenty different mutations were identified in 22 patients (Table S1). Except for patients 14 and 15, who were twins, patients were unrelated. The mutations were confirmed to have occurred de novo, except for the four patients for whom parental DNA was not available (14, 15, 18, and 22). Eight mutations were nonsense; 10 were missense mutations. Two patients had a deletion altering the *STXBPI* locus detected using array CGH: patient 20 carried an intragenic deletion of *STXBPI* involving exons 2–9 arr[hg19] 9q34.11 (130,384,864–130,428,601)x1, and patient 3 carried a larger deletion involving two OMIM genes: *STXBPI* and *LRSAMI* arr[hg19] 9q33.3q34.11(129,548,333–130,533,312)x1 (Table 1). There were no obvious correlations between the mutation class and the type or severity of epilepsy. We found only one recurrent mutation, in two unrelated patients (patients 2 and 22).

Epilepsy features of the patients carrying a mutation of *STXBPI*

A mutation in the *STXBPI* gene was identified in 22 patients (8%) among the 284 requests received, and in 24 patients in total if we include the patients with a microdeletion of *STXBPI* found using array CGH. The median duration of follow-up was 4.5 years (10 months to 18 years). Table 1 summarizes clinical data from the patients.

The first neurologic symptoms were epileptic seizures in 22 of 24 patients, in 8 of 22 during the first week, in the maternity unit, and in 14 of 22 during the first month of life,

Table 1. Clinical features of patients with STXBPI mutation

	1 (10.5 y)	2° (4.5 y)	3 (18 y)	4 (13 m)	5 (13 y)	6° (4.5 y)	7° (3.5 y)	8 (3.5 y)	9 (3.5 y)	10 (7 y)	11 (10 m)	12 (5.5 y)
Nucleotide mutation	c.15delC	c.1439C>T	~1 Mb deletion involving STXBPI	c.795-2A>G	c.1461 + 5G>A	c.1720A>C	c.902 + 1G>A	c.308A>C	c.1162C>T	c.734A>C	c.1093_1094 delCT	c.1630G>C
Age at diagnosis	9 y	5.5 y	16 y	7 m	12.5 y	14 m	3 y	19 m	30 m	7 y	7 m	5 y
Ohtahara syndrome	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Age at first seizure	3 days	3 days	4 days	11 days	2 days	5 weeks	1 day	5 weeks	9 weeks	1 day	1 day	35 days
Initial seizure	c	c	c	c	c	s	c	t	s + m	c + s	S	t
Refractory epilepsy	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
West syndrome	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
Status epilepticus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polymorph partial seizure	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
Age at epilepsy spontaneous recovery	-	-	-	8 m	-	-	10 m	-	-	-	-	4 m
Nonepileptic movement	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
Stereotypic movement	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	Nav
Dystonia	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	Nav
Deceleration of head growth	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Initial tone	High	Low	Low	High	Normal	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Walk	-	-	+	NA	+	-	+	-	-	-	-	-
Eye contact	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Language	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Normal initial MRI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Progressive hypomyelination	-	-	+	NA	-	-	-	-	-	-	NA	-
Abnormal exam before epilepsy	+	+	+	+	-	+	+	-	+	NA	+	-
Ataxic gait	NA	NA	+	NA	+	NA	+	NA	NA	NA	NA	-
Trembling	+	+	+	+	+	NA	-	-	-	-	-	+
Fever sensitivity	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Continued

Table 1. Continued.

Patient number (age at last examination)	13 ^a (4 y)	14 (4 y)	15 (4 y)	16 (16 y)	17 (8 y)	18 (5 y)	19 (4.5 y)	20 (19 y)	21 (18 m)	22 (5 y)	23 (18 y)	24 (5 y)
Nucleotide mutation	c.548T>G	c.1060T>C	c.1060T>C	c.568C>T	c.1217G>A	c.83G>A	c.1651C>T	~40 kb deletion involving exon 2	c.325 + 4A>G	c.1439C>T	c.661G>T	c.771 dup
Age at diagnosis	3 m	3.5 y	3.5 y	16 y	12 y	3 y	2.5 y	16 y	18 m	4 y	17 y	4 y
Ohahara syndrome	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Age at first seizure	1 day	4 weeks	3 weeks	5 months	2.5 months	8 days	15 days	13 years	2 months	10 days	2 months	2.5 months
Initial seizure	c	t + s	c	s	s + c	t + c	s	c	t	c	s	s + c
Refractory epilepsy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
West syndrome	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
Status epilepticus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polymorph partial seizure	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
Age at epilepsy spontaneous recovery	12 m	5 m	7 m	-	-	+(Nav)	-	+(15 y)	+(4 m)	+(5 m)	+(8 y)	-
Non epileptic movement	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Stereotypic movement	Nav	Nav	Nav	-	Nav	Nav	Nav	-	Nav	Nav	Nav	Nav
Dystonia	Nav	Nav	Nav	-	Nav	Nav	Nav	-	Nav	Nav	Nav	Nav
Deceleration of head growth	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Initial tone	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Normal	Nav	Low	Nav	Nav
Walk	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
Eye contact	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Language	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
Normal initial MRI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Progressive hypomyelination	NA	NA	NA	-	+	+	-	-	NA	-	-	-
Abnormal exam before epilepsy	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Ataxic gait	+	-	-	-	+	-	-	+	NA	+	+	+
Trembling	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
Fever sensitivity	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+, sign present; -, sign not present; EIEE, early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst; y, years; m, month; NA, not applicable; Nav, not available; c, clonic; t, tonic; s, spasms; m, myoclonic; MRI, magnetic resonance imaging.
^aPatient previously described.⁴

at home (Fig. 1). Two patients were already followed for a global developmental disorder when seizure occurred. One presented with epileptic spasms at 5 months, in the context of a severe developmental disorder. The second patient (patient 20) had ataxic gait and intellectual disability with seizure onset at 13 years (Table 1). Of interest, the molecular diagnosis was made “by chance” using array CGH analysis for this last patient.

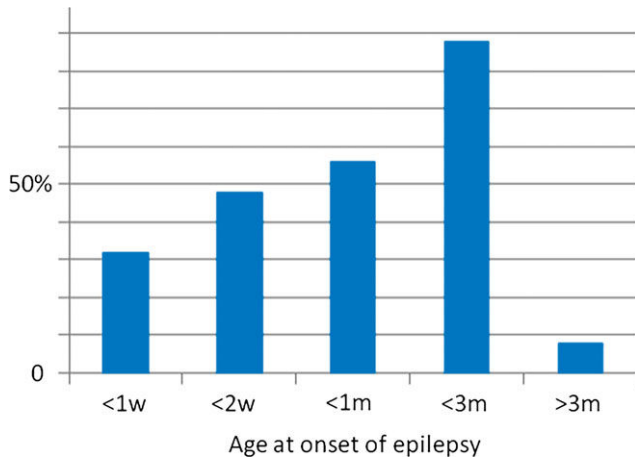


Figure 1. Cumulative distribution of mutated patients according to age of onset of epilepsy. *Epilepsia* © ILAE

The first seizures were motor seizures in all patients. They were bilateral tonic asymmetric in three cases, clonic in 10 cases (unilateral in eight cases), isolated spasms in 8 cases, and bilateral axial myoclonic in 3 cases. Seizures were considered as bilateral or multifocal in 15 cases and focal in 9 cases. The first seizures occurred in a stormy way, but did not require an admission in intensive care unit.

Sensitivity to fever was noticed in two patients after the age of 6 months. We did not observe a specific response to any antiepileptic drug: we did not find any consistent efficacy of one antiepileptic drug, or any consistent worsening.

Among the 22 of 24 patients with an onset of epilepsy before 3 months of age, the initial EEG showed a suppression-burst pattern in 11 patients (50%). Multifocal asynchronous spikes and slow waves without discontinuity were present in 6 of 22 (Fig. 2), and a hypsarrhythmic pattern was already seen from the first EEG in one at 2 months (patient 23). During the course of epilepsy, 10 of 22 patients presented West syndrome with epileptic spasms and hypsarrhythmia, and 3 of 22 patients had epileptic spasms without hypsarrhythmia. EEG normalized within the first year of life in 11 patients (including 5 patients with initial suppression-burst pattern). In the other cases, some focal spikes were observed. Surprisingly, the spikes were usually of high amplitude and resembled the so-called “functional” spikes usually seen in partial idiopathic epilepsies (see Fig. 1). Finally, three groups of patients could be delineated, based on the epileptic features within the first 2 years:

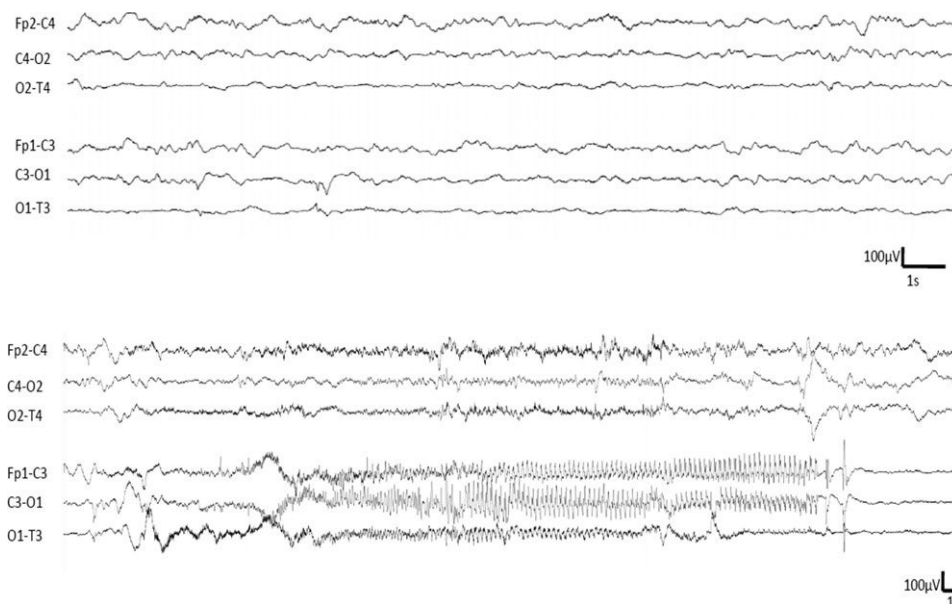


Figure 2. Representative interictal (Top) and ictal EEG of a patient from the group 3 (Table 1, patient 1, 1 month of age), longitudinal montage. Interictal EEG shows multifocal spikes on a globally well-organized EEG. Ictal EEG shows a focal seizure originating from the anterior part of the left hemisphere. During the seizure, the patient has tonic asymmetric posture with clonic jerks of the right arm and head deviation. Focal seizures originating from the right hemisphere were also recorded for this patient. *Epilepsia* © ILAE

Group 1: EIEE with a suppression-burst pattern on the EEG leading to the diagnosis of Ohtahara syndrome (n = 11), and improvement of all the parameters of epilepsy (seizure frequency and interictal EEG) within the first 2 years of life. Possible, but inconstant history of West syndrome during the course of epilepsy (n = 6 of 11).

Group 2: Early onset epilepsy with focal or multifocal features and none evolved to West syndrome during the follow-up period (n = 6).

Group 3: West syndrome with epileptic spasms and hypsarrhythmia, either after a period of focal/multifocal seizures, or other pattern (n = 5).

Among the two patients with an epilepsy beginning after 3 months, one patient was diagnosed “by chance” using array CGH to explore a case of intellectual disability with ataxic gait (patient 20). The second patient presented West syndrome as the first epileptic symptom in a context of initial psychomotor delay (patient 16).

Developmental features

At last evaluation, all patients had moderate to severe developmental delay. Patients with West syndrome underwent transient regression. Most patients had eye contact (92%) and used this communication way in preference: only four patients used a few words to communicate (16%). Seven patients (29%) were able to walk and five of them had an ataxic gait. For patient 20, this ataxic gait was the reason for medical consultation. Patients 17, 22, and 24 could not walk but had ataxic standing.

Other features

Head circumference was normal from birth to the end of the follow-up period for all patients (Fig. 3). Axial motor tone was often low (Table 1), but axial hypertonia had been reported in two cases. Spasticity was never found in these patients.

Nonepileptic movements were described in >54%: episodes of prolonged dystonic posture that could be mistaken for epileptic seizures were noticed in younger children; upper limb stereotypies, dyskinetic, and choreiform movements were also reported. Two thirds of cases older than 5 years of age had trembling posture of the head and trembling movements/prehension (n = 8). Trembling was the main nonepileptic movement disorder that was reported. Overall, nonepileptic movement disorders in older children became a major cause of concerns among parents, especially when epilepsy was controlled.

Brain MRI of patients carrying a mutation of *STXBPI*

Brain MRI was performed in all *STXBPI*-mutated cases a few weeks after epilepsy onset (except for patient 20, who had MRI before epilepsy onset). Brain MRI did not show any obvious brain structural abnormality; however, patient 5 had an abnormal shape of the cortex in the right parietal

area without any signal change. The brain MRI was repeated at least 1 year after in 17 cases. Results remained normal in 72%. We observed progressive hypomyelination in three cases: patients 3 and 17 presented a frontoparietal hypomyelination, patient 18 had U-fiber hypomyelination. For patients 2, 16, and 22, diffuse cerebral atrophy was observed on a novel brain MRI at 1-, 15-, and 4-years-old, respectively.

Relative frequency of *STXBPI* mutations according to the epileptic features

Among all the patients of our cohort that had a suppression-burst pattern on their first EEG (n = 44), 11 were mutated for *STXBPI* (25%). The respective proportion of cases carrying a mutation of *STXBPI* according to the epileptic syndrome was 25% in OS, 0% in early myoclonic epilepsy, 20% in nonspecific EOOE, and 4% in West syndrome as first epileptic symptoms (2/58). According to the age of onset, the rate of mutated patients was 11% in the group of early onset (before 3 months) and 3% in the group of later onset.

DISCUSSION

In this study, we described the major clinical features of *STXBPI*-related epileptic encephalopathy based on a large cohort of 284 patients. Twenty-two patients were carrying a mutation of *STXBPI*, and two patients were carrying a microdeletion that included *STXBPI*.

Our cohort does not reflect the relative proportion of each epileptic syndrome beginning within the first year of life, since the proportion of patients with an onset before 3 months is much higher than expected, and conversely the proportion of West syndrome is much lower. This is because our cohort was originally built to collect samples of patients with an early onset epileptic encephalopathy. We think that the respective rates of mutated patients are more relevant in the group of patients that began before 3 months than in the “older” group. Another study addressing specifically the question of the rate of mutated patients among epileptic syndrome beginning after 3 months of age would be useful to confirm that the mutation rate is much lower.

In our study, the initial EEG was abnormal in all patients. Suppression-burst and multifocal abnormalities were the most common patterns observed. When a suppression-burst was not found, EEG findings were still abnormal, showing multifocal paroxysmal abnormalities. This kind of abnormality is much less specific and was described in several other genetic EIEEs. However, these data allow distinguishing between *STXBPI*- and *CDKL5*-related epileptic encephalopathy, since in this later condition, interictal EEG is usually normal when the seizures begin.¹⁶

A major finding of our work is the head growth study: even with severe intellectual and motor disabilities, all

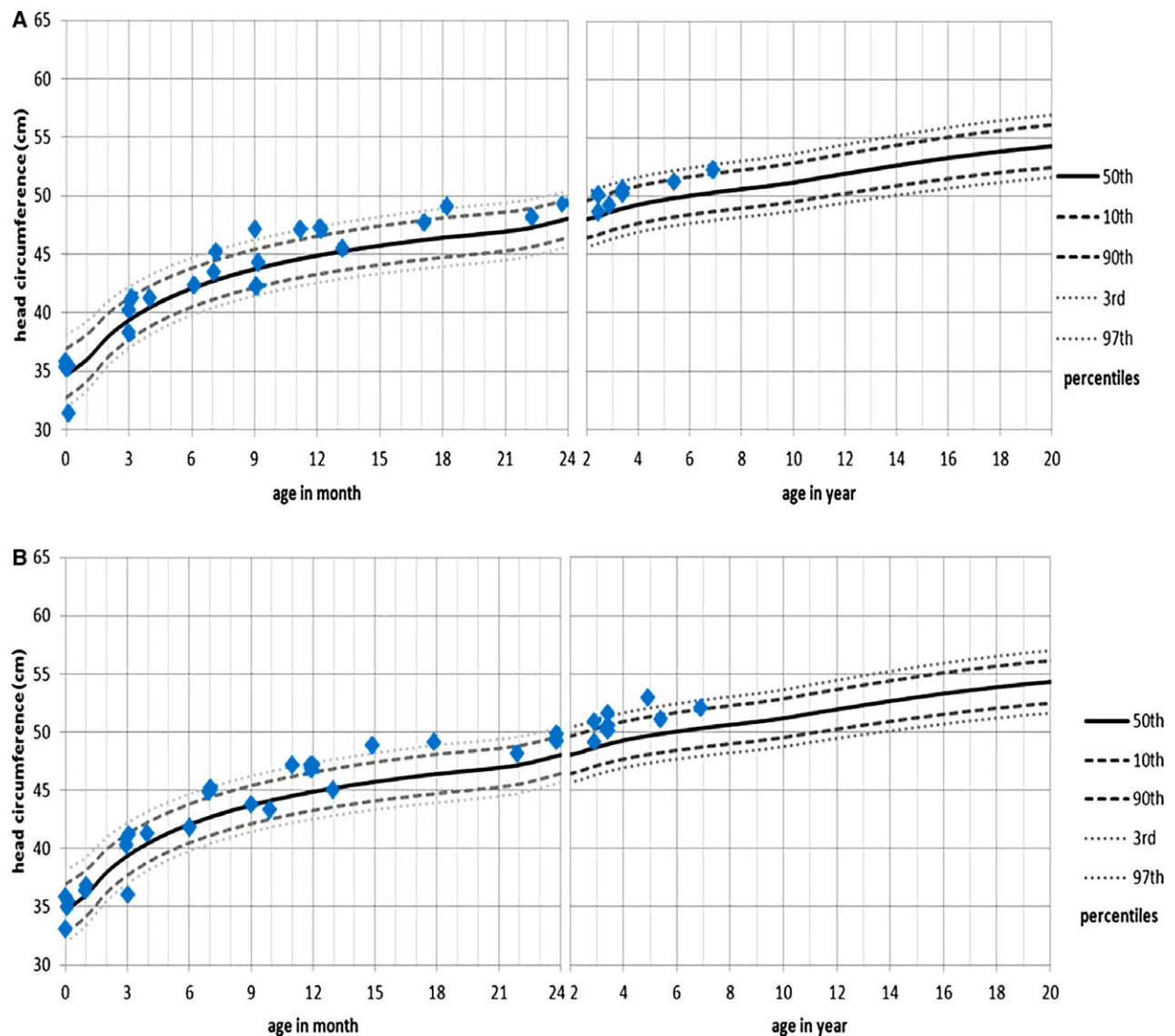


Figure 3.

Evolution of patient's head circumference based from United States Head Circumference Growth Reference Charts.²⁰ (A) Girls reference and (B) boys reference. Head circumference was normal for all patients.

Epilepsia © ILAE

patients had a normal head circumference from birth to the end of the follow-up. This parameter is easy to record, even for providers who are not epilepsy specialists. These data will allow the clinician not to indicate an *STXBPI* screening in cases of epileptic encephalopathy with microcephaly, or intellectual disability with acquired or prenatal microcephaly.

More than half of the patients had nonepileptic movements. The most frequent were stereotypies, focused on the upper limbs, as described previously.⁸ Patients with a mutation in *STXBPI* present severe developmental delay with limited autonomy in most cases. A small group of four patients seems to emerge, however: they display ambulatory

ability with walking and possible communication by oral language. There seems to be no obvious correlation between this less severe phenotype and the type of mutation in *STXBPI*.

We did not find any brain structural or signal abnormality on the initial MRI, consistent with previous data from Saitou et al.² Brain MRI performed later in the course of the disease found progressive diffuse hypomyelination in 3 of 24 cases, and cerebral atrophy in 3 of 24 cases. These last three patients were not more severe than the others; two of them were able to walk.

The prospective follow-up allowed us to describe movement disorders that progressively became the major

paroxysmal symptom in several patients: fluctuant and action-mediated trembling (reported in 11 of 24 cases), ataxic gait (reported in 9 of 24 cases), paroxysmal movements involving the face, neck, or extremities with stereotypical pattern (reported in 14 of 24 cases) often consistent with choreoballism as reported previously.^{8,9,17} These additional features helped us to make the diagnosis of *STXBPI*-related encephalopathy in at least one child with severe congenital ataxia, action-related tremor involving the head, normal head circumference, and normal brain MRI (patient 22).

More recently, de novo mutations of *KCNQ2* have been reported in EIEE5.¹⁸ The initial electroclinical presentation is similar to that of patients mutated in *STXBPI*, but seems to be more stereotyped: in our cohort, 16 patients carried a mutation of *KCNQ2*, and for 15 of them, epilepsy started within the first week of life in a stormy way with asymmetric tonic or clonic seizures and discontinuous EEG.¹⁹ This was the case for only 50% of patients mutated in *STXBPI*. Thus the *STXBPI*-related epileptic encephalopathy seems to be more heterogeneous than *KCNQ2*-related epileptic encephalopathy. Together, *STXBPI* and *KCNQ2* are mutated in more than half of patients with an Ohtahara Syndrome. On the other hand, an early onset epilepsy that is not associated with a discontinuous or suppression-burst pattern on the EEG, or that begins after the first week of life, is more probably in relation with a mutation in *STXBPI* than with one in *KCNQ2*.

We noticed a clear sensitivity to fever in three patients but none of them could be diagnosis as Dravet syndrome, since they had developmental delay and abnormal interictal EEG from the beginning of the epilepsy.

Patient 20 had a clearly different phenotype: intellectual disability, congenital ataxia, and some epileptic seizures from adolescence. Of interest, the exonic deletion of *STXBPI* has been identified “by chance,” using array CGH. Patient 20 is in fact the only patient in the cohort not specifically addressed for an analysis of *STXBPI*. It is therefore very likely that this study underestimates the frequency of such phenotypes because the patients of our cohort were primarily sent for severe, early onset epilepsy.

In conclusion, we have shown that *STXBPI* is mutated in approximately 10% of patient with an EOEE, and have found that they endure motor seizure, have an abnormal initial interictal EEG showing a suppression-burst pattern in half of the cases, an abnormal neurologic examination from the beginning of the disease, and a normal head circumference. Within the first year, half of them evolve to West syndrome. Subsequently, the epilepsy dramatically improves in the majority of cases, sometimes replaced by nonepileptic movements, and all of them have ongoing moderate to severe developmental delay with normal head growth. Altogether these features should lead the clinician to consider *STXBPI* molecular screening.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the patients' families and all the clinicians who sent DNA samples and clinical data on patients. We thank the Centre de Ressources Biologiques of La Timone Children's Hospital (Karine Bertaux, Cécile Mouradian, and Andrée Robaglia-Schlupp) for assistance with the samples used in this study. We thank Raphaëlle Lamy for technical assistance. This work was funded by “Programme Hospitalier de Recherche Clinique” (PHRC IR 2011). MM was partially funded by INSERM “Contrat interface” and LV by Contrat Hospitalier de Recherche Translationnelle.

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

- Saito H, Kato M, Mizuguchi T, et al. De novo mutations in the gene encoding *STXBPI* (*MUNC18-1*) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet* 2008;40:782–788.
- Saito H, Kato M, Okada I, et al. *STXBPI* mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern. *Epilepsia* 2010;51:2397–2405.
- Otsuka M, Oguni H, Liang J-S, et al. *STXBPI* mutations cause not only Ohtahara syndrome but also West syndrome – result of Japanese cohort study. *Epilepsia* 2010;51:2449–2452.
- Milh M, Villeneuve N, Chouchane M, et al. Epileptic and nonepileptic features in patients with early onset epileptic encephalopathy and *STXBPI* mutations. *Epilepsia* 2011;52:1828–1834.
- Weckhuysen S, Holmgren P, Hendrickx R, et al. Reduction of seizure frequency after epilepsy surgery in a patient with *STXBPI* encephalopathy and clinical description of six novel mutation carriers. *Epilepsia* 2013;54:e74–e80.
- Sampaio M, Rocha R, Biskup S, et al. Novel *STXBPI* mutations in 2 patients with early infantile epileptic encephalopathy. *J Child Neurol* 2015;30:622–624.
- Barcia G, Chemaly N, Gobin S, et al. Early epileptic encephalopathies associated with *STXBPI* mutations: could we better delineate the phenotype? *Eur J Med Genet* 2014;57:15–20.
- Kim YO, Korff CM, Villaluz MMG, et al. Head stereotypies in *STXBPI* encephalopathy. *Dev Med Child Neurol* 2013;55:769–772.
- Mignot C, Moutard M-L, Trouillard O, et al. *STXBPI*-related encephalopathy presenting as infantile spasms and generalized tremor in three patients. *Epilepsia* 2011;52:1820–1827.
- Deprez L, Weckhuysen S, Holmgren P, et al. Clinical spectrum of early-onset epileptic encephalopathies associated with *STXBPI* mutations. *Neurology* 2010;75:1159–1165.
- Romaniello R, Zucca C, Tenderini E, et al. A novel mutation in *STXBPI* gene in a child with epileptic encephalopathy and an atypical electroclinical pattern. *J Child Neurol* 2014;29:249–253.
- Barcia G, Barnerias C, Rio M, et al. A novel mutation in *STXBPI* causing epileptic encephalopathy (late onset infantile spasms) with partial respiratory chain complex IV deficiency. *Eur J Med Genet* 2013;56:683–685.
- Hamdan FF, Gauthier J, Dobrzyniecka S, et al. Intellectual disability without epilepsy associated with *STXBPI* disruption. *Eur J Hum Genet* 2011;19:607–609.
- Carvill GL, Weckhuysen S, McMahon JM, et al. *GABRA1* and *STXBPI*: novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology* 2014;82:1245–1253.
- Jette N, Beghi E, Hesdorffer D, et al. ICD coding for epilepsy: past, present, and future—a report by the International League Against Epilepsy Task Force on ICD codes in epilepsy. *Epilepsia* 2015;56:348–355.
- Bahi-Buisson N, Kaminska A, Boddaert N, et al. The three stages of epilepsy in patients with *CDKL5* mutations. *Epilepsia* 2008;49:1027–1037.

17. Kanazawa K, Kumada S, Kato M, et al. Choreo-ballistic movements in a case carrying a missense mutation in syntaxin binding protein 1 gene. *Mov Disord* 2010;25:2265–2267.
18. Weckhuysen S, Mandelstam S, Suls A, et al. KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* 2012;71:15–25.
19. Milh M, Boutry-Kryza N, Sutera-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.
20. Rollins JD, Collins JS, Holden KR. United States head circumference growth reference charts: birth to 21 years. *J Pediatr* 2010;156:907–913, 913.e1–2.

SUPPORTING INFORMATION

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

Table S1. *STXBPI* mutations in the 24 patients with predicted pathogenicity of the mutation according to SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster, UMD predictor, or HSF

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nucleotide mutation	c.15delC	c.1439C>T	Na	c.795-2A>G	c.1461+5G>A	c.1720A>C	c.902+1G>A	c.308A>C	c.1162C>T	c.734A>C	c.1093_1094 delCT	c.1630G>C
Protein mutation	p.Leu6Serfs*13	p.Pro480Leu		Intron 9	Intron16	p.Thr574Pro	Intron 10	p.His103Pro	p.Arg388*	p.His245Pro	p.Cys366Profs*13	p.Gly544Arg
Mutation Taster	Disease Causing score=1	Disease Causing score=0,99		Disease Causing score=1	Disease Causing score=1	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=1	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=1	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=1	Disease Causing score=0,99
SIFT	/	Damaging score=0		/	/	Damaging score=0	/	Damaging score=0	/	Damaging score=0	/	Damaging score=0
PolyPhen-2	/	Probably Damaging score=1		/	/	Probably Damaging score=1	/	Probably Damaging score=1	/	Probably Damaging score=1	/	Probably Damaging score=1
JMD Predictor	/	Pathogenic score=90		/	/	Pathogenic score=90	/	Pathogenic score=93	Pathogenic score=100	Pathogenic score=96	/	Pathogenic score=99
Human Splice Finder				Broken WT Acceptor Site	Broken WT Donor Site		Broken WT Donor Site					
dbSNP	No	No		No	No	No	No	No	No	No	No	No
ExacBrowser	No	No		No	No	No	No	No	No	No	No	No

Supplementary table 1 (part 1)

Patient	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Nucleotide mutation	c.548T>G	c.1060T>C	c.1060T>C	c.568C>T	c.1217G>A	c.83G>A	c.1651C>T	Na	c.325+4A>G	c.1439C>T	c.661G>T	c.771dup
Mutation Protein	p.Leu183Arg	p.Cys354Arg	p.Cys354Arg	p.Arg190Trp	p.Arg406His	p.Trp28*	p.Arg551Cys		Intron 5	p.Pro480Leu	p.Glu221*	p.Pro258Alafs*5
Mutation Taster	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=1	Disease Causing score=0,99		Disease Causing score=1	Disease Causing score=0,99	Disease Causing score=1	Disease Causing score=1
SIFT	Damaging score=0	Damaging score=0	Damaging score=0	Damaging score=0	Damaging score=0	/	Damaging score=0		/	Damaging score=0	/	/
PolyPhen-2	Probably Damaging score=1	Probably Damaging score=1	Probably Damaging score=1	Probably Damaging score=1	Probably Damaging score=1	/	Probably Damaging score=1		/	Probably Damaging score=1	/	/
UMD Predictor	Pathogenic score=99	Pathogenic score=96	Pathogenic score=96	Pathogenic score=100	Pathogenic score=81	Pathogenic score=100	Pathogenic score=99		/	Pathogenic score=90	Pathogenic score=100	/
Human Splice Finder									Broken WT Donor Site - New Donor Site			
dbSNP	No	No	No	No	No	No	No		No	No	No	No
ExacBrowser	No	No	No	No	No	No	No		No	No	No	No

Supplementary table 1 (part 2)

Supplementary table 1 : *STXBPI* mutations in the 24 patients with predicted pathogenicity of the mutation according to SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster, UMD Predictor or HSF. The mutations are absent from dbSNP and Exac.