



Thèse

2008

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

**Caractérisation de nouveaux variants génétiques dans les convulsions
fébriles et syndromes associés**

Salzmann, Annick

How to cite

SALZMANN, Annick. Caractérisation de nouveaux variants génétiques dans les convulsions fébriles et syndromes associés. Doctoral Thesis, 2008. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:720

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:720>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:720](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:720)



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

FACULTE DES SCIENCES



DOCTORAT EN NEUROSCIENCES
des Universités de Genève
et de Lausanne



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

Unil

UNIL | Université de Lausanne

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Professeur Alain Malafosse, directeur de thèse

TITRE DE LA THESE

**CARACTERISATION DE NOUVEAUX VARIANTS GENETIQUES DANS
LES CONVULSIONS FEBRILES ET SYNDROMES ASSOCIES**

THESE

Présentée à la
Faculté des Sciences

de l'Université de Genève

pour obtenir le grade de
Docteur en Neurosciences

par

Annick SALZMANN

de Signau (BE)

Thèse N° 29

Genève

Hôpitaux Universitaires de Genève

2008



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

FACULTÉ DES SCIENCES

**DOCTORAT EN NEUROSCIENCES
des Universités de Genève et de Lausanne**

Thèse de : Annick SALZMANN

Intitulée : *Caractérisation de nouveaux variants génétiques dans les convulsions fébriles et syndrômes associés*

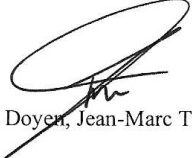
Soutenue le : **24 octobre 2008**

*La Faculté des sciences, sur préavis du jury de thèse formé par :

Professeur A. Malafosse, Département de psychiatrie, Faculté de médecine,
Université de Genève, directeur
Professeure M. Seeck, Département de neurosciences clinique et dermatologie,
Faculté de médecine, Université de Genève
Professeur F. Rivier, Hôpital Gui de Chauliac, Service de neuropédiatrie,
Montpellier, France

autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 24 octobre 2008


Le Doyen, Jean-Marc TRISCONE

Thèse No - 29 -

N.B. La thèse imprimée doit porter la déclaration précédente * et remplir les conditions énumérées dans les « Informations aux étudiants relatives aux thèses de doctorat à l'Université de Genève ».

Publications :

Salzmann A, Moulard B, Crespel A, Baldy-Moulinier M, Buresi C, Malafosse A. GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, **46**(6): 931-933, 2005

Salzmann A, Perroud N, Crespel A, Lambercy C, Malafosse A. Candidate genes for temporal lobe epilepsy: a replication study. *Neurol Sci*, Online FirstTM, Dec 6, 2008

Mes remerciements vont...

Au Professeur Alain Malafosse qui m'a accueilli au sein de son équipe pour le diplôme de biologie et m'a permis de poursuivre mon projet passionnant en me proposant de rester pour le doctorat. Au fil des années, il m'a transmis, non seulement sa profonde connaissance scientifique, mais également sa passion pour la recherche. Je lui adresse ma vive reconnaissance pour les encouragements, qu'il m'a prodigués tout au long de ma thèse.

Au Docteur Michel Guipponi pour son aide si précieuse, tant au niveau scientifique qu'au niveau technique. Il a apporté du dynamisme à mon travail et je l'en remercie énormément. Je tiens aussi à souligner son soutien et le suivi qu'il a apporté à mon travail ainsi que sa grande disponibilité et ses conseils toujours avisés, car il est une source intarissable d'idées.

A Carmen Lambercy, laborantine extraordinaire, avec qui j'ai formé un réel binôme, ce qui m'a permis de mener à bien certaines expériences. Je la remercie du fond du cœur pour sa collaboration, son travail, tous les petits conseils pratiques qu'elle m'a donnés, mais surtout pour m'avoir éclairée dans mes moments de doutes et de difficultés. Merci pour ta confiance et ton amitié que tu m'as apporté.

Au Professeur Margitta Seeck et Professeur François Rivier d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

A Nader Perroud pour son appui important dans la partie statistique de ce travail. Merci pour ton dynamisme, ton enthousiasme et ta rapidité d'action, ainsi que pour l'amitié que tu as toujours su me témoigner, les longues discussions qui m'ont tant apporté et les grands moments de fous rires partagés.

Au Docteur Pierre Szepetowski et au Docteur Sarah Jamali pour leur collaboration dans le projet de *validation de gènes mis en évidence par microarray dans les épilepsies mésiales du lobe temporal*. Grâce à eux, j'ai pu mener à bien cette partie du travail.

Au Docteur Félicien Karege pour avoir accepté d'être membre de mon jury d'examen oral de thèse, ce qui m'a donné le droit de passer ma soutenance ma thèse. Un énorme merci aussi pour la position postdoctorale que tu m'offres après le doctorat. Grâce à toi, je vais pouvoir continuer à travailler dans un domaine qui me passionne. Je me réjouis de notre future collaboration.

A l'équipe de la plateforme génomique du NCCR *Frontiers in Genetics* (CMU), et en particulier au Docteur Patrick Descombes, Docteur Didier Chollet et Docteur Mylène Docquier pour leur aide dans la réalisation de l'expérience effectuée avec des puces à ADN *Affymetrix GeneChip Mapping 500K array NspI chip*[®].

A Elisabeth Neidhart pour toutes les expériences réalisées avec le pyrosequencing. Et même si tu n'es pas dans les mêmes locaux, tu fais partie de l'équipe, alors merci !

A Terese Laforge pour la partie extraction d'ARN et RT-PCR. Merci pour tes connaissances techniques de pointe.

A Dominique Mouthon pour le tri primaire des données du *genome wide* avec *Access* qui n'aurait pas pu se faire à la main. Alors, merci !

A Laura Ortolan-Trigui pour les extractions d'ADN.

A l'ensemble des membres de l'unité de génétique psychiatrique, les plus anciens, tout comme les petits nouveaux, ainsi que d'autres collaborateurs de Belle-Ideé : Monique Vessaz, Eladia Croisier-Ballmann, François LeGal, Raffael Fernandez et Patrick Baud.

A tous ceux qui ont croisé ma route au cours de mon doctorat à Belle-Ideé. En tout premier lieu, Brice Petit avec qui ce fut un véritable plaisir de travailler et de partager les pauses, Karine Kohler et Michael Talmor deux supers diplômés ainsi que les petits nouveaux qui les ont remplacés : Nicolas Delescluse et Roland Hasler, merci à vous deux pour les fous rires lors des repas de midi. Au plaisir de vous revoir au détour d'une paille...

A Samia Layouni et Nejla Belhedi qui sont venues réaliser une partie de leur projet de thèse au laboratoire. Merci d'avoir apporté un peu de soleil tunisien dans vos bagages !

Au Docteur Catherine Buresi pour m'avoir enseigné la base des techniques de biologie moléculaire.

A l'école doctorale de Neurosciences lémaniques pour avoir approuvé mon projet et m'avoir accepté en tant que candidate au doctorat.

Au Docteur Maria Inés Velazco (Senior Vice President, corporate R&D, *Firmenich*) pour ses précieux conseils personnels et professionnels.

Au Docteur Roger Snowden (Vice President, Synthesis corporate R&D, *Firmenich*) pour avoir toujours gentiment accepté de corriger l'anglais de mes publications.

A tous mes collègues de chez *Firmenich* et en particulier Corinne, Anne-So, Rosella, Catherine, Florence et Marylin : la dream team du secrétariat qui m'a choyée pendant toutes ces années. Merci les filles ! Je ne vous oublierai jamais ! Un grand merci en particulier à Corinne qui m'a appris à utiliser l'entourage *Microsoft*. Sans elle, je serai toujours aussi perdue avec cette technologie ! Merci aussi à Daniel et Riccardo d'avoir égayé les pauses-café ! Et encore merci Grég pour être toujours venu à mon secours quand mon pc plantait !

A mes deux amies de toujours, Annick et Laurence, qui malgré les distances qui nous ont parfois séparées, ont su être là au bon moment et quand il le fallait. A tous nos petits secrets et nos fous-rires. Merci de n'avoir jamais porté aucun jugement et de m'avoir comprise : c'est ça les vraies amies !

A mes amies du cycle et du collège avec qui j'ai passé des moments formidables : Virginie & Virginie, Claudia, Danielle et Marcela. Bien que les années aient passé, merci d'être toujours là ! En espérant que l'on partage encore des milliers d'instant ensemble !

A Melody pour être ma partenaire au tennis, au ski, mais surtout lors des cours de modern' jazz. Merci pour tous ces moments de détente partagés ! Merci aussi à Laurence pour m'avoir accompagnée à l'aérobic.

A ma maman et mon papa qui m'ont permis d'aller au bout de mes rêves et de les réaliser, car ils ont toujours cru en moi. Je serai éternellement reconnaissante de tout ce que vous avez toujours fait pour moi. Je n'ai qu'une chose à vous dire : je vous aime.

A toute ma famille et en particulier Michèle, ma « deuxième » maman.

A Damien pour son soutien inconditionnel. Merci de me supporter au quotidien, et surtout pendant les moments difficiles. Merci d'être toujours là pour moi. Sans toi, je ne sais pas si j'en serais là aujourd'hui. Je te dois énormément, pour toutes ces petites choses tu m'apportes au jour le jour. Tu es ma bouffée d'oxygène. Je t'aime.

Et finalement je dédie ce travail à ma grand-maman qui nous a quittés pour un monde meilleur...

Table des matières

Résumé	13
Abréviations.....	15
Introduction	19
1 La génétique des épilepsies	20
1.1 Généralités.....	20
1.2 La classification des crises épileptiques	23
1.2.1 <i>Les crises généralisées</i>	24
1.2.2 <i>Les crises partielles</i>	25
1.3 La physiopathologie des crises épileptiques	27
1.3.1 <i>Le fonctionnement neuronal normal</i>	27
1.3.2 <i>Le phénomène épileptique</i>	29
1.3.3 <i>Facteurs de l'épileptogénèse primaire</i>	31
1.3.4 <i>L'épileptogénèse secondaire</i>	34
1.4 La classification internationale des épilepsies et des syndromes épileptiques.....	35
1.5 Les bases génétiques de l'épilepsie	38
1.5.1 <i>Etudes familiales</i>	38
1.5.2 <i>Etudes de jumeaux</i>	41
1.5.3 <i>Maladies à hérédité mendélienne associées à une épilepsie</i>	44
1.5.4 <i>Anomalies chromosomiques</i>	45
1.5.5 <i>Modèles animaux avec symptômes épileptiques spontanés</i>	47
1.6 Les avancées en génétique des épilepsies.....	48
1.6.1 <i>Les épilepsies à hérédité mendélienne ou monogéniques simples</i>	48
1.6.2 <i>Les épilepsies à hérédité complexe ou polygéniques</i>	52
1.7 La génétique des épilepsies	54

1.7.1	<i>Les épilepsies généralisées idiopathiques (EGI)</i>	54
1.7.2	<i>Les épilepsies généralisées avec convulsions fébriles plus (Generalized epilepsy with febrile seizures plus – GEFS⁺)</i>	58
1.7.3	<i>Epilepsie myoclonique sévère du nourrisson</i>	72
1.7.4	<i>Les convulsions fébriles (CF)</i>	75
1.7.5	<i>L'épilepsie du lobe temporal (ETL)</i>	88
1.8	Stratégies de génétique moléculaire utilisées dans l'analyse des épilepsies	94
1.8.1	<i>Stratégies biologiques</i>	94
1.8.2	<i>Stratégies statistiques</i>	95
1.9	Conclusion introductive.....	103
Exposé des travaux		105
2	Etudes d'associations	106
2.1	GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) and temporal lobe epilepsy (Salzmann et al. 2005) .	106
2.1.1	<i>Discussion complémentaire</i>	110
2.2	Candidate Genes for Temporal Lobe Epilepsy: a Replication Study (Salzmann et al. 2008)	112
2.2.1	<i>Discussion complémentaire</i>	120
2.3	Validation de gènes mis en évidence dans les ELT mésiales par microarray.....	121
2.3.1	<i>Etudes transcriptionnelles des gènes par microarray</i>	121
2.3.2	<i>Matériel et Méthodes</i>	122
2.3.3	<i>Résultats</i>	124
2.3.4	<i>Discussion</i>	139
3	Etude de liaison génétique : analyse génétique d'une famille marocaine consanguine avec le syndrome <i>Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus (GEFS⁺)</i>	142
3.1	Introduction	142
3.2	Matériel & Méthodes.....	144
3.2.1	<i>Analyse de la famille</i>	144
3.2.2	<i>Extraction d'ADN</i>	145
3.2.3	<i>Analyse des loci candidats FEB et GEFS⁺</i>	145
3.2.4	<i>Analyse de liaison pangénomique</i>	146

3.2.5	<i>Analyse du nombre de copies d'ADN.....</i>	147
3.2.6	<i>Séquençage des gènes candidats de la région d'intérêt.....</i>	148
3.2.7	<i>Analyse de deux mutations dans le promoteur du gène CRH.....</i>	148
3.2.8	<i>Analyse des mutations CPA6 (C1025T) Ala270Val et C8orf45 (A290G) Tyr70Cys par pyroséquençage.....</i>	148
3.2.9	<i>CPA6 et C8orf45 séquencés dans la famille FEB1 (Wallace et al. 1996).....</i>	149
3.2.10	<i>Analyse de l'expression des gènes CPA6 et C8orf45 par RT-PCR.....</i>	149
3.2.11	<i>Analyse comparative des séquences protéiques de CPA6 et C8orf45</i>	149
3.2.12	<i>Analyse de la structure protéique de CPA6 et C8orf45.....</i>	149
3.3	Résultats	150
3.3.1	<i>Cartographie primaire d'exclusion des loci candidats FEB et GEFS⁺.....</i>	150
3.3.2	<i>Etude de liaison génome entier</i>	160
3.3.3	<i>Nombre de copies d'ADN.....</i>	164
3.3.4	<i>Gènes candidats de la région d'intérêt</i>	164
3.3.5	<i>Mutations dans le promoteur du gène CRH.....</i>	172
3.3.6	<i>Génotypage des mutations CPA6 (C1025T) Ala270Val et C8orf45 (A290G) Tyr70Cys par pyroséquençage.....</i>	173
3.3.7	<i>Séquençage de CPA6 et C8orf45 dans la famille FEB1</i>	175
3.3.8	<i>Expression de CPA6 et C8orf45 par RT-PCR.....</i>	175
3.3.9	<i>Analyse comparative des séquences protéiques de CPA6 & C8orf45.....</i>	175
3.3.10	<i>Structure protéique de CPA6 & C8orf45.....</i>	177
3.4	Discussion	178
4	Nouvelle méthode de recherche de mutation-expansion pour le diagnostique médical de la maladie d'Unverricht-Lundborg	184
4.1	Introduction	184
4.2	Southern blot et PCR radioactive	184
4.3	Déamination de l'ADN et PCR directe	187
4.4	Matériel et méthode.....	188
4.4.1	<i>Amorces PCR.....</i>	189
4.4.2	<i>Déamination de l'ADN – Kit EpiTect Bisulfite (Qiagen).....</i>	189
4.4.3	<i>Amplification par PCR.....</i>	190

4.5	Résultats	191
4.6	Discussion	192
	Conclusion et perspectives	193
	Références	197

Résumé

L'objet de ce travail de thèse a été d'étudier la génétique des épilepsies au travers de la caractérisation de nouveaux variants génétiques dans les convulsions fébriles (CF) et syndromes associés. Pour cela, deux stratégies ont été utilisées : les études d'associations pour les syndromes épileptiques avec une hérédité complexe et une étude de liaison génétique pour une épilepsie familiale à hérédité mendélienne. Les études d'associations – méthode de choix pour étudier la génétique des épilepsies communes, telles que les CF et les épilepsies du lobe temporal (ELT) – ont été réalisées dans trois populations caucasiennes : une cohorte de patients avec ELT avec ou sans antécédents de CF, une cohorte de patients avec CF et une cohorte d'individus contrôle. L'étude de liaison génétique a été réalisée dans une famille consanguine d'origine marocaine avec un mode de transmission de la maladie de type mendélien. Le spectre phénotypique de cette famille est de type *épilepsie généralisée avec convulsions fébriles plus*, autrement appelé syndrome GEFS⁺.

Dans un premier temps, pour les épilepsies communes à hérédité complexe, des études de réplication ont été réalisées dans la cohorte de patients ELT, afin de confirmer la contribution génétique de gènes candidats aux ELT déjà publiés : *GABA(B[1])*, *Apo E*, *IL-1 α* , *IL-1RA*, *IL-1 β* et *PDYN*. Les résultats ont montré des associations négatives pour *GABA(B[1])*, *PDYN* et *IL-1 β* ; une réplication pour *Apo E* et enfin de nouvelles associations significatives pour *IL-1 α* et *IL-1RA*. Dans un deuxième temps, en collaboration avec Dr. P. Szepetowski (INSERM, Marseille, France), nous avons testé des gènes retrouvés sur- et sous-exprimés dans des morceaux de cortex entorhinal de patients souffrant d'ELT (Jamali et al. 2006) : *C3*, *CD74*, *NPY1R*, et *HTR2A*. Des associations non-significatives ont été trouvées pour les gènes *CD74* et *HTR2A*. Une association significative a été mise en évidence entre un sous-groupe de patients ELT avec antécédents de CF et un haplotype particulier du gène *C3*. Parce que le phénotype particulier ELT présentait des antécédents de CF, alors une seconde étude cas-témoins a été réalisée dans la cohorte de patients avec CF. Il a été montré une association positive avec un haplotype particulier. De plus, une association significative a été trouvée pour un SNP particulier et *NPY1R*.

L'étude de liaison génétique pour une épilepsie familiale à hérédité mendélienne a été réalisée dans la famille GEFS⁺, citée ci-dessus, consanguine et transmission autosomale récessive de la maladie. Sur la base de l'hypothèse que tous les atteints devraient posséder une région

homozygote et identique par descendance liée à la maladie, une cartographie d'exclusion a été réalisée afin d'exclure les loci GEFS⁺ et FEB rapportés par la littérature, ainsi que les gènes qui y sont liés – *SCN1B*, *SCN1A*, *GABRG2*, *MASS1* et *IMPA2* – en utilisant des microsatellites intragéniques ou flanquant la région candidate. Tous ces loci ont été exclus. La seconde étape a été de réaliser une étude pangénomique grâce aux puces à ADN *Affymetrix* de type *GeneChip*[®] *Human Mapping 250K Nsp*. Avec les résultats du génotypage des individus de la famille, une analyse paramétrique avec un modèle récessif a été réalisée par le programme *Merlin*. Deux régions candidates ont été révélées : une sur le chromosome 8q12-13 et une autre sur le chromosome 21q22. En reconstruisant les haplotypes grâce à *Merlin* et en les visualisant avec le programme *AutoSNPa*, qui reconnaît les régions identiques par descendance, la région sur le chromosome 21q22 a été exclue et la région sur le chromosome 8q12-13 a été confirmée. En parallèle, nous avons testé la variation du nombre de copies d'ADN grâce aux puces *Agilent* 244K. Cette analyse n'a montré aucun changement structurel au niveau du génome entier, mais aussi au niveau de la région candidate de 9 Mb sur le chromosome 8q12-13, qui contient 38 gènes et gènes présumés, mais aucun gène codant pour un canal ionique. Tous ces gènes ont été séquencés et deux mutations faux-sens, potentiellement pathogéniques, ont été trouvées dans deux gènes différents : *C8orf45* (Tyr40Cys) et *CPA6* (Ala270Val). Ces deux mutations n'ont pas été retrouvées dans les cohortes de patients CF et les contrôles. Mais un même individu, issu d'une cohorte de contrôles maghrébins, a été retrouvé hétérozygote pour les deux mutations, suggérant ainsi qu'elles seraient peut-être en déséquilibre de liaison.

En conclusion, nous avons mis en évidence l'existence d'un nouveau locus ainsi que l'identification de deux nouveaux gènes candidats potentiellement lié aux GEFS⁺. De plus, nous avons mis en évidence des gènes de susceptibilité associés aux épilepsies communes que sont les ELT et les CF.

Abréviations

<i>5-HTT</i>	Transporteur de la sérotonine
<i>aa</i>	Acide aminé
<i>ABCB1</i>	P-glycoprotéine (ATP-binding cassette sub-family B member 1)
<i>Ach</i>	Acétylcholine
<i>ACTH</i>	Hormone adrénocorticotropique
<i>ADN</i>	Acide désoxyribonucléique
<i>AP-1</i>	DNA binding/transcription factor
<i>AP-2</i>	Transcription factor
<i>ApoE</i>	Apolipoprotéine
<i>BDNF</i>	Brain-derived neurotrophic factor
<i>BET</i>	Ethidium bromide
<i>BRCA-1 & -2</i>	Breast cancer gene 1 & 2
<i>BRD2(RING3)</i>	Bromodomain-containing protein 2 (Protein RING3)
<i>C3</i>	Composant C3 du système du complément
<i>C8orf45</i>	C8 open reading frame 45
Ca^{2+}	Calcium
<i>CACNA1H</i>	Sous-unité $\alpha 1H$ du récepteur calcique de type T voltage-dépendant
<i>CACNG3</i>	Sous-unité $\gamma 3$ du récepteur calcique voltage-dépendant
<i>CD74</i>	Major histocompatibility complex, class II invariant chain
<i>CD99</i>	Antigène de surface
<i>CF</i>	Convulsions fébriles
<i>CHRNA2</i>	Sous-unité $\alpha 2$ du récepteur nicotinique cholinergique
<i>CHRNA3</i>	Sous-unité $\alpha 3$ du récepteur nicotinique cholinergique
<i>CHRNA4</i>	Sous-unité $\alpha 4$ du récepteur nicotinique cholinergique
<i>CHRNA5</i>	Sous-unité $\alpha 5$ du récepteur nicotinique cholinergique
<i>CHRNA7</i>	Sous-unité $\alpha 7$ du récepteur nicotinique cholinergique
<i>CHRNB2</i>	Sous-unité $\beta 2$ du récepteur nicotinique cholinergique
<i>CHRNB4</i>	Sous-unité $\beta 4$ du récepteur nicotinique cholinergique
<i>CIE</i>	Classification Internationale des Epilepsies
<i>CIESE</i>	Classification Internationale des Epilepsies et Syndromes Epileptiques
<i>Cl⁻</i>	Chlorure
<i>CLCN2</i>	Canal chlore de type 2
<i>CLN1</i>	Palmitoyl-protein thioesterase 1
<i>CLN2</i>	Tripeptidyl peptidase I

<i>CLN3</i>	Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 3
<i>CLN5</i>	Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 5
<i>CKI</i>	Casein kinases I
<i>cM</i>	centiMorgan
<i>CNFB</i>	Convulsions néonatales familiales bénignes
<i>CPA6</i>	Carboxypeptidase A6
<i>CSBK1G2</i>	Isoforme casein kinase I gamma 2
<i>CNV</i>	<i>copy-number variations</i> ou nombre de copies d'ADN
<i>CRH</i>	Corticotropin releasing hormone
<i>CSTB</i>	Cystatine B
<i>del</i>	deletion
<i>DL</i>	Déséquilibre de liaison
<i>DMSO</i>	Diméthyle sulfoxyde
<i>EAE</i>	Epilepsie absence de l'enfant
<i>EEG</i>	Electroencéphalogramme
<i>EFHC1</i>	EF-hand domain (C-terminal) containing 1
<i>EFNAD</i>	Epilepsie frontale nocturne autosomique dominante
<i>EGI</i>	Epilepsies généralisées idiopathiques
<i>ELT</i>	Epilepsies du lobe temporal
<i>ELT-HS⁺</i>	ELT avec sclérose hippocampique
<i>ELT-HS⁻</i>	ELT sans sclérose hippocampique
<i>ELT-CF⁻</i>	ELT sans antécédents de convulsions fébriles
<i>EMA</i>	Epilepsie myoclonique-astatique
<i>EMJ</i>	Epilepsie myoclonique juvénile
<i>EMP</i>	Epilepsies myocloniques progressives
<i>EPM1</i>	Locus pour l'épilepsie myoclonique de type 1 ou maladie d'Unverricht-Lundborg
<i>EPM2A</i>	Laforine (enzyme tyrosine phosphatase)
<i>FEB</i>	Loci for familial febrile convulsions
<i>FHL2</i>	Four and a half LIM domains 2
<i>FISH</i>	Hybridation <i>in situ</i> par fluorescence
<i>FMR-1</i>	Fragile X mental retardation 1 protein
<i>FS⁺</i>	Febrile Seizure Plus
<i>GABA</i>	Acide γ -aminobutyrique
<i>GABRA1</i>	Sous-unité α 1 du récepteur GABA(A)
<i>GABRA5</i>	Sous-unité α 5 du récepteur GABA(A)
<i>GABRB3</i>	Sous-unité β 3 du récepteur GABA(B)
<i>GABRD</i>	Sous-unité δ du récepteur GABA(A)
<i>GABRG2</i>	Sous-unité γ 2 du récepteur GABA(A)
<i>GABRG3</i>	Sous-unité γ 3 du récepteur GABA(A)
<i>GAD1</i>	Glutamate decarboxylase 1

<i>GEFS⁺</i>	Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus
<i>HLA</i>	Major histocompatibility complex
<i>HTR2A</i>	Récepteur à la sérotonine de type 2
<i>IL-1</i>	Interleukine-1
<i>IL-1α</i>	Interleukine-1 α
<i>IL-1β</i>	Interleukine-1 β
<i>IL-1RA</i>	Interleukine-1RA
<i>IL-4</i>	Interleukine-4
<i>ILAE</i>	International League Against Epilepsy
<i>IMPA2</i>	Monophosphatase (IMPase) myo-inositol 2
<i>IRM</i>	Imagerie par Résonance Magnétique
<i>K⁺</i>	Potassium
<i>KCND2</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily D member 2
<i>KCNQ2</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 2
<i>KCNQ3</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 3
<i>LCR</i>	Liquide céphalo-rachidien
<i>LGII</i>	Leucine rich, glioma inactivated 1
<i>MAQ</i>	Multiplex Amplicon Quantification
<i>MASS1</i>	Monogenic audiogenic seizure-susceptibility
<i>Mb</i>	Megabase (= 10 ⁶ pb)
<i>MERRF</i>	Encéphalomyopathie mitochondriale avec « ragged-red-fibres »
<i>Na⁺</i>	Sodium
<i>NF-1</i>	Neurofibromatose de type 1
<i>NPY1R</i>	Récepteur de type 1 du neuropeptide Y
<i>OMS</i>	Organisation Mondiale de la Santé
<i>PA</i>	Potentiel d'action
<i>pb</i>	paires de bases d'ADN
<i>PCR</i>	Polymerase chain reaction
<i>PDS</i>	Paroxysmal depolarisation shift
<i>PDYN</i>	Prodynorphine
<i>PPSE</i>	Potentiel postsynaptique excitateur
<i>PRNP</i>	Protéine prion (sialoglycoprotéine membranaire copper-liée)
<i>SEZ-6</i>	Seizure-related 6
<i>SLI</i>	Stimulation lumineuse intermittente
<i>SNC</i>	Système nerveux central
<i>Rats GAERS</i>	Genetic absence epilepsy rats from Strasbourg
<i>RFLP</i>	Restriction fragment length polymorphisms
<i>SCN1A</i>	Sous-unité $\alpha 1$ du canal sodique voltage-dépendant
<i>SCN2A</i>	Sous-unité $\alpha 2$ du canal sodique voltage-dépendant
<i>SCN3A</i>	Sous-unité $\alpha 3$ du canal sodique voltage-dépendant

<i>SCN1B</i>	Sous-unité β 1 du canal sodique voltage-dépendant
<i>SE</i>	Status epilepticus
<i>SMEB</i>	Bordeline SMEI
<i>SMEI</i>	Severe myoclonic epilepsy of infancy
<i>SNP</i>	Single nucleotide polymorphism
<i>SSCP</i>	Single strand conformation polymorphism
<i>UBE3A</i>	Ubiquitine-protéine ligase E6-AP
<i>ULD</i>	Unverricht-Lundborg disease
<i>VNTR</i>	Variable number of tandem repeats

Introduction

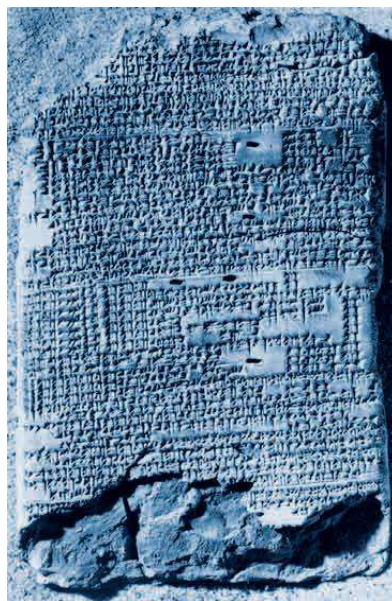
1 La génétique des épilepsies

1.1 Généralités

L'épilepsie est une affection neurologique universelle parmi les plus anciennes de l'humanité. Le terme *épilepsie* désigne une maladie chronique d'origine cérébrale qui se manifeste par la répétition de crises (Badly-Moulinier 1997). Selon les chiffres de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), près de 50 millions de personnes souffrent d'épilepsie à travers le monde (OMS 2001). Ce désordre neurologique ne possède ni frontière ethnique, géographique, ou encore sociale. De plus, il touche aussi bien les hommes que les femmes de tous âges.

Pendant des siècles, l'épilepsie fut entourée de mystères et de mythes. Ainsi, les épileptiques étaient mis au ban de la société parce qu'ils suscitaient la crainte, la suspicion et l'incompréhension. Les premiers concepts fondamentaux concernant l'épilepsie auraient été rapportés par la médecine de l'Inde antique entre 4500 et 1500 avant Jésus-Christ. Cette maladie aurait été évoquée dans le *Chakara Samhita*, le plus ancien texte de cette médecine indienne antique, sous la dénomination de « apasmara » ou « perte de conscience ». Le British Muséum possède une tablette babylonienne, datant d'au moins 2000 ans avant J.-C., qui décrit l'épilepsie de façon détaillée.

Figure 1 Tablette babylonienne décrivant l'épilepsie



Il y est relaté différents types de crises actuellement reconnus. Malgré une bonne description de la maladie, les Babyloniens voyaient en elle un caractère surnaturel. Par conséquent, le remède devait relever du domaine spirituel. Cette conception préfigurait celle des Grecs, au V^{ème} siècle avant J.-C., qui la surnommaient «la maladie sacrée». Par ailleurs, le mot grec *epilêpsis* ou *epilêpsia* signifie « action de saisir, de mettre la main sur quelque chose, attaque, interception, arrêt soudain ». Il tire son origine du grec ancien « επιλαμβάνειν » (epilambanein) qui signifie « criser ou attaquer ». Dans son ouvrage (*De la Maladie sacrée*), Hippocrate la voyait déjà comme un dérèglement cérébral à caractère héréditaire. Il recommandait des traitements physiques en indiquant que lorsque la maladie devenait chronique, elle était incurable. Voici ce qu'il écrivait à ce sujet : « Certaines personnes croient qu'il s'agit d'une intervention divine. C'est faux. Il s'agit d'une maladie naturelle dont on ne comprend pas encore la cause ».

Plus tard, la Bible relata des cas d'épilepsies. Ils étaient souvent associés à l'intervention d'une force surnaturelle, généralement diabolique, comme en témoigne le récit du Christ chassant le démon d'un jeune homme épileptique dans l'Évangile de Saint Marc (Marc, 9 :14-19). Pendant 2000 ans, des conceptions surnaturelles prévalurent, notamment pendant le Moyen Âge. Durant cette période, les manifestations épileptiques inspirèrent la crainte, la méfiance et la superstition, ce qui engendra une incompréhension et une stigmatisation sociale démesurée des épileptiques. Par conséquent, cela contribua à limiter la connaissance scientifique de cette maladie. Au XVI^{ème} siècle, Ambroise Paré a été, semble-t-il, le premier à employer le mot « épilepsie ».

Ce n'est véritablement qu'aux XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècles que ce mal a commencé à être perçu comme un dérèglement cérébral. Cette nouvelle conception de la maladie a été permise grâce à l'émergence de la neurologie en tant que nouvelle discipline distincte de la psychiatrie. Les origines de la conception moderne de l'épilepsie remontent au XIX^{ème} siècle avec les observations cliniques, anatomiques et physiologiques du neurologue Hughlings Jackson. En 1873, il a émis l'hypothèse que les crises d'épilepsies étaient provoquées par des décharges électrochimiques brutales d'énergie dans le cerveau et que le caractère des crises était lié à l'emplacement et à la fonction du site des décharges (Berkovic and Scheffer 2001). Jackson, fut le premier à donner une classification anatomo-clinique des phénomènes épileptique. D'ailleurs, il énonçait ceci à propos de la pathologie de la crise épileptique : « Convulsion is but a symptom and implies only that there is an occasional and excessive and disorderly discharge of nerve tissue on muscles. » (Jallon 2002).

C'est en 1920, en Allemagne, que le psychiatre Hans Berger inventa l'électroencéphalogramme (EEG) qui est utilisé depuis les années trente pour l'étude de l'épilepsie. Ce moyen technique a permis de confirmer l'hypothèse de Jackson et ainsi de localiser

les sites de décharges épileptiques provoquant les crises. L'EEG a aussi permis de développer des possibilités de traitements neurochirurgicaux qui sont devenus beaucoup plus courant à partir des années cinquante. De plus, c'est au XX^{ème} siècle que les premiers réels espoirs thérapeutiques sont apparus grâce à l'utilisation des bromures, puis des barbituriques chez des patients épileptiques.

Malgré tout cela, très souvent, les épileptiques restent confrontés aux vieilles croyances surnaturelles, au rejet social et à la discrimination. Encore aujourd'hui, dans les pays industrialisés, les crises d'épilepsie demeurent un sujet tabou. Pourtant, selon une étude récente, l'épilepsie affecte plus de 0,5% de la population mondiale (Kaneko et al. 2002). D'après les chiffres de l'OMS, jusqu'à 5% de la population mondiale est susceptible de présenter une crise unique à un moment donné de sa vie, soit près de 50 millions de personnes. La prévalence de l'épilepsie, définie comme étant la récurrence d'au moins deux crises épileptiques, est de 0.5–1% de la population mondiale. L'incidence annuelle, correspondant à l'évaluation du nombre de nouveaux cas d'une maladie survenant dans une population donnée par année, est de 50 nouveaux cas pour 100'000 dans les pays industrialisés, tandis que dans les pays en voie de développement, ce chiffre est plus important : 100 à 190 nouveaux cas pour 100'000 (Sander 2003). Toujours selon des chiffres de l'OMS, jusqu'à 70% des enfants et des adultes qui viennent d'être diagnostiqués épileptiques, peuvent être traités avec succès grâce aux antiépileptiques. Pourtant, pour des raisons économiques et sociales, trois épileptiques sur quatre dans le monde ne sont pas du tout traités et la plupart vivent dans des pays en voie de développement. En Suisse, à l'heure actuelle, environ 70'000 personnes souffrent d'épilepsie (EPI 2008) (Centre suisse de l'épilepsie).

Ces dernières années, la recherche, aussi bien au niveau fondamental que clinique, a fait des avancées remarquables. En recherche fondamentale, certains types particuliers de crises d'épilepsie ont réussi à être reliés à des dysfonctionnements précis des jonctions neuronales au niveau cérébral. Cela a conduit les neuropharmacologues à rechercher ou à synthétiser des substances qui interfèrent de façon sélective avec ces désordres cérébraux. Par la suite, de nouveaux antiépileptiques, capables de traiter des types particuliers de crises, ont été mis au point. A l'heure actuelle, les neurologues possèdent des moyens techniques tels que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'EEG. La première permet de visualiser la plupart des anomalies structurelles du cerveau responsables des crises épileptiques. De ce fait, le diagnostic est plus précis et le traitement mieux adapté. Certains patients présentent une épilepsie pharmacorésistante. Dans ce genre de cas, ils peuvent être traités de façon chirurgicale. Mais parfois, aucun traitement n'est efficace. Ainsi, il est important que la recherche épileptologique continue de progresser. Cela permettra de faire la lumière sur de nouveaux mécanismes fondamentaux causant la maladie. De ce fait, la compréhension des processus cellulaires et cérébraux des différents types

de crises et syndromes épileptiques devrait alors conduire à de nouvelles approches en matière de prévention, de traitement et de guérison.

1.2 La classification des crises épileptiques

Une crise d'épilepsie se présente sous forme de manifestations paroxystiques motrices, sensitives, sensorielles ou psychiques avec un début et une fin brutale. Cette crise peut être associée à une perte de connaissance. La crise est l'expression clinique d'une décharge excessive hyper-synchrone de neurones du cortex cérébral. Cette manifestation clinique va dépendre de l'origine topographique puis de la propagation des décharges neuronales au sein des structures cérébrales. La crise, en tant que telle, est l'unité pathologique de l'épilepsie, car cette maladie est, par définition, la répétition chez un même patient de crises épileptiques spontanées.

L'EEG permet de déterminer si une crise est de nature épileptique ou non. Les potentiels EEG représentent les courants extracellulaires d'un ensemble de neurones. Mais toutes les cellules ne contribuent pas de la même manière à ce signal. Il reflète principalement l'activité de surface des neurones corticaux proches des électrodes. L'EEG de surface montre des motifs typiques d'activité pouvant être corrélés à des processus physiopathologiques, telles que des crises épileptiques. Il est aussi possible de voir des *signes épileptiques intercritiques* présents entre les crises, qui sont composés de décharges brèves ou de complexes paroxystiques de pointes, polypointes, pointes-ondes et polypointes-ondes, à localisation bilatérale, synchrones ou asynchrones. Ces phénomènes sont les témoins silencieux de la maladie chez un patient épileptique. Cependant, environ 1% de la population présente des anomalies électriques qui peuvent être découvertes de manière fortuite lors d'examen EEG effectués pour une raison différente. Elles ne signifient pas que le patient est épileptique, car il n'y a pas d'épilepsie sans crise clinique. Il existe différentes figures paroxystiques sans signification épileptique, telles que les décharges rythmiques temporales moyennes et les décharges rythmiques infra-cliniques de l'adulte. Chez les enfants, l'EEG peut présenter des bouffées d'ondes lentes et survoltées à l'endormissement et des décharges de polypointes-ondes au cours du stade du sommeil lent léger. Mais ces deux épisodes paroxystiques non-épileptiques ont un caractère physiologique chez l'enfant. Dans le cas d'enquêtes génétiques sur des formes familiales d'épilepsies, les anomalies EEG épileptiformes ont une grande valeur pour le diagnostic clinique.

Selon la classification de la Ligue Internationale Contre l'Epilepsie, il existe deux types de crises : les *crises généralisées* et les *crises partielles*. Cette classification repose essentiellement sur la sémiologie des crises (1981) (*Table 1*).

Table 1 Classification internationale des crises épileptiques (1981)

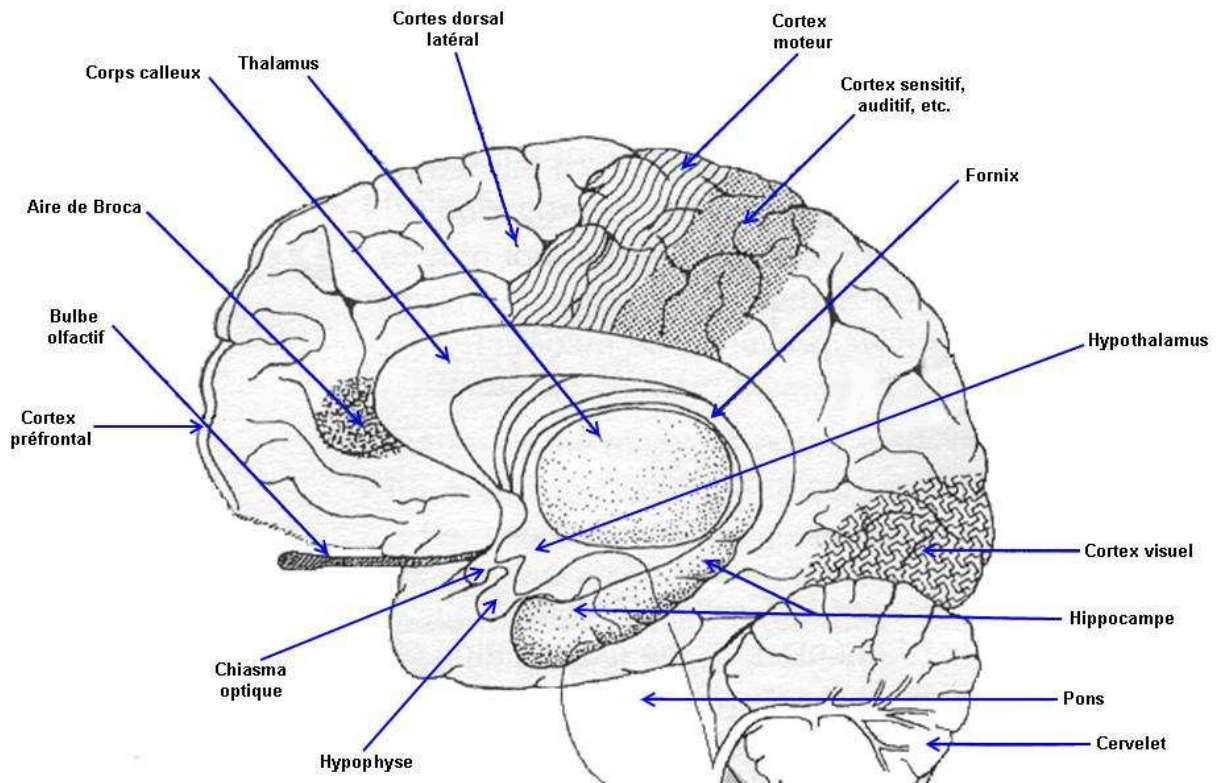
1.	Crises partielles (focales)
1.1.	Crises partielles simples (sans altération de la conscience)
1.1.1.	avec des signes moteurs
1.1.2.	avec des signes somato-sensitifs ou sensoriels
1.1.3.	avec des signes végétatifs
1.1.4.	avec des signes psychiques
1.2.	Crises partielles complexes (avec altération de la conscience)
1.2.1.	crise partielle simple suivie de troubles de la conscience
1.2.2.	altération de la conscience dès le début de la crise
1.3.	Crises partielles complexes secondairement généralisées (tonico-clonique, tonique, clonique)
1.3.1.	crise partielle simple, secondairement généralisée
1.3.2.	crise partielle complexe secondairement généralisée
1.3.3.	crise partielle simple évoluant vers une crise partielle complexe secondairement généralisée

2.	Crises généralisées
2.1.	Crises absences
2.1.1.	absences typiques
2.1.2.	absences atypiques
2.2.	Crises myocloniques
2.3.	Crises cloniques
2.4.	Crises toniques
2.5.	Crises tonico-cloniques
2.6.	Crises atoniques

1.2.1 Les crises généralisées

Les crises généralisées sont le résultat de décharges épileptiques se produisant dans les deux hémisphères du cortex cérébral. A l'EEG, le phénomène se traduit par des anomalies paroxystiques bilatérales, synchrones et symétriques. Le cortex cérébral, le thalamus, la formation réticulée du tronc cérébral, ainsi que les circuits neuronaux reliant ces différentes structures, sont impliqués dans les crises généralisées. Mais le terme *généralisé* ne signifie pas que la totalité des structures cérébrales soient incriminées. Par exemple, le cervelet ne participe pas à cet événement.

Figure 2 Coupe sagittale de cerveau



L'expression clinique commune à tous les types de crises généralisées est la perte de conscience. Pour distinguer ces différents types, il est important d'y associer la symptomatologie du patient qui se traduit par des manifestations motrices et végétatives.

1.2.2 Les crises partielles

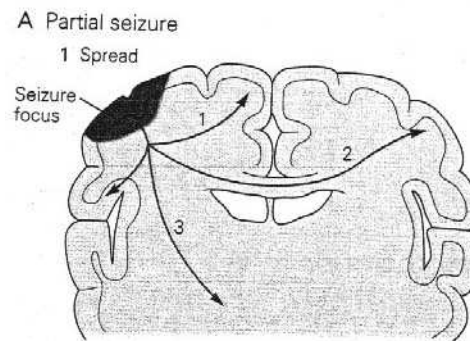
Les crises partielles possèdent toutes un point commun : l'apparition de décharges épileptiques dans une partie limitée du cortex cérébral. L'origine de ces décharges est fréquemment lié à une population de neurones inclus dans une zone corticale plus ou moins grande appelée *zone épileptogène*. Pourtant, de temps en temps, les crises débutent au sein d'un foyer épileptique correspondant à une population neuronale spatialement limitée et immuable.

Selon la classification internationale, il existe trois types principaux de crises partielles : les crises partielles simples, partielles complexes et partielles complexes secondairement généralisées (*Table 1*).

Les crises partielles simples possèdent une caractéristique fondamentale : l'absence d'altération de la conscience pendant le déroulement de la crise.

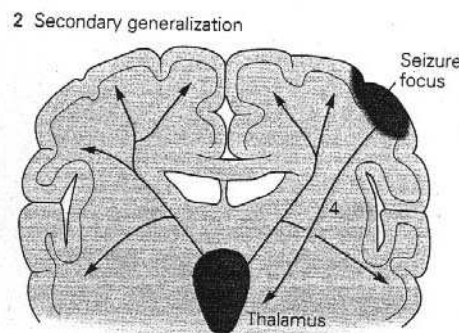
Une crise d'épilepsie avec altération, même partielle, de la conscience est une *crise partielle complexe*. Cette perte de contact avec le monde extérieur peut être progressive ou complète d'emblée.

Figure 3 Chemins empruntés par la propagation de crises partielles (Kandel 2000)



Le dernier type de crises partielles est la *crise partielle secondairement généralisée*. Elle se manifeste par une propagation de l'activité épileptique qui au début présente la symptomatologie de la crise partielle simple ou complexe. Puis, le patient perd totalement connaissance et des symptômes bilatéraux sont visibles ; ils sont liés à la diffusion des décharges à l'hémisphère controlatéral.

Figure 4 Chemins empruntés par la propagation de crises partielles secondairement généralisées (Kandel 2000)



La grande diversité des crises partielles est due à l'existence ou non d'une propagation. Les frontières entre chaque type de crises ne sont pas toujours évidentes. Par conséquent, il est

difficile de savoir de quel type de crises il s'agit. C'est pourquoi, l'analyse des symptômes en début de crise, c'est-à-dire lors de l'état conscient du patient, a une grande valeur pour le diagnostic et elle permet de déterminer la nature de la crise.

1.3 La physiopathologie des crises épileptiques

Les crises partielles ont été beaucoup plus étudiées que les crises généralisées du point de vue de la physiopathologie.

1.3.1 Le fonctionnement neuronal normal

L'état fonctionnel normal d'un neurone est régi par un équilibre électrolytique de part et d'autre de la membrane cellulaire. La composition ionique des liquides intracellulaires et extracellulaires est différente. Le liquide intracellulaire se caractérise par une concentration élevée en ions potassium (K^+) et faible en ions sodium (Na^+), calcium (Ca^{2+}) et chlorure (Cl^-). Cette composition ionique est maintenue grâce à des protéines membranaires transporteuses d'ions à travers la membrane, telle que la pompe à sodium Na^+/K^+ ATPase. Cette dernière est capable d'expulser les ions Na^+ de la cellule et de capter, dans le milieu extracellulaire, les ions K^+ en échange. La composition du liquide extracellulaire est l'inverse de celle du liquide intracellulaire. Par conséquent, l'ensemble de ces mécanismes entraîne une asymétrie de distribution de charges autour de la cellule neuronale et provoque un *potentiel de repos* estimé à -70 mV. Ce potentiel membranaire ne varie pas si rien ne vient perturber l'équilibre. Mais ce dernier peut être modifié par une variation de concentration ionique extracellulaire, par des stimulations mécaniques, chimiques ou électriques, mais aussi par des altérations de la membrane ou des éléments qui la composent. Ces altérations peuvent être d'origine génétique ou acquise.

L'activité électrique neuronale se traduit par un passage d'ions à travers la membrane plasmique de la cellule. Ceci permet une variation du potentiel de membrane. La réduction du potentiel membranaire se nomme la *dépolarisation*. Ce phénomène peut être à l'origine d'un *potentiel d'action* (PA) exciteur, qui est la voie royale pour la communication inter-neuronale. A l'inverse, une augmentation du potentiel de membrane, appelée aussi *hyperpolarisation*, a un effet inhibiteur. La modification du potentiel de membrane se fait grâce à des canaux ioniques, protéines transmembranaires insérées dans la couche bilipidique de la membrane plasmique. Il existe plusieurs sortes de canaux : des canaux perméables au Na^+ , au K^+ , au Ca^{2+} , au Cl^- . Certains d'entre eux sont voltage-dépendants. Cela signifie que leur fonctionnement va dépendre du

voltage transmembranaire. Selon la valeur de ce dernier, ils auront une conformation fermée ou ouverte. Sous l'influence d'un potentiel d'action, les canaux sodiques voltage-dépendants s'ouvrent pour laisser entrer du Na^+ dans le neurone, selon un signal fonctionnant sur le principe du *tout ou rien*. Par la suite, les canaux potassiques voltage-dépendants s'ouvrent pour laisser sortir le K^+ . Le PA ainsi généré va être transmis aux structures neuronales avoisinantes.

La communication inter-neuronale se fait au moyen de *synapses* dont le fonctionnement est intimement lié à des neurotransmetteurs. Ces derniers sont des molécules qui transmettent le signal d'un neurone à un autre. Les plus répandus sont l'acétylcholine (ACh), l'acide γ -aminobutyrique (GABA), l'acide glutamique, la noradrénaline, la glycine, la dopamine et la sérotonine. Ces neurotransmetteurs sont stockés dans des vésicules de la structure présynaptique. Ils sont libérés dans la fente synaptique par des mécanismes sous dépendance d'ions Ca^{2+} . Lorsqu'un PA atteint le bouton synaptique, les canaux calciques sont activés, ce qui permet l'entrée d'ions Ca^{2+} dans la cellule. Cette variation intracellulaire en ions Ca^{2+} cause la fusion des vésicules du neurotransmetteur avec la membrane présynaptique. Le neurotransmetteur est alors libéré dans la fente synaptique. Il va pouvoir agir sur la membrane postsynaptique du neurone suivant si ce dernier possède des récepteurs spécifiques au neurotransmetteur libéré. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires sur lesquelles certains médicaments peuvent agir pour orienter une réponse désirée. Il existe deux types de potentiels postsynaptiques qui fonctionnent avec des neurotransmetteurs spécifiques. Le premier type va dépolariser la membrane postsynaptique, ce qui va engendrer un PA dans la cellule postsynaptique. Ce dernier est appelé *potentiel postsynaptique excitateur* (PPSE). A l'opposé, il existe un *potentiel postsynaptique inhibiteur*, qui amène la cellule postsynaptique à un état d'hyperpolarisation, ce qui la rend moins excitable. Grâce à ces deux types de potentiels, la transmission synaptique va être modulée par des systèmes de neurotransmission de type inhibiteur ou excitateur.

Le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur qui agit essentiellement au niveau postsynaptique. Cet acide aminé se lie à deux types de récepteurs : le récepteur GABA(A) (récepteur ionotropique – canal Cl^-) et le récepteur GABA(B) (récepteur métabotropique). L'action inhibitrice du GABA agit au niveau des récepteurs GABA(A) qui permet une augmentation de la perméabilité aux ions Cl^- et provoque une hyperpolarisation du neurone. Lorsque le GABA se lie aux récepteurs GABA(B) présynaptiques, cela permet un blocage de l'entrée du Ca^{2+} , grâce à l'inhibition des canaux Ca^{2+} . Ainsi, il y a diminution de l'exocytose des vésicules synaptiques et par conséquent moins de libération de neurotransmetteurs. Dans ce cas, le GABA s'oppose à la dépolarisation du neurone et permet aussi l'ouverture des canaux K^+ qui provoque une hyperpolarisation. Ces deux types de récepteurs spécifiques au GABA possèdent

des sites allostériques pour les benzodiazépines et les barbituriques. Ainsi ces substances peuvent moduler leur activité. A l'opposé, il existe des neurotransmetteurs excitateurs, tel que le glutamate. Il agit par l'intermédiaire de différents récepteurs : NMDA, AMPA/kainate et métabotropiques.

Dans le système nerveux, les neurones s'organisent en *réseaux*. Ils possèdent une activité électrique autonome, ce qui produit des circuits oscillants. Ces derniers vont être caractérisés par un niveau d'équilibre entre phénomènes excitateurs et inhibiteurs. Les signaux émanant de ces réseaux dépendent des propriétés intrinsèques des neurones qui les constituent, des connections synaptiques et des afférences sensorielles externes. Un tel réseau est capable de changer d'état par une modification plus ou moins brutale du seuil d'excitation en rapport avec une altération des processus excitateurs ou inhibiteurs. Donc, la notion de *foyer épileptique* peut être associée à un réseau particulier de neurones où l'état oscillatoire devient chaotique. Plusieurs facteurs peuvent intervenir pour déplacer le seuil d'excitabilité du réseau neuronal. Par exemple, la perméabilité de la membrane cellulaire aux ions K^+ dépend de la contribution des canaux K^+ voltage-dépendants activés par la dépolarisation du potentiel d'action sodique. Les ions Ca^{2+} , quant à eux ont un rôle majeur dans la régulation de l'excitabilité cellulaire, car la variation de leur concentration provoque la libération des neurotransmetteurs dans la structure présynaptique. Donc, une diminution des conductances membranaires au K^+ et une augmentation de celles au Ca^{2+} contribuent à la diminution du seuil d'excitabilité du réseau. De plus, une accumulation d'ions K^+ dans le milieu extracellulaire favorise aussi la diminution du seuil d'excitabilité. Celui-ci fait obligatoirement intervenir les actions spécifiques des neurotransmetteurs, ce qui signifie que soit l'activité du système glutamatergique est augmentée, soit le système GABA devient déficient. Ainsi, il y a mise en évidence de la fragilité des réseaux neuronaux.

1.3.2 Le phénomène épileptique

(a) *La décharge épileptique* – La naissance d'une crise, sa propagation (plus ou moins rapide et plus ou moins étendue aux structures avoisinantes), et son épuisement progressif peuvent être étudiés au niveau physiologique et biochimique. L'hypothèse la plus probable pour ce type de phénomène est une altération des courants membranaires et un déséquilibre des mécanismes d'excitation et d'inhibition. Cela entraîne une hyperexcitabilité et une hypersynchronisation dans un réseau neuronal bien déterminé. Il est important de préciser que les mécanismes de survenue d'une crise n'ont pu être étudiés que sur des modèles animaux reproduisant des situations chroniques ou aiguës. L'activité épileptique est caractérisée par une décharge paroxystique et synchrone au sein d'une population neuronale. L'expression EEG de cet

état d'hyperexcitabilité est une *pointe*. Celle-ci est accompagnée d'une *dépolarisation massive paroxystique* (*Paroxysmal Depolarisation Shift* ou *PDS*) qui elle-même est la cause de la survenue à haute fréquence de décharges de potentiels d'action ou *train de potentiels d'action*. Après le PDS, il s'ensuit une large séquence d'hyperpolarisation puis survient une autre décharge paroxystique plus brève que la précédente (post-décharge) qui annonce cliniquement le début de la crise et est visible sur l'EEG. Au niveau neuronal, il y a une sommation prolongée de plusieurs accidents de dépolarisation de plus en plus brefs qui sont synchrones au déroulement de la crise. Puis, une hyperpolarisation a lieu dans les différentes cellules du foyer, mais aussi dans les régions en contact avec lui. Ceci explique en partie la limitation de la décharge dans le temps et l'espace. Le foyer épileptique serait organisé en trois parties : les neurones hyperexcitables, engendrant d'importants PDS, seraient au centre du foyer ; puis il y aurait la zone intermédiaire entourée par la périphérie organisée en une zone concentrique de cellules hyperpolarisées non excitables, limitant ainsi la décharge dans l'espace.

(b) *La propagation de la décharge épileptique* – Si le PDS constitue la condition essentielle à l'épileptogénèse, le passage d'un état précritique vers une crise dépend d'un processus de synchronisation. Quand une masse de neurones, au sein d'un foyer épileptique, se dépolarise à haute fréquence, cela donne naissance à des bouffées de potentiels d'action. Cette activité peut recruter des cellules normales d'une manière synchrone, ce qui entraîne une propagation de l'activité épileptique à travers le système nerveux central (SNC). Cette propagation va dépendre de la localisation du foyer épileptogène, des voies de propagation empruntées, mais aussi de la rapidité de la décharge. A l'heure actuelle, les connaissances sur les mécanismes de synchronisation au niveau de la région neuronale sont encore fragmentaires, mais la perte du contrôle inhibiteur synaptique interviendrait lors cette synchronisation de l'activité épileptique.

(c) *L'arrêt de la décharge épileptique* – Les études à ce sujet sont encore peu nombreuses. Par conséquent, le mécanisme de l'arrêt des crises reste mal connu. Les facteurs qui limitent l'extension et stoppent à un moment ou à un autre le processus épileptogène seraient liés aux mécanismes inhibiteurs. Lorsque ces mécanismes entrent en action, les métabolites intracellulaires secondaires s'accumuleraient, la glie astrocytaire recapterait le K^+ extracellulaire et les neurotransmetteurs inhibiteurs interviendraient. L'activation de certaines structures cérébrales à effet inhibiteur diffus, tels que la substance noire et le cervelet, paraissent intervenir dans la propagation des crises partielles, le contrôle de leur généralisation, ainsi que sur leur interruption. Lors d'une crise, un métabolisme anaérobie secondaire est observé au niveau cellulaire. Il cause un déficit en apport d'oxygène. Il est à l'origine d'une acidose intracellulaire. Cette diminution de l'activité métabolique entraîne avec elle une diminution de l'activité ATPasique, ce qui va créer

une activation des courants potassiques et par conséquent une hyperpolarisation inhibitrice. L'arrêt spontané et brutal de l'activité critique partielle ou généralisée suggère la mise en jeu de substances anti-convulsivantes endogènes. Parmi celles qui ont été étudiées, l'adénosine, neuromodulateur ubiquitaire, serait impliquée dans l'arrêt spontané des crises. La période réfractaire postcritique est associée à des modifications de concentrations cérébrales de différentes substances endogènes.

1.3.3 Facteurs de l'épileptogenèse primaire

Les bases fondamentales de l'épileptogenèse sont l'*hyperexcitabilité* et l'*hypersynchronie* d'une population neuronale. L'hypersynchronie correspond à la tendance d'une population neuronale organisée ou non en réseau, à être activée de façon synchrone. L'hyperexcitabilité est liée à la tendance d'un neurone à répondre à un PDS par des bouffées de potentiels d'actions. Pour comprendre l'apparition d'un PDS, il est bon de rappeler que le Na^+ joue un rôle important dans la genèse de la dépolarisation rapide du potentiel d'action. Le Na^+ est sous la dépendance de canaux voltage-dépendants, dont la structure biochimique est bien connue. La phénytoïne, un anticonvulsivant, agirait en bloquant les canaux sodiques. En quittant la cellule, le K^+ génère un courant sortant, ce qui entraîne une hyperpolarisation de la membrane. Ce courant agirait donc en limitant l'excitabilité cellulaire. Donc, il pourrait représenter le candidat idéal dans les processus cellulaires qui limitent la décharge dans le temps et l'espace. Le rôle du Ca^{2+} est plus complexe, car son entrée dans la cellule a au moins deux effets : faire varier le voltage et jouer le rôle de messenger secondaire dans les processus intracellulaires. En résumé, le PDS, ainsi que les bouffées de potentiels d'action, sont liés à un afflux de Ca^{2+} et de Na^+ à l'intérieur du neurone. L'onde lente, considérée comme un phénomène inhibiteur ou protecteur, résulte de l'addition des courants ioniques repolarisants par sortie de K^+ et entrée d'ions Cl^- .

Les facteurs neurobiologiques de l'épileptogenèse primaire peuvent être classés en trois catégories : membranaire, synaptique, environnementale.

(a) *Facteurs membranaires* – Cette catégorie est essentiellement constituée de canaux ioniques voltage-dépendants, dont la distribution et la constitution peuvent être soumises à des variations physiologiques et pathologiques. La mise en jeu de ces canaux est à l'origine des mouvements ioniques transmembranaires et des potentiels électriques. L'implication de ces canaux dans l'épileptogenèse primaire a été démontrée par la découverte de mutations de gènes codant pour des sous-unités structurelles de canaux ioniques dans plusieurs syndromes d'épilepsies idiopathiques. Il s'agit de gènes codant pour des sous-unités de canaux K^+ voltage-

dépendants pour le syndrome de convulsions néonatales familiales bénignes. Ces gènes sont co-exprimés dans de nombreuses régions du cerveau et les mutations en cause altèrent la réponse et l'influx de stimulation. Des mutations concernant les gènes codants pour les sous-unités α et β de canaux Na^+ voltage-dépendants ont également été mises en évidence dans des épilepsies généralisées idiopathiques avec convulsions fébriles. Le concept de canalopathie, à l'origine de plusieurs pathologies cardiaques et neurologiques qui concernent les épilepsies mono ou polygéniques, paraît devoir être appliqué à une large variété d'épilepsies. Des mutations ont également été découvertes dans des gènes codants pour des sous-unités structurelles de canaux ligand-dépendants. Dans le cas de l'épilepsie frontale familiale nocturne, forme d'épilepsie partielle idiopathique, les gènes en cause concernent des sous-unités du récepteur nicotinique de l'acétylcholine. Ces derniers s'expriment dans toutes les couches du cortex frontal. Dans le cas des épilepsies généralisées idiopathiques de type absence, des études mettent l'accent sur le dysfonctionnement de canaux Ca^{2+} , dont dépend la régulation du système oscillant corticothalamique.

(b) *Facteurs synaptiques* – L'activité épileptique peut être déterminée par un déséquilibre entre les systèmes inhibiteurs GABA et les systèmes excitateurs glutamatergiques.

▪ *Le système GABAergique* – Une réduction de ce système conduit à un état d'hyperexcitabilité par désinhibition. Cet événement peut se produire à cause d'une altération fonctionnelle au niveau d'un des éléments de la neurotransmission GABAergique, tels que la synthèse, la libération, le récepteur postsynaptique GABA(A), les récepteurs pré- ou postsynaptiques GABA(B), le transporteur ou encore la recapture du GABA. L'altération peut être aussi de nature structurelle. Dans ce cas, elle est liée à la perte ou la lésion d'interneurones GABA. Les arguments en faveur de l'hypothèse GABAergique de l'épilepsie sont principalement pharmacologiques. Comme vu précédemment, les barbituriques et les benzodiazépines sont des agonistes des sites allostériques du récepteur GABA(A). Par conséquent, ces deux familles de substances sont des anticonvulsivants. A l'inverse, les antagonistes au récepteur GABA(A) ainsi que les bloqueurs du canal chlore sont des convulsivants. Mais, les arguments neurobiologiques les plus pertinents concernent la conformation structurelle des récepteurs GABA. Leurs changements pathologiques de durée variable amènent à un dysfonctionnement avec modification de la sensibilité aux agents pharmacologiques, tels que les benzodiazépines. Le renforcement de l'inhibition GABAergique doit également être examiné dans le cas de l'épileptogénèse primaire lors d'hypersynchronisation. Ce phénomène est rencontré dans l'épilepsie absence qui paraît résulter du renforcement des inhibitions indépendantes du circuit cortico-thalamo-cortical. Dans le

cas d'épilepsie partielle, le développement de circuits aberrants GABAergiques pourrait être à l'origine d'hypersynchronie locale et d'épilepsie secondairement généralisée.

- *Le système glutamatergique* – Les événements épileptiques affectés par l'influence d'un excès d'excitabilité liée à la neurotransmission glutamatergique sont appuyés par des arguments neurobiologiques et pharmacologiques. De nombreuses études expérimentales et cliniques ont montré que la transmission glutamatergique pouvait devenir excessive, en premier lieu à cause d'une augmentation de la synthèse et de la libération du glutamate. Ce processus est à l'origine de la plasticité liée au développement et à l'apprentissage, qui provoquent la potentialisation à long terme. Cette plasticité intervient de concert avec d'autres phénomènes neurobiologiques dans la transformation de décharges intercritiques en décharges critiques. Par ailleurs, il a aussi été démontré que l'amplification de la transmission glutamatergique serait à l'origine de l'augmentation pathologique du nombre de récepteurs et/ou de modifications structurales des différents types de récepteurs du glutamate, récepteurs AMPA, kaïnate, NMDA et métabotropiques.

- *Le système de neuromodulation* – Beaucoup de neurotransmetteurs, tels que l'acétylcholine, les monoamines et divers neuropeptides peuvent intervenir directement ou par l'intermédiaire d'une modulation au niveau du couple GABA/glutamate. Ces neurotransmetteurs modifient l'excitabilité et la synchronisation des réseaux neuronaux. Ainsi, l'intervention se fait soit au niveau local, soit au niveau global de l'épileptogénèse. L'épilepsie frontale familiale nocturne mentionnée précédemment est un bon exemple pour montrer l'implication de la neurotransmission cholinergique au travers des récepteurs nicotiniques.

(c) *Les facteurs environnementaux* – L'environnement péri-neuronal est sous la dépendance du liquide céphalo-rachidien (LCR) et d'un système complexe vasculaire (barrière hématoencéphalique) et glial (astrocyte, microglie). Les interactions glio-neurales et l'association activité neuronale/métabolisme énergétique/débit sanguin cérébral constituent les principaux facteurs susceptibles d'intervenir dans le déclenchement, l'entretien et l'arrêt d'une crise.

(d) *Les facteurs de transition* – D'un état normal, en passant par un état précritique, vers un état critique.

- *Transformation d'une activation physiologique en décharge intercritique* – L'apparition des décharges intercritiques est le fruit de l'effet combiné de plusieurs facteurs neurobiologiques, tels que, des excitations récurrentes à partir de boucles récurrentes ou de désinhibition GABAergique ; l'activation de récepteurs glutamatergiques, en particulier NMDA ; l'élévation anormale de la concentration extracellulaire de K^+ et/ou de la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} .

▪ *Passage de l'état précritique en état critique* – Le déclenchement d'une activité est sous la dépendance de facteurs divers, comme par exemple, l'augmentation des potentiels excitateurs postsynaptiques par un phénomène de potentialisation à long terme ; la réduction des potentiels inhibiteurs GABAergiques postsynaptiques ; la diminution de l'élimination du K^+ extracellulaire à cause d'un dysfonctionnement des cellules gliales ; l'accumulation du Ca^{2+} intracellulaire, par insuffisance des systèmes tampons (calmoduline, calbindine) ; le dysfonctionnement des systèmes de neuromodulation ; la diminution des courants potassiques sortant qui assurent en temps normal la repolarisation membranaire.

1.3.4 L'épileptogenèse secondaire

L'aggravation des événements épileptiques ou le passage de crises occasionnelles à une épilepsie chronique sont attribués aux conséquences neurobiologiques à court et à long terme des crises. La neurotoxicité glutamatergique semble être le facteur prédominant dans l'épileptogenèse secondaire.

(a) *Les conséquences neurobiologiques à court terme des crises* – Les crises de longue durée ont pour conséquence immédiate des réactions en cascades déclenchées par la libération de glutamate. L'activation des récepteurs NMDA entraîne un influx calcique intraneuronal. Cette entrée d'ions Ca^{2+} est suivie par une activation de divers enzymes calcium-dépendants et d'une induction des gènes précoces. Plusieurs voies conduisent à la mort neuronale. La première est rapide et correspond à l'activation des récepteurs NMDA/kainate qui ont la capacité d'induire, par entrée excessive de Na^+ , une lyse osmotique. Dans certains cas, une réaction en cascade, comme celle liée à l'activation des récepteurs NMDA, est précédée d'une entrée de Ca^{2+} dans les neurones à cause de récepteurs AMPA/kainate dépourvus de sous-unités GluR2. La libération du glutamate induit l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. Celui-ci agit au niveau de l'ADN pour déclencher des processus apoptotiques. L'entrée de Ca^{2+} peut aussi conduire à la mort neuronale par nécrose.

(b) *Les conséquences neurobiologiques à moyen terme* – Il s'agit essentiellement d'une réaction gliale avec activation astrocytaire et prolifération microgliale inflammatoire. Par exemple, dans un foyer épileptogène temporal, une sclérose hippocampique peut apparaître. Elle est le résultat d'une perte neuronale associée à une gliose proliférative. L'activation gliale est influencée par des mouvements ioniques, des modifications de la charge en ATP, une production de cytokines liée à la mort neuronale. La réaction gliale est associée à l'expression de facteurs qui

induisent la transcription de gènes codant pour les neurotrophines et des molécules d'adhésion potentiellement responsables de réarrangements morphologiques à long terme.

(c) *Les conséquences neurobiologiques à long terme* – Les lésions neuronales dues aux crises épileptiques sont suivies de réarrangements morphologiques incluant une réorganisation neuronale et une neurogenèse dans certaines régions cérébrales. La réorganisation neuronale est faite de bourgeonnements avec développement de néosynapses qui ont été mises en évidence chez l'homme dans les épilepsies temporales mésales réfractaires. Ces modifications morphologiques créent des circuits aberrants générateurs d'hyperexcitabilité et d'hypersynchronie. Le phénomène de neurogenèse est dû aux crises d'épilepsie qui déclenchent une division de cellules souches en cellules gliales et neurones.

1.4 La classification internationale des épilepsies et des syndromes épileptiques

Les premières classifications des épilepsies ne faisaient pas de distinctions entre les crises et les syndromes épileptiques. Ainsi, les termes *grand mal* et *petit mal* étaient largement répandus chez les spécialistes de l'époque. Afin de remédier à cette imprécision, Gastaut a proposé, en 1969, une classification des épilepsies basée sur une combinaison de données cliniques et électroencéphalographiques (Gastaut 1969).

Actuellement, la classification des épilepsies et syndromes épileptiques (CIESE) date de 1989 et a été proposée par la Ligue internationale contre l'épilepsie (ou en anglais *Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy, ILAE*) (1989) (*Table 2*). Le terme *cryptogénique* est apparu dans cette classification revisitée. Il se réfère à des épilepsies présumées symptomatiques, mais qui ne présentent aucun signe pour le confirmer.

Table 2 Classification Internationale des Epilepsies et des Syndromes Epileptiques (CIESE) (1989)

1.	Epilepsies et syndromes épileptiques focaux
1.1.	Idiopathiques (liées à l'âge de début)
	Epilepsie bénigne de l'enfant à pointes centrotemporales
	Epilepsie bénigne de l'enfant à paroxysmes occipitaux
	Epilepsie primaire de la lecture
1.2.	Symptomatiques
	Epilepsie partielle continue chronique et progressive de l'enfance (syndrome de Kojewnikow)

Syndromes caractérisés par des crises avec des modes spécifiques de précipitation

Epilepsies du lobe temporal, frontal, pariétal et occipital

1.3. Cryptogéniques

Epilepsies du lobe temporal, frontal, pariétal et occipital

2. Epilepsies et syndromes épileptiques généralisés

2.1. Idiopathiques (liées à l'âge de début)

Epilepsie myoclonique bénignes de l'enfance

Epilepsie absence de l'enfance

Epilepsie absence juvénile

Epilepsie myoclonique juvénile

Epilepsie à crises généralisées tonico-cloniques de l'éveil

Syndromes caractérisés par des crises avec différents modes de précipitation

Autres épilepsies idiopathiques généralisées

2.2. Cryptogéniques ou symptomatiques

Syndrome de West (spasmes infantiles)

Syndrome Lennox-Gastaut

Epilepsie avec crises myoclonono-astatiques

Epilepsie avec absences myocloniques

2.3. Symptomatiques

2.3.1. Epilepsies sans étiologie spécifique

Encéphalopathie myoclonique précoce

Encéphalopathie infantile précoce avec suppression-burst

Autres épilepsies généralisées symptomatiques

2.3.2. Epilepsies dues à des maladies neurologiques spécifiques

3. Epilepsie et syndromes indéterminés

3.1. Avec crises généralisées et focales

Crises néonatales

Epilepsie myoclonique sévère du nourrisson

Epilepsie avec pointes-ondes continues durant le sommeil lent

Epilepsie avec aphasie acquise (syndrome Landau-Kleffner)

Autres épilepsies indéterminées

3.2. Sans caractère généralisé ou focal précis

4. Syndromes spéciaux

4.1. Epilepsies liées à une stimulation épileptogène transitoire

Convulsions fébriles

Crises isolées ou état de mal isolé (status epilepticus)

Crises dues à un facteur toxique ou métabolique

La CIESE de 1989 repose sur deux axes : symptomatologique et étiopathogénique. Tout comme dans la classification des crises, l'axe symptomatologique distingue :

- *Les épilepsies généralisées* où toutes les crises sont de type généralisé. Les manifestations motrices sont d'emblée bilatérales. Les manifestations EEG intercritiques et critiques sont caractérisées par des décharges de pointes, pointes-ondes ou polypointes-ondes bilatérales, synchrones et symétriques.

- *Les épilepsies partielles* sont en rapport avec la localisation où la crise débute. Le secteur est généralement limité aux structures corticales. Au début de la crise, les manifestations EEG critiques sont unilatérales et focales, mais une généralisation secondaire est possible.

L'axe étiopathogénique, quand à lui, distingue :

- *Les épilepsies idiopathiques* sont décrites comme « non-précédées ou occasionnées par d'autres troubles ». Elles surviennent indépendamment de lésions anatomiques cérébrales. Elles sont accompagnées d'un état constitutionnel d'hyperexcitabilité et d'hypersynchronie neuronale. Le facteur étiologique principal est représenté par une prédisposition héréditaire réelle ou présumée. Cette prédisposition implique des facteurs génétiques en cours d'identification. Les épilepsies idiopathiques sont définies par un âge de début particulier, ainsi que des caractéristiques cliniques et encéphalographiques. Cette catégorie est plus détaillée qu'auparavant, car le nombre de sous-classes cliniques d'épilepsies idiopathiques généralisées est en augmentation.

- *Les épilepsies symptomatiques* sont le résultat d'une lésion structurelle diffuse ou focale, évolutive ou fixée, du SNC. Cette lésion peut être déterminée par des explorations neuroradiologiques. Le cas échéant, un déficit neurologique ou une anomalie biologique, témoigne de sa présence. Il est possible que ce type d'épilepsies soit influencé par des facteurs génétiques associés, tels que des facteurs de prédisposition ou maladie neurogénétique lésionnelle avec épilepsie.

- *Les épilepsies cryptogéniques* sont présumées symptomatiques d'après leur expression électro-clinique, mais ce sont des maladies pour lesquelles aucune étiologie n'a pu être retenue, car cela échappe aux moyens d'investigation employés (anamnestiques, cliniques ou paracliniques). Ces épilepsies peuvent présenter un âge de début particulier. Cette catégorie inclut les épilepsies survenant en dehors de toute lésion cérébrale prouvée mais ne correspondant pas aux critères des épilepsies idiopathiques. Par conséquent, il s'agit souvent d'une classification provisoire qui peut être modifiée en fonction du bilan neuroradiologique. Les examens initialement négatifs peuvent se révéler positifs de par l'utilisation d'appareils plus performants qui pourraient permettre de mettre en évidence des microlésions, tels que des cavernomes, ou en raison de la lente évolution de certaines lésions tumorales, non décelées au premier examen.

1.5 Les bases génétiques de l'épilepsie

La composante génétique des épilepsies est connue depuis l'Antiquité, mais les avancées majeures se sont faites durant les années 1930, lorsque William Lennox a introduit une méthode scientifique afin d'étudier les aspects héréditaires de la maladie. Il était attentif à l'épilepsie, aux types de crises, et au pattern EEG. Il a publié sa première étude sur une paire de jumeaux monozygotes en 1934 (Vadlamudi et al. 2004). Finalement, il a réussi à collecter les données de 225 paires de jumeaux mono et dizygotes en 1960 (Lennox 1960). Grâce à ces différentes études, il est arrivé à la conclusion suivante : « *transmission of a predisposition to seizures is a fact* » (la transmission d'une prédisposition des crises est un fait). La contribution majeure de Lennox a été de démontrer que des facteurs génétiques et exogènes, d'importance variable, interagissaient chez ses patients. Ceci a été le début du concept multifactoriel des épilepsies. Ainsi, il préfigurait la classification moderne des épilepsies et syndromes épileptiques.

Toujours dans les années 60, Metrakos a mené à bien une étude génétique sur des troubles convulsifs. Il a calculé la prévalence d'individus souffrant de convulsions parmi des parents proches d'un groupe hétérogène de cas-index présentant des convulsions et la prévalence de parents proches d'un groupe contrôle non-affecté. Il a constaté qu'il y avait une forte évidence pour une distribution familiale des convulsions (Metrakos and Metrakos 1960). Plus tard, grâce à des données cliniques et EEG, il a posé l'hypothèse, qu'il serait possible de former des sous-groupes génétiques spécifiques faits de différentes variétés d'épilepsies. Cette étude classique, rapporte un taux de 12,7% de sujets ayant présenté au moins une crise épileptique (de type non spécifié) parmi les germains d'enfants suivis pour une épilepsie « centrocéphalique », comparé à 4,7% chez les germains de témoins. La conclusion a été la suivante : l'EEG de type centrocéphalique est l'expression d'un gène autosomal dominant (Metrakos and Metrakos 1961). Il est évident que ces premières études n'étaient ni conclusives ni définitives, mais elles ont permis de mettre en lumière la composante génétique des épilepsies. Pourtant, la CIESE se base uniquement sur les syndromes de la maladie et ne tient absolument pas compte de cette composante génétique. De plus, cinq arguments sont en faveur de cette composante non négligeable et ils vont être passés en revue ci-dessous.

1.5.1 Etudes familiales

La susceptibilité familiale des crises d'épilepsie était déjà reconnue au temps d'Hippocrate (Gardiner 1990). Ainsi, les études familiales ont deux objectifs :

- (1) Déterminer l'existence d'une *agrégation familiale* pour une maladie donnée.

-
- (2) Déterminer si le *spectre phénotypique* observé chez les apparentés du cas-index malade l'est plus fréquemment que ne le voudrait le hasard.

Agrégation familiale

L'agrégation familiale est la première étape qui permet de suspecter l'existence d'une composante génétique. Deux types d'observations peuvent être faits. Il existe une plus grande fréquence de la maladie chez les apparentés d'un malade que dans la population générale ainsi que des différences de fréquence de la maladie entre différents groupes ethniques. Même contrôlée et reproduite, de telles observations ne font que de suggérer l'existence d'une composante génétique, car un environnement commun pourrait tout aussi bien expliquer la première observation et, à l'inverse, des environnements variables pourraient expliquer la seconde. Ces observations, en particulier celles qui concernent l'agrégation familiale doit être interprétée avec précaution, car les études de ce type sont souvent imprécises, ou comportent des biais. Ainsi, pour les maladies communes, l'existence de plusieurs malades dans une même famille peut être le simple fruit du hasard.

L'épilepsie « grand mal », ou plus généralement appelée épilepsie généralisée tonico-clonique, affecte environ 4 à 10% de tous les malades épileptiques. Le groupe d'Eisner a identifié 321 patients présentant une épilepsie dite « motrice majeure idiopathique » ou crise généralisée tonico-clonique. Le risque cumulatif pour l'épilepsie chez les germains de malades épileptiques était de 7,5% à 20 ans, si les crises avaient débuté avant l'âge de 4 ans chez le cas index. Ce taux était de 4,3% à 20 ans et de 8% à 40 ans, si les crises du proband avaient débuté entre 4 et 15 ans. Chez les germains de témoins, le risque cumulatif à 40 ans était de 2,3% (Eisner et al. 1959). Par la suite, cette association entre l'âge de début précoce de l'épilepsie et risque plus élevé chez les germains est une donnée qui a été retrouvée chez plusieurs auteurs.

L'étude la plus complète d'enfants issus de parents épileptiques avec crises tonico-cloniques est celle de Tsuboi et Endo. Dans leur population, 4,7% de ces enfants ont présenté des crises afébriles, 12,1% des CF et 37,3% des anomalies EEG « épileptiformes » interictales ou asymptomatiques (Tsuboi and Endo 1977). Des données un peu plus récentes ont retrouvé des taux comparables, proches de ceux observés chez les germains (Hauser and Anderson 1986).

Les crises absences surviennent dans différents syndromes épileptiques. La forme typique est l'EAE et concerne 3 à 4% de tous les malades épileptiques. Mathes a étudié 240 germains de sujets souffrant d'une épilepsie absence : 10% ont présenté des crises épileptiques de tous types et 3,8% une épilepsie (Mathes 1969). Dans une étude menée par l'équipe de Doose, 6,7% des germains d'enfants atteints d'épilepsie absence ont présenté des crises. Parmi les germains pour

lesquels un enregistrement EEG était disponible, 22,3% avaient des anomalies de type pointes-ondes généralisées ou photosensibilité (Doose et al. 1973).

L'EMJ est associée dans environ 95% des cas à des crises généralisées tonico-cloniques et dans 37% des cas à des absences. Environ 11% des épileptiques adultes souffriraient d'une épilepsie myoclonique juvénile. Tsuboi et Christian ont étudié 319 patients présentant une EMJ. Une épilepsie non-spécifiée est présente chez 4,1% des apparentés de premier degré (Tsuboi and Christian 1973). Plus tard, Janz et ses collaborateurs ont résumé les données d'un groupe de Berlin. L'incidence cumulée des épilepsies chez les apparentés du premier degré de malades EMJ est de 5,8% avec 3% chez les parents et 7,7% chez les germains. Il existe différents syndromes épileptiques, ou *spectre*, observés chez les apparentés de patients EMJ : EMJ (31%), épilepsie-absences (34,3%), épilepsie généralisée tonico-clonique (28,6%), syndrome de West et/ou de Lennox-Gastaut (2,9%) et épilepsies partielles (2,9%). (Janz et al. 1992). Delgado-Escueta et al. ont rapporté que dans 50% des familles étudiées, une crise d'épilepsie a été observée chez au moins un apparenté au premier ou au second degré du cas-index EMJ, et chez 12% de l'ensemble des apparentés (Delgado-Escueta et al. 1989). Toutes ces données ont révélé qu'il existe une susceptibilité familiale de développer une épilepsie si l'on est parent de malades EMJ.

Dans le domaine des épilepsies partielles, une étude familiale de l'épilepsie bénigne avec paroxysmes centrotemporaux a été menée par Bray et Wiser. Ils ont étudié 40 familles et observé des pointes centrotemporales chez 30% des apparentés de premier degré : 33% chez les germains et 20% chez les parents. Ils ont conclu à une transmission autosomale dominante avec pénétrance variable en fonction de l'âge (Bray and Wiser 1965). Des taux identiques ont été rapportés par Heijbel et al.. Quinze pour cent des germains de 19 patients présentaient des crises et des décharges rolandiques et 19% des décharges seules. Onze pour cent des parents avaient une histoire de crise dans l'enfance et 3% des décharges à l'EEG. La conclusion a été la même que les précédents auteurs : transmission autosomale dominante avec pénétrance variable en fonction de l'âge (Heijbel et al. 1975).

Une agrégation familiale substantielle existe pour les convulsions fébriles. Germains ou enfants de probands affectés ont trois à quatre fois plus de risque de faire des CF que des contrôles de populations témoins (Hauser and Anderson 1986). Le groupe de Rich a démontré que dans les familles de sujets ayant présenté plus de trois épisodes convulsifs fébriles, le mode de transmission du trait le plus vraisemblable est un mode autosomal dominant. Ces formes familiales dominantes sont estimées représenter environ 30% de l'ensemble des CF. Pour les autres formes, un mode polygénique est plus vraisemblable (Rich et al. 1987).

L'analyse de ségrégation est une méthode statistique d'analyse de données qui permet de déterminer l'existence et la nature du facteur génétique induisant la transmission d'une maladie.

Spectre phénotypique

Les études familiales et de jumeaux ont mis en évidence l'existence d'un spectre phénotypique spécifique pour différents syndromes épileptiques et présent dans certaines fratries. De plus, ce spectre phénotypique est observé chez les apparentés du cas-index malade plus fréquemment que ne le voudrait le hasard. Il existe aussi un spectre phénotypique chez un même individu malade qui peut présenter différents types de syndromes épileptiques en fonction de son âge.

1.5.2 Etudes de jumeaux

Le principe de ces études est de comparer les taux de concordance, pour un trait donné, chez des jumeaux monozygotes (même patrimoine génétique) et chez les jumeaux dizygotes (environ 50% de leur patrimoine génétique en commun). Les premières études réalisées concernent les EGI dans leur ensemble. En 1980, Tsuboi a réalisé une revue de données antérieures provenant de 6 études (Tsuboi 1980). La concordance globale observée est de 60% pour les paires monozygotes (N = 45) et de 13,2% pour les paires dizygotes (N = 56). Pour l'épilepsie absence ou les épilepsies avec crises généralisées tonico-cloniques, lorsque les sujets étudiés ont entre 6 et 18 ans, la concordance observée chez 12 paires de jumeaux monozygotes est de 100% (Catalano 1973). Ce taux indiquerait donc que le trait est totalement déterminé par les facteurs génétiques. Pourtant, ce faible nombre de paires étudiés laisserait à penser qu'il faut interpréter ce résultat avec prudence. Cependant, la stratégie, consistant à étudier pendant une période donnée l'expression du phénotype dans une population très homogène, est pertinente.

A la fin des années quatre-vingt, d'autres études de jumeaux ont été menées. Ces études ont démontré qu'il existait un impact génétique et un impact environnemental dans le développement d'une épilepsie. En 1987, Tsuboi a fait une analyse génétique d'une population de jumeaux souffrant de CF. Il a calculé un taux de concordance pour les CF chez les jumeaux monozygotes de 56%, alors qu'il n'était que de 14% chez les dizygotes. Puis, il a comparé ces résultats à des cas de frères-sœurs et il a pu en conclure que la similitude des symptômes cliniques intra-paire était plus grande chez les jumeaux concordants que chez les couples frères-sœurs. Cette étude a permis de soutenir l'hypothèse que les CF ont un mode de transmission multifactoriel (Tsuboi 1987). Une année plus tard, une étude menée au Japon, toujours sur des jumeaux

souffrant de CF, a montré un taux de concordance de 85,7% chez les monozygotes contre 16,7% chez les dizygotes. Ces résultats viennent renforcer l'hypothèse du mode de transmission multifactoriel des CF (Sunami et al. 1988).

En 1990, le groupe de Berkovic a rapporté des taux comparables à ceux de Catalano de 1974, en précisant que toutes les paires étaient également concordantes pour le syndrome épileptique. Ainsi, ils ont suggéré que la survenue d'une EGI, mais aussi le type de syndrome, sont déterminés génétiquement (Berkovic et al. 1990).

En 1992, Ottman a publié une étude qui évaluait les contributions environnementales et développementales apportées à l'épilepsie. La prévalence d'une histoire familiale d'épilepsie était plus élevée chez les jumeaux monozygotes que chez les dizygotes de cas-index, mais la prévalence n'était pas significativement plus élevée chez les dizygotes que chez les frères-sœurs. Les conclusions de cette étude suggèrent que la prévalence, plus élevée des épilepsies chez les jumeaux monozygotes de cas-index, pourraient être en partie expliquée par les facteurs environnementaux relatifs à la gémellité, plutôt que par leur identité génétique qui les lie au cas-index (Ottman 1992).

A la fin des années nonante, l'équipe de Berkovic a étudié des jumeaux afin d'évaluer la composante génétique des syndromes épileptiques. Leurs résultats vont dans le même sens que les études précédentes : chez les jumeaux monozygotes, le taux de concordance des crises est plus élevé que chez les dizygotes. La concordance est plus élevée pour les épilepsies idiopathiques et symptomatiques que pour les épilepsies partielles. Ils ont mis en évidence des valeurs intermédiaires pour les CF et les épilepsies indéterminées. La fréquence élevée des monozygotes concordants avec le même syndrome majeur, suggère qu'il existe des déterminants génétiques syndromes-spécifiques avec ou sans prédisposition génétique générale aux crises (Berkovic et al. 1998).

Afin d'évaluer les facteurs étiologiques pouvant intervenir dans le développement d'une épilepsie, le groupe de Briellmann a analysé des jumeaux monozygotes discordants pour l'épilepsie. La principale découverte de cette étude est que la majorité des paires de jumeaux discordants pour l'épilepsie peut être expliquée par des facteurs non-hérités. Ces derniers sont, soit des facteurs environnementaux, soit des anomalies génétiques postérieures à la fécondation. Tous deux interagissent avec le fond génétique du patient. Ces facteurs non-hérités, détectés dans cet échantillon de monozygotes discordants, sont probablement présents dans la population générale de patients souffrant d'épilepsies. Les épilepsies cryptogéniques pourraient peut-être être expliquées par ces facteurs (Briellmann et al. 2001).

Des études récentes ont évalué l'importance des facteurs génétiques et environnementaux dans l'étiologie des CF chez des jumeaux monozygotes et dizygotes. Grâce à un modèle étiologique incluant les effets additifs génétiques et les facteurs environnementaux individu-spécifique, ils ont mis en évidence une héritabilité de 70% pour les CF. Les 30% restant sont donc attribuables aux facteurs environnementaux individu-spécifique (Kjeldsen et al. 2002). La même équipe a fait le même type d'étude sur des jumeaux souffrant d'épilepsies et de crises épileptiques. Ils ont obtenu des résultats similaires qui a confirmé l'implication des facteurs génétiques et environnementaux (Kjeldsen et al. 2003).

Récemment, l'équipe de Vadlamudi a repris les résultats des études de jumeaux de Lennox (cités plus haut) (Lennox 1960) afin de les réévaluer. Pour cela, ils ont classé ces cas selon la classification de l'*International League Against Epilepsy* (ILAE) des épilepsies et syndromes épileptiques, puis ils ont recalculé la concordance des monozygotes et des dizygotes. Comme dans les études précédentes, les facteurs génétiques jouent un rôle prépondérant dans les épilepsies, mais il existe toujours une part liée aux facteurs environnementaux, qui explique la concordance imparfaite des jumeaux monozygotes. Cette discordance peut être expliquée par l'existence de différences épigénétiques chez ces individus. L'épigénétisme est défini comme l'interaction de la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et l'expression des ARN non-codant dans la régulation du motif d'expression des gènes depuis le développement précoce jusqu'à l'âge adulte (Brena et al. 2006). D'ailleurs, pour illustrer la présence de mécanismes épigénétiques chez les jumeaux momozygotes, une étude originale a évalué les différences de méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones chez des paires de jumeaux monozygotes. Elle a montré que ces jumeaux étaient indistinguables durant leurs premières années de vie, mais que par la suite, ils montraient de nettes différences au niveau de la méthylation globale de leur ADN ainsi que de l'acétylation de leurs histones, ce qui, par conséquent, devrait affecter l'expression de leurs gènes (Fraga et al. 2005). Ce genre d'études met en lumière la nature de certains facteurs environnementaux qui peuvent interagir avec le génome d'un individu et ainsi mener ou non à une pathologie à composante héréditaire.

1.5.3 Maladies à hérédité mendélienne associées à une épilepsie

Il existe des maladies génétiques avec des caractéristiques syndrome-spécifiques associées à une épilepsie. Ces maladies sont une nouvelle preuve en faveur d'une composante génétique présente dans l'épilepsie. Voici une description brève de la plupart d'entre elles (Callenbach and Brouwer 1997):

- *La sclérose tubéreuse de Bourneville* est une maladie autosomale dominante avec des désordres cutanés. Elle est caractérisée par un retard mental. Quatre vingt pour-cent des patients souffrant de cette maladie ont des crises épileptiques. L'apparition clinique de l'épilepsie est fortement dépendante de l'âge. Différentes études de liaison ont été réalisées, et deux loci ont été découverts : le premier se trouve sur le chromosome 9q34.3. Il est en déséquilibre de liaison (DL) avec le locus des groupes sanguins ABO (Fryer et al. 1987). Le deuxième locus découvert se trouve sur le chromosome 16p13.3 (Kandt et al. 1992). Au premier locus, des mutations ont été rapportées dans le gène *TSC1* qui code pour la protéine hamartin chez des patients présentant une sclérose tubéreuse sporadique (van Slechtenhorst et al. 1997). Au second locus, il a été identifié des délétions et des mutations dans le gène *TSC4* qui code pour la tubérolin, une protéine avec activité GTPase (1993). Un troisième locus possible sur le chromosome 12q14 a été mis en évidence chez un patient présentant une translocation *de novo* (Fahsold et al. 1991). Mais ce locus a rapidement été exclu par une autre étude (Sampson et al. 1992).

- *La neurofibromatose de type 1 (NF-1)* entraîne des difficultés d'apprentissage ou un retard mental. Les principales caractéristiques associées sont une macroencéphalie, une petite stature et une scoliose. Environ 30% des patients souffrent d'épilepsies. NF-1 est de type autosomal dominant avec une grande pénétrance. Un gène a été localisé sur le chromosome 17q12-22 (Barker et al. 1987 ; Seizinger et al. 1987). Il code pour la protéine neurofibromin qui a une fonction suppresseur de tumeur (Li et al. 1992). Il existe second type de neurofibromatose, NF-2, dont le locus se trouve sur le chromosome 22q12.2 (Wertelecki et al. 1988). Le gène impliqué dans cette maladie est code aussi pour la protéine merlin qui a aussi une fonction suppresseur de tumeur (Trofatter et al. 1993).

- *Le syndrome de l'X fragile* entraîne une diminution intellectuelle, variant de moyenne à sévère avec des anomalies physiques, tels qu'un visage allongé, de larges oreilles et une stature légèrement petite. Ces patients souffrent souvent de crises épileptiques et elles sont comparables à celles observées dans l'épilepsie rolandique. Ce syndrome est autosomal récessif avec une pénétrance incomplète. Il est causé par une expansion de répétitions CGG dans le gène

retard mental de l'X-fragile (*FMR-1*) localisé sur le chromosome Xq27.3 (Krawczun et al. 1985 ; Verkerk et al. 1991).

▪ *Le syndrome d'Angelman* se caractérise par des crises épileptiques, des anomalies à l'EEG, un retard mental, des rires inappropriés et un profond retard dans le langage. L'épilepsie peut apparaître pendant l'enfance sous presque n'importe quelle forme de crises. A l'âge adulte, les absences atypiques et les crises myocloniques prévalent. La majorité des patients adultes souffrent d'épilepsie. Ce syndrome est causé par une délétion sur le chromosome 15q12 (Pembrey et al. 1989) d'origine maternelle dans une région qui englobe les gènes pour les sous-unités du récepteur GABA(A) : $\beta 3$ (Wagstaff et al. 1991), $\alpha 5$ (Knoll et al. 1993), et $\gamma 3$ (Greger et al. 1995). Plus récemment, d'autres mutations responsables du syndrome d'Angelman, ont été découvertes dans le gène codant pour l'ubiquitine-protéine ligase E6-AP (*UBE3A*) (Kishino et al. 1997). Ces mutations pourraient amener à une dégradation anormale de la protéine médiée par l'ubiquitine pendant le développement du cerveau chez des patients atteints du syndrome d'Angelman.

1.5.4 Anomalies chromosomiques

Une revue récente fait état des différentes anomalies chromosomiques liées à une épilepsie (Singh et al. 2002). Des régions chromosomiques aberrantes associées à des crises épileptiques ont été identifiées. Voici les principales d'entre-elles :

▪ *La délétion du bras long du chromosome 1* où les crises apparaissent généralement pendant les trois premières années de la vie. Différents types de crises peuvent survenir chez les malades, telles que des crises généralisées, des convulsions fébriles et afebriles et des crises partielles complexes. D'autres caractéristiques peuvent apparaître, comme une microencéphalie, un sévère retard ou encore une posture anormale (Murayama et al. 1991).

▪ *La délétion du bras court du chromosome 1*, dont la principale composante du phénotype est l'apparition de crises telles que des crises simples, partielles complexes, myocloniques et générales tonico-cloniques (Knight-Jones et al. 2000 ; Shapira et al. 1997)

▪ *Le syndrome de Wolf-Hirschhorn* est fortement associé à l'épilepsie. Il se caractérise par une délétion du chromosome 4p (Fang et al. 1997). La plupart des cas sont des épilepsies réfractaires avec des crises de type généralisées tonico-cloniques, des spasmes toniques, des crises myocloniques et des absences atypiques. D'autres caractéristiques peuvent être trouvées chez le patient, tels qu'une microencéphalie ou un retard mental sévère. Dans la plupart des cas, la

mort survient durant la petite enfance. Par conséquent, la survie jusqu'à l'âge adulte ne s'observe qu'exceptionnellement.

- *L'anneau du chromosome 14* est strictement associé à l'épilepsie. Ainsi, les crises sont la caractéristique principale de cette maladie (Ieshima et al. 1983). Ces crises commencent pendant l'enfance et sont incurables. Elles sont de différents types : crises généralisées tonico-cloniques, myoclonies, crises « mineures-moteur », crises partielles complexes et attaques généralisées secondaires. Le patient peut aussi présenter une atrophie cérébrale, une dilatation ventriculaire, une hypotonie généralisée, ainsi qu'une ataxie.

- *Le syndrome d'Angelman* est provoqué par une délétion du chromosome 15, comme décrit précédemment.

- *Le syndrome de Miller-Dieker* est provoqué par une délétion subterminale du chromosome 17 (del(17)(p13)). Il est caractérisé par un développement anormal et sévère au niveau cortical. Les crises commencent généralement durant la première année de vie, mais rarement pendant la période néonatale (Dobyns et al. 1993 ; Gastaut et al. 1987). D'autres formes généralisées d'épilepsie peuvent être aussi présentes, telles que des crises myocloniques, toniques et tonico-cloniques. Des crises partielles sont parfois aussi décrites. Les patients peuvent présenter une infirmité intellectuelle avec une diplégie atonique et une microencéphalie. Seule une minorité de patients survivent jusqu'à l'âge adulte.

- *L'anneau du chromosome 20* est aussi strictement associé à l'épilepsie (Brandt et al. 1993 ; Porfirio et al. 1987). Le patient présente de fréquents épisodes d'absence atypique et de rares crises motrices (Petit et al. 1999). L'âge de début des crises va de l'enfance à l'âge de 14 ans. Ces crises sont résistantes à tout traitement médicamenteux. Certains patients présentent un statut non-convulsif répété. Ceci consiste en des périodes prolongées de confusion, marquées par des difficultés à s'exprimer et des automatismes complexes. De telles attaques peuvent se produire quotidiennement. Les crises-moteur toniques sont aussi fréquentes. L'intellect est généralement moyennement déficient à normal.

- *Le syndrome de Down* engendre beaucoup d'anomalies mineures et majeures de nature fonctionnelle, neurologique et anatomique, telle qu'un faciès particulier. La principale caractéristique est neurologique et se traduit sous forme d'un retard mental modéré et d'une hypotonie centrale. Environ 8% des patients développent une épilepsie, souvent accompagnée de crises généralisées tonico-cloniques. Le syndrome de Down est causé par une copie surnuméraire du chromosome 21. Dans la plupart des cas, cette copie supplémentaire est issue d'une non-disjonction méiotique d'origine maternelle. Seul un faible pourcentage est causé par une translocation chez un des parents. La cause de la prévalence des épilepsies chez les

patients atteints du syndrome de Down n'a pas encore été découverte. Le gène pour l'épilepsie de type Unverricht-Lundborg, qui est une épilepsie généralisée symptomatique, a été localisé à l'intérieur de la région critique pour le syndrome de Down (Lehesjoki et al. 1991 ; Virtaneva et al. 1996). Malgré cela, aucune évidence ne permet de démontrer que ce gène provoque l'épilepsie chez des patients souffrant de trisomie 21. Aujourd'hui, grâce aux progrès de la médecine, les malades souffrant du syndrome de Down vivent plus longtemps. Cette catégorie de patients développent parfois une épilepsie myoclonique sénile associée à un déclin mental (De Simone et al. 2006).

1.5.5 Modèles animaux avec symptômes épileptiques spontanés

Il existe des modèles animaux présentant spontanément une épilepsie d'origine génétique. Ils sont une nouvelle preuve de l'existence d'une composante génétique dans les épilepsies. De plus, ils sont utiles pour étudier la physiopathologie de l'épilepsie ainsi que les facteurs de l'épileptogénèse.

- *Les rats GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg)* (Marescaux and Vergnes 1995 ; Marescaux et al. 1992) présentent des crises généralisées non-convulsives récurrentes, caractérisées par des décharges pointes-ondes bilatérales et synchrones accompagnées d'un arrêt du comportement et d'un regard fixe. Ces événements ont un début et une fin abruptes. Les médicaments, efficaces contre les absences humaines, suppriment les décharges pointe-ondes avec la dose-dépendante correspondante, alors que les substances, spécifiques aux convulsions ou aux crises focales, sont inefficaces chez le rat GAERS. Les décharges pointe-ondes sont déterminées génétiquement avec un mode de transmission autosomal dominant. L'expression variable des décharges pointe-ondes, dans la descendance de rats GAERS, ainsi que chez les animaux croisés pour le contrôle réciproque, est sûrement due à l'existence de gènes multiples impliqués dans ce type de modèle. Le mécanisme de l'absence étant encore mal compris chez l'humain, l'analyse du dysfonctionnement génétique thalamo-cortical chez les rats GAERS a permis d'établir des investigations sur la pathogénèse des crises généralisées non-convulsives.

- *Les singes Pappio pappio* (Menini et al. 1994) sont caractérisés par une épilepsie photosensible provoquée par une SLI. Lorsque ces singes y sont soumis, l'EEG enregistre une décharge bilatérale et synchrone qui occupe une large partie des territoires corticaux. Ces décharges paroxystiques apparaissent en premier lieu dans la partie frontale des régions corticales. Elles sont associées à des sauts myocloniques bilatéraux et synchrones. Cet

événement peut être suivi de crises convulsives généralisées ressemblant à des crises grand mal de patients humains. Cette forme d'épilepsie peut être considérée comme une « épilepsie primaire généralisée » rencontrée chez des patients épileptiques qui ne présentent aucun déficit neurologique ni aucun facteur étiologique évident. Par la suite, il a été découvert que certains singes *Papio papio* présentent naturellement une seconde sorte de myoclonies avec des caractéristiques complètement différentes de celles induites par SLI. Ces myoclonies sont spontanées et symétriques. Les sursauts synchrones impliquent la plupart du temps la musculature du tronc. L'apparition de ces crises est facilitée par des mouvements actifs de l'animal ou par des stimulations proprioceptives, telle que l'application d'une pression sur le sternum ou par une tension appliquée à un membre. Ces myoclonies spontanées, contrairement aux précédents, s'arrêtent quand l'animal cesse tout mouvement ou quand il se trouve dans les premiers stades de sommeil. Les singes *Papio papio* peuvent donc présenter deux différentes pathologies : une prédisposition naturelle à faire des myoclonies sans accompagnement de décharges paroxysmales corticales et jamais suivies de crises et une prédisposition génétique héréditaire à faire des myoclonies suivies secondairement par des crises généralisées induits par SLI.

1.6 Les avancées en génétique des épilepsies

La révolution dans le domaine de la biologie moléculaire, ainsi que les données collectées par le *Human Genome Project* ont permis d'explorer plus en profondeur les bases génétiques de l'épilepsie. Les premières études moléculaires ont été réalisées à la fin des années quatre-vingt. A cette époque, seules les formes pures étaient étudiées, c'est-à-dire, celles décrites par la classification internationale. Et aucune investigation n'était faite sur des épilepsies avec plusieurs syndromes, telles que les GEFS⁺. Il est important de distinguer deux types de transmissions génétiques au sein des épilepsies : les épilepsies à hérédité mendélienne ou monogéniques simples et les épilepsies à hérédité complexes ou polygéniques.

1.6.1 Les épilepsies à hérédité mendélienne ou monogéniques simples

Ces épilepsies sont causées par une mutation dans un gène. Cette dernière peut, à elle seule, déterminer l'apparition de la maladie. Ainsi, le gène impliqué a un effet majeur et ce type d'épilepsies est rare.

Epilepsies myocloniques progressives (EMP)

Ces epilepsies sont caractérisées par des crises tonico-cloniques, des myoclonies et un dysfonctionnement neurologique progressif, incluant la démence et l'ataxie. Les EMP sont considérées comme une maladie sévère. Elles sont classées dans les epilepsies généralisées symptomatiques.

- *La maladie d'Unverricht-Lundborg* est un syndrome caractérisé par un âge de début se situant entre 6 et 15 ans. Il évolue en quelques années vers un état invalidant avec une mortalité se situant entre 25 et 30 ans. Cette épilepsie est caractérisée par des secousses myocloniques associées à des crises convulsives généralisées, à une ataxie et parfois à une détérioration intellectuelle. Le cerveau de ces patients montre des changements dégénératifs ainsi qu'une perte significative des cellules de Purkinje. Cette maladie a été décrite pour la première fois par Unverricht chez des patients estoniens en 1891 (Unverricht 1891) et secondairement par Lundborg chez des cas suédois (Lundborg 1903). La maladie d'Unverricht-Lundborg est une maladie relativement commune en Finlande (Koskiniemi et al. 1974) et a tout d'abord porté la désignation de *myoclonus baltique* (Koskiniemi 1986). Mais ce terme fut vite considéré comme inapproprié, car ses différents syndromes étaient les mêmes que ceux rapportés dans le *myoclonus méditerranéen* (Genton et al. 1990). Au début des années nonante, une équipe finlandaise a réalisé une analyse de liaison dans douze familles avec un mode de transmission autosomal récessif. Ils ont identifié le locus *EPM1* sur le chromosome 21 (21q22.3) (Lehesjoki et al. 1991). Durant la même période, Malafosse et coll. ont effectué une analyse de linkage qui a montré que les myoclonus baltique et méditerranéen étaient liés à un même marqueur sur le chromosome 21. Les auteurs ont alors proposé l'hypothèse suivante : le myoclonus baltique et le myoclonus méditerranéen devraient être certainement causés par des mutations situées dans le même gène (Malafosse et al. 1992b). A l'heure actuelle, les termes de myoclonus baltique et méditerranéen sont inappropriés, car cette maladie existe dans le monde entier et est connue sous le nom de *maladie d'Unverricht-Lundborg*. C'est en 1996, par clonage positionnel que le gène muté causant la maladie a été identifié. Il code pour la cystatine B (*CSTB*), qui est un inhibiteur de protéase cystéine non-caspase. Cette protéine est exprimée ubiquitairement (Pennacchio et al. 1996). Une année plus tard, Lalioti et coll. ont mis en évidence diverses mutations de *CSTB* chez des patients atteints de la maladie, dont une expansion d'un dodécamère dans la région 5' UTR non-transcrite du gène. Les allèles normaux présents chez les personnes saines contiennent 2 à 3 copies (Lalioti et al. 1997a), alors que cette répétition est présente à plus de 60 copies chez les cas atteints de la maladie d'Unverricht-Lundborg (Lalioti et al. 1997b). Cette expansion peut interrompre la

transcription, amenant à une réduction de l'expression de *CSTB*. Cette déficience en *CSTB* pourrait provoquer l'échec de l'inactivation de certaines protéases intracellulaires et mener à une dégénérescence neuronale (Pennacchio et al. 1996).

- *La maladie de Lafora* est un autre type d'épilepsie myoclonique progressive. Dans ce cas, le diagnostic positif est posé par la mise en évidence de corps de Lafora dans les glandes sudoripares axillaires. Ces corps de Lafora sont aussi retrouvés dans divers tissus, tels que la peau, les muscles striés et le cerveau. Le décès survient seulement quelques années après le début de la maladie. La transmission est aussi de type autosomal récessif. Un locus sur le chromosome 6q24 a été mis en évidence (Serratos et al. 1995), puis le gène *EPM2A* a été identifié comme étant impliqué dans cette maladie. Ce gène code pour une enzyme tyrosine phosphatase intracellulaire appelée *laforine* (Minassian et al. 1998). Cette protéine est exprimée dans de nombreux tissus, dont le cerveau (Bate and Gardiner 1999). Chez certains patients, aucune mutation dans le gène *EPM2A* n'a été trouvée, par conséquent, Chan et coll. ont mis en évidence un nouveau locus pour la maladie de Lafora, *EPM2B*. A l'intérieur de ce locus, ils ont identifié un gène qui code pour la sous-unité E3 maline de l'ubiquitine ligase, *NHLRC1* (Chan et al. 2003). Différentes mutations ont été mises en évidence chez des patients souffrants de la maladie de Lafora (Chan et al. 2003 ; Gomez-Abad et al. 2005 ; Singh et al. 2006).

- *Les céroïdes-lipofuscinoses* font partie du groupe des EMP et sont caractérisées par des dépôts de lipopigments dans le cerveau et d'autres organes. Il existe 10 sous-types, dont les caractéristiques cliniques communes sont une diminution progressive des fonctions cognitives, motrices et visuelles, des crises épileptiques et une mort rapide. La transmission est autosomale récessive sauf pour la forme adulte, ou maladie de Kuff. Il existe une *forme infantile précoce* ou maladie de Santavuori-Haltia, dont le locus est en 1p32 (Hellsten et al. 1993) et le gène responsable, *CLN1*, code pour une palmitoyl thioestérase (Vesa et al. 1995). La *forme infantile tardive* ou maladie de Jansky-Bielschowski est provoquée par la délétion du gène *CLN2* au locus 11p15 qui code pour une protéine lysosomale (peptidase) (Sleat et al. 1997). Une variante finlandaise de la forme infantile tardive est liée au gène *CLN5*, qui code pour une protéine membranaire et sa position se trouve au locus 13q21-11.32 (Savukoski et al. 1994). La localisation de la *forme juvénile* ou maladie de Batten-Spielmeyer-Vogt a été rapportée au locus *CLN3* sur le chromosome 16p12.1-11.2 (Mitchison et al. 1995). Le locus *CLN4* de la *forme adulte* ou maladie de Kuff n'a pas encore été identifié.

- *La maladie de Gaucher de type 3* est une EMP avec une transmission autosomale récessive. Un déficit en enzyme β -glucocérébrosidase provoque une accumulation de

lysosomes dans différents organes. Le locus incriminé se trouve sur le chromosome 1q21.31 (Barneveld et al. 1983).

▪ *L'encéphalomyopathie mitochondriale avec « ragged-red-fibres » (MERRF)* est héréditaire et peut débuter à tout âge. La transmission de cette maladie est exclusivement maternelle, car c'est une maladie mitochondriale caractérisée par une EMP, une myopathie mitochondriale, une ataxie, une surdité et une détérioration mentale. Des *ragged-red-fibres* (ou accumulation de mitochondries) sont présentes dans des biopsies de muscles squelettiques. Il existe une mutation ponctuelle du gène codant pour l'ARNt(lys) présent dans l'ADN mitochondrial en position 8344, où une adénine est remplacée par une guanine (Shoffner et al. 1990). C'est une mutation hétéroplasmique, dont la proportion d'ADN mutant peut varier à l'intérieure d'une même famille, voire parmi les tissus d'un même individu. Cette mutation cause la terminaison prématurée de la translation des ARNm mitochondriaux et par conséquent, réduit la synthèse polypeptidique (Bate and Gardiner 1999).

Epilepsies idiopathiques

Comme toutes les maladies communes, les épilepsies idiopathiques présentent rarement une hérédité monogénique simple. La plupart d'entre elles sont dues à une hérédité multifactorielle, incluant l'interaction de différents gènes les uns avec les autres, ainsi qu'avec des facteurs environnementaux. Mais pourtant, parmi ces syndromes communs à hérédité complexe, une hérédité monogénique peut être observée dans quelques familles. La collecte de telles familles peut être particulièrement intéressante pour l'identification de gènes de susceptibilité, ce qui a été le cas pour deux rares épilepsies idiopathiques monogéniques :

▪ *Les convulsions néonatales familiales bénignes (CNFB)* sont une épilepsie idiopathique autosomale dominante rare avec une pénétrance incomplète (90%). De plus, l'histoire familiale des patients révèle souvent des crises néonatales bénignes chez d'autres membres de la famille (Miles and Holmes 1990). La première localisation pour CNFB a été trouvée sur le bras long du chromosome 20 en position 20q13.2 (Leppert et al. 1989). En 1992, l'équipe de Malafosse a confirmé la localisation génique des CNFB dans des familles françaises (Malafosse et al. 1992a). Le deuxième locus pour CNFB a été découvert sur le chromosome 8q (Lewis et al. 1993). En 1998, deux équipes indépendantes ont identifié, au locus 20q13.2, le gène *KCNQ2* lié aux CNFB (Biervert et al. 1998 ; Singh et al. 1998). Il code pour un canal potassique. Dans le même temps, un autre gène, lié aux CNFB, a été mis en évidence au locus 8q. Pour ce faire, les auteurs de cette découverte ont recherché s'il existait un homologue à *KCNQ2* dans la

région candidate 8q. Ils ont alors identifié un gène codant pour un autre canal potassique, *KCNQ3*, dans lequel une mutation faux sens coségrège avec le phénotype CNFB (Charlier et al. 1998).

- *L'épilepsie frontale nocturne autosomique dominante* (EFNAD) est caractérisée par de brèves crises motrices nocturnes, qui se passent durant la phase de sommeil léger. L'âge de début est variable et va de l'enfance à l'âge adulte. Une généralisation secondaire de la crise avec perte de conscience peut arriver (Steinlein 1999). Le premier locus lié à EFNAD a été découvert sur le chromosome 20q13.2-q13.3 (Phillips et al. 1995). Puis des mutations dans le gène *CHRNA4*, se trouvant dans la région candidate, ont été rapportées dans des familles atteintes de la maladie (Steinlein et al. 1997 ; Steinlein et al. 1995). Un second locus a été lié au chromosome 15q24 dans une seule famille (Phillips et al. 1998). Cette région est proche du cluster de gènes *CHRNA3/CHRNA5/CHRNA4*, qui ont été screenés, mais aucune mutation n'a été trouvée. A ce jour, aucun gène causatif d'EFNAD n'a été trouvé au locus 15q24 (Gourfinkel-An et al. 2004).

1.6.2 Les épilepsies à hérédité complexe ou polygéniques

La plupart des épilepsies à hérédité complexe sont causées par l'interaction de quelques variants géniques, lesquels ne sont pas suffisants pour causer à eux-seuls le phénotype épileptique. Des facteurs environnementaux ont aussi une influence sur ce phénotype. Ainsi, le ou les facteurs génétiques ne sont que de prédisposition. Les principaux problèmes associés à la dissection génétique des traits complexes sont : la pénétrance incomplète, les phénocopies, l'hétérogénéité génétique et l'hérédité polygénique. Mais malgré tout, dans un premier temps, les études familiales sont restées les plus utiles dans la mise en évidence de gènes impliqués dans les épilepsies à hérédité complexe. En voici deux exemples :

- *L'épilepsie myoclonique juvénile* (EMJ) est une épilepsie idiopathique généralisée. En 1988, l'équipe de Greenberg est la première à avoir utilisé l'analyse de liaison génétique en épileptologie. Ce groupe a découvert un locus de prédisposition pour les EMJ localisé sur le chromosome 6p, dans la région HLA. Ce résultat a été la première analyse de liaison génétique qui a mis en évidence un locus de susceptibilité pour une épilepsie particulière (Greenberg et al. 1988). Si les premières études de linkage ont été effectuées sur cette maladie, c'est parce que cliniquement, l'EMJ est facilement distinguable des autres formes d'épilepsies idiopathiques généralisées. En 1991, deux équipes ont confirmé le linkage de l'EMJ à la position 6p (Durner et al. 1991 ; Weissbecker et al. 1991). Pourtant, par la suite, deux équipes ont réfuté la localisation sur le chromosome 6p d'un locus de susceptibilité aux EMJ (Elmslie et al. 1996 ;

Whitehouse et al. 1993). L'une de ces deux équipes a été à l'origine de la découverte du nouveau locus sur le chromosome 15q14. Dans cette région chromosomique se trouve le gène qui code pour la sous-unité $\alpha 7$ du récepteur neuronal acétylcholine nicotinique (*CHRNA7*). D'après leurs conclusions, ce locus jouerait un rôle majeur dans la susceptibilité génétique de l'EMJ (Elmslie et al. 1997). Récemment, dans cette région, un SNP (*single nucleotide polymorphism*) dans le gène *Connexin36* a été identifié dans une cohorte de patients EMJ comme étant statistiquement fréquent que chez les témoins (Mas et al. 2004). Un troisième locus de susceptibilité pour l'EMJ a été découvert sur le chromosome 5q34 dans une grande famille franco-canadienne. Mais surtout, un nouveau gène muté a été mis en évidence dans cette famille : *GABRA1* qui code pour la sous-unité $\alpha 1$ du récepteur GABA de sous-type A (Cossette et al. 2002). Un autre gène de susceptibilité pour l'EMJ, *BRD2* (*RING3*), a été mis en évidence par une étude d'association. Ce gène se trouve dans la région HLA du chromosome 6 et code pour un régulateur transcriptionnel nucléaire probable. Il fait parti d'une famille de gènes exprimés durant le développement (Pal et al. 2003a). Un quatrième locus de susceptibilité a été trouvé sur le chromosome 5q12-q14 dans une famille indienne. A ce jour, aucun gène de susceptibilité n'a été découvert dans cette région chromosomique (Kapoor et al. 2007). Etant donné que l'EMJ possède visiblement un mode d'hérédité complexe, il est possible que ces différents gènes de susceptibilité sont des gènes à effet mineur.

- *L'épilepsie absence de l'enfant (EAE)* possède une composante génétique. Néanmoins, le mécanisme héréditaire et les gènes impliqués sont encore inconnus. Les études familiales menées ont souligné un mode de transmission complexe de la maladie. Pourtant, une analyse de ségrégation a montré une transmission de la maladie selon le modèle autosomal dominant avec une pénétrance réduite (Buoni et al. 1998). Une analyse de liaison dans une famille de patients affectés par une forme d'EAE a montré une liaison au locus 8q24 (Fong et al. 1998). Mais aucun gène n'a pu être identifié (Sugimoto et al. 2000). L'étude d'une autre famille dont les membres affectés souffrent non seulement d'EAE, mais aussi de CF, a mis en évidence une liaison au chromosome 5, contenant le cluster de gènes qui codent pour les sous-unités du récepteur GABA(A) (Wallace et al. 2001). Une mutation a été trouvée dans le gène *GABRG2* et semble contribuer au phénotype de la maladie (Baulac et al. 2001a). Une autre analyse de liaison dans huit familles semble suggérer une liaison au gène *GABRB3* se trouvant à la position 15q11-q13 (Tanaka et al. 2000) qui est précisément la région délétée dans le syndrome d'Angelman. Une étude a testé si les gènes codant pour les sous-unités du récepteur GABA(A), les récepteurs GABA(B) et les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants du cerveau, ainsi que les gènes candidats se trouvant dans la région 8q24 pouvaient être impliqués dans l'EAE. Pour cela, une analyse par

linkage a été menée dans 33 familles nucléaires. Vingt-sept des vingt-neuf gènes testés de la région 8q24 ont été exclus comme étant le locus majeur de l'EAE dans ces familles. Des évidences de liaison ont été observées pour *CACNG3* sur le chromosome 16p12-p13.1 codant pour un canal Ca^{2+} voltage-dépendant ainsi que pour un cluster de gènes codant pour des sous-unités du récepteur GABA(A), *GABRA5*, *GABRB3*, *GABRG3*, se situant sur le chromosome 15q11-q13. Un haplotype particulier du promoteur de *GABRB3* a été retrouvé associée à l'EAE dans une étude de trios (Urak et al. 2006). Ce résultat renforce le précédent résultat qui proposait *GABRB3* comme un candidat potentiel au développement de l'EAE. Une autre étude a fait de même en montrant que plusieurs variants du gène *CACNG3* ont été retrouvés statistiquement associés à la maladie dans des familles nucléaires de patients EAE (Everett et al. 2007b). Trois études chinoises ont montré une association positive entre l'EAE et des variants du gène *CACNA1H*, qui code pour la sous-unité du canal calcique ($\text{Ca}_v3.2$) (Chen et al. 2003 ; Liang et al. 2007 ; Liang et al. 2006). Récemment, un polymorphisme non-synonyme dans le gène *CLCN2*, qui code pour un canal chlore exprimé dans le cerveau, a été trouvé associé à l'EAE dans une cohorte de familles nucléaires (Everett et al. 2007a). Par conséquent, tout comme pour l'EMJ, la combinaison des variants génétiques découverts dans ces différents gènes de susceptibilité pourrait avoir un effet majeur sur le phénotype des malades.

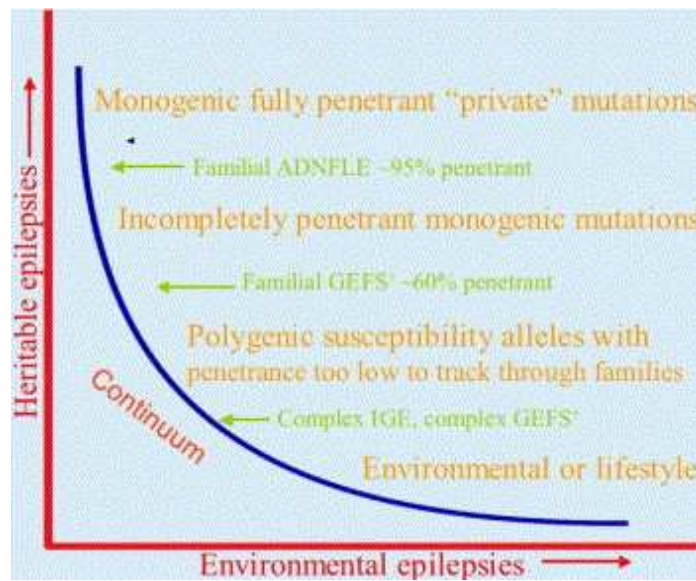
1.7 La génétique des épilepsies

1.7.1 Les épilepsies généralisées idiopathiques (EGI)

Environ 30% des patients épileptiques présentent une cause acquise, tels qu'un traumatisme crânien, une attaque, une tumeur ou encore une lésion congénitale (Annegers 1996). Les 70% restant sont des cas définis d'un point de vue clinique et électroencéphalographique comme des épilepsies « idiopathiques », où les facteurs génétiques sont la cause apparente, tout comme d'autres syndromes moins bien définis (Heron et al. 2007). Parmi elles, les EGI sont caractérisées par des crises généralisées récurrentes. De plus, ces crises généralisées ont une expression EEG généralisée, bilatérale, synchrone avec des décharges symétriques.

Comme décrit dans le chapitre précédent, il existe des EGI monogéniques, qui sont clairement génétiques, et des formes complexes, qui comportent des composantes polygéniques et environnementales. Il existe en fait un continuum allant des épilepsies monogéniques avec pénétrance complète, à celles à composante environnementale prédominante. Ceci a été illustré par l'équipe d'Heron (Heron et al. 2007) (*Figure 5*).

Figure 5 Représentation du continuum entre les EGI monogéniques pures et les EGI environnementales pures (Heron et al. 2007)



Une des difficultés dans l'étude de la génétique des EGI est la variabilité du phénotype. Par exemple, un patient atteint d'EGI, avec un âge de début durant l'adolescence, est susceptible de présenter une épilepsie myoclonique juvénile, avec ou sans absence à l'adolescence et/ou crise tonico-clonique généralisée. Ces syndromes montrent l'existence évidente de chevauchements entre les différents types de crises. De plus, les membres de la famille, d'un patient atteint d'une EGI, ont un risque important de souffrir eux aussi d'une EGI, mais cette dernière diffère souvent de celle du cas-index. A l'heure actuelle, la relation qui existe entre les syndromes des différentes EGI, au niveau du phénotype/génotype, reste inconnue. L'équipe de Durner a énoncé une hypothèse : « il pourrait exister un gène commun à toutes ces formes d'épilepsies, et d'autres gènes seraient nécessaires à l'expression de la maladie, ainsi qu'à la différenciation en syndromes épileptiques spécifiques » (Durner et al. 2001). Une autre hypothèse à prendre en considération est la suivante : un gène spécifique pourrait être impliqué dans un syndrome particulier et pas dans un type d'épilepsie particulière, car cette dernière peut présenter plusieurs syndromes.

La plupart des gènes impliqués dans les EGI ont été identifiés dans des formes familiales où les phénotypes sont similaires à ceux des EGI courantes. Bien que la plupart des syndromes épileptiques familiaux montrent une hérédité autosomale dominante, celle-ci n'est pas observée dans les EGI communes. Cependant, les similitudes cliniques entre EGI à hérédité mendéliennes et à hérédité complexe permettent de penser qu'il existe aussi une composante génétique dans ces dernières (Hirose et al. 2005). De plus, les gènes découverts grâce aux formes familiales ont une importance potentiellement grande, car ils sont impliqués dans une large gamme de désordres épileptiques et de types de crises, tout comme dans des syndromes rares (Gourfinkel-An et al. 2004).

Il est apparu à la fin des années nonante que les EGI à hérédité mendéliennes pouvaient appartenir à la famille des canalopathies (Sander et al. 2000). Ces dernières sont des maladies dues à des dysfonctionnements de canaux ioniques qui provoquent, dans des tissus excitables, un dérangement périodique de la fonction rythmique (Gargus 2003).

Un article de revue de 2007 dresse une liste chronologique des différents gènes connus jusque-là et impliqués dans les EGI humaines. Il y est fait état de 19 gènes impliqués dans 14 syndromes d'EGI : les premières découvertes de *CHRNA4*, *KCNQ2*, *KCNQ3* et *SCN1B* ont établi les bases des canalopathies. Elles ont été renforcées par les épilepsies monogéniques avec *SCN1A*, *CHRNA2*, *GABRG2*, *SCN2A*, *GABRA1*, *CLCN2* et *CHRNA2*, mais aussi grâce à des gènes codant pour des protéines qui participent au fonctionnement de canaux ioniques, *LGII* et *EFHC1*, où la relation au transport d'ions est peu claire. Le concept de canalopathies a été étendu aux EGI à hérédité complexe grâce à l'identification des gènes de susceptibilité suivant : *CACNA1H*, *GABRD*, *KCND2* et *GABRB3* (Heron et al. 2007) (*Table 3*).

Table 3 Gènes de susceptibilité pour les EGI monogéniques et complexes
(Heron et al. 2007)

Gene ^{a)}	Syndrome ^{b)}	Year of Discovery
Monogenic channelopathies:		
<i>CHRNA4</i>	ADNFLE	1995
<i>KCNQ2</i>	BFNS	1998
<i>KCNQ3</i>	BFNS	1998
<i>SCN1B</i>	GEFS ⁺	1998
<i>SCN1A</i>	GEFS ⁺ /(SMEI)	2000/(01)
<i>CHRNA2</i>	ADNFLE	2000
<i>GABRG2</i>	CAE/FS/GEFS ⁺	2001
<i>SCN2A</i>	GEFS ⁺ ?/BFNIS	2001/02
<i>GABRA1</i>	ADJME, CAE	2002/06
<i>CLCN2</i>	IGE	2003
<i>CHRNA2</i>	ADNFLE	2006
Monogenic, closely aligned with channelopathies:		
<i>LGII</i>	ADPEAF	2002
Monogenic, relationship to ion transport unclear:		
<i>EFHC1</i>	JME	2004
Monogenic, associated with other paroxysmal disorders:		
<i>CACNA1A</i>	CPS, GTCS	2004
<i>ATPIA2</i>	BFIS	2003
Complex, components of polygenic channelopathies:		
<i>CACNA1H</i>	CAE, IGE	2003/04
<i>GABRD</i>	IGE, GEFS ⁺	2004
<i>KCND2</i>	TLE	2006
<i>GABRB3</i>	CAE	2006

^{a)} Genes: *CHRNA4*, acetylcholine receptor subunit, $\alpha 4$; *KCNQ2/KCNQ3*, potassium channel subunits; *SCN1B*, sodium channel $\beta 1$ subunit; *SCN1A*, sodium channel $\alpha 1$ subunit; *CHRNA2*, acetylcholine receptor subunit, $\beta 2$; *GABRG2*, GABA_A receptor subunit $\gamma 2$; *SCN2A*, sodium channel $\alpha 2$ subunit; *GABRA1*, GABA_A receptor subunit $\alpha 1$; *CLCN2*, chloride channel gene 2; *CHRNA2*, acetylcholine receptor subunit $\alpha 2$; *LGII*, leucine-rich, glioma inactivated 1 gene; *EFHC1*, protein with an EF-hand motif; *CACNA1A*, α subunit of the P/Q type Ca²⁺ channel; *ATPIA2*, $\alpha 2$ subunit of the Na⁺/K⁺ transporting ATPase; *CACNA1H*, Ca_v3.2 T-type Ca²⁺ channel; *GABRD*, GABA_A receptor subunit δ ; *KCND2*, K_v4.2 α subunit voltage/gated potassium channel of the shal subfamily; *GABRB3*, GABA_A receptor subunit $\beta 3$.

^{b)} Syndromes: ADNFLE, autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy; BFNS, benign familial neonatal seizures; GEFS⁺, generalized epilepsy with febrile seizures plus; SMEI, severe myoclonic epilepsy of infancy; CAE, childhood absence epilepsy; FS, febrile seizures; BFNIS, benign familial neonatal-infantile seizures; ADJME, autosomal dominant juvenile myoclonic epilepsy; IGE, idiopathic generalized epilepsy; ADPEAF, autosomal dominant partial epilepsy with auditory features; JME, juvenile myoclonic epilepsy; CPS, complex partial seizures; GCTS, generalized tonic-clonic seizures; TLE, temporal lobe epilepsy.

L'approche privilégiée des premières études de génétique des épilepsies se basait sur les syndromes épileptiques décrits par la classification internationale. Mais vers la fin des années

nonante, il a été découvert une famille particulière qui ne correspondait à aucune catégorie de la CIESE (*Figure 6*). C'est ainsi qu'a été reconnu un nouveau syndrome nommé Epilepsie Généralisée avec Convulsions Fébriles Plus (*Generalized epilepsy with febrile seizures plus*, GEFS⁺) (Scheffer and Berkovic 1997).

1.7.2 Les épilepsies généralisées avec convulsions fébriles plus (Generalized epilepsy with febrile seizures plus – GEFS⁺)

Comme évoqué ci-dessus, la grande famille, avec épilepsies généralisées et convulsions fébriles, décrite par le groupe de Scheffer a mis en évidence deux problèmes posés par la CIESE de 1989. Premièrement, certains phénotypes observés dans cette famille ne correspondent pas à ceux décrits par la classification internationale, en particulier les épilepsies généralisées associées aux convulsions fébriles. Deuxièmement, la CIESE est conçue pour diagnostiquer uniquement un individu et pas une famille dans son ensemble, où il est possible d'observer des phénotypes hétérogènes.

Selon la classification de 1989, comme décrit précédemment, les CF sont limitées à la petite enfance (1 à 5 ans). Elles sont associées à un épisode de fièvre et à un risque peu élevé d'épilepsies à début plus tardif. Pourtant, Scheffer *et al* ont décrit de nouveaux phénotypes liés aux CF grâce à cette famille particulière. Cette dernière est originaire du Royaume-Uni. Des mariages entre consanguins sont survenus à plusieurs reprises, mais leur nature est incertaine. Les auteurs ont désigné un « *noyau familial* » qui a immigré en Australie. Dans ce noyau, seuls deux phénotypes ont pu être décrit grâce à la CIESE : l'épilepsie myoclonique-astatique (EMA) et les CF. Les quatre autres phénotypes, touchant 15 malades sur 18, ne pouvaient pas être décrits par la CIESE.

Voici ces nouveaux phénotypes :

(1) les convulsions fébriles plus (*febrile seizure plus*, FS⁺) est le phénotype le plus commun de la famille. C'est un syndrome épileptique bénin (bonne réponse au traitement, pas de retard psycho-moteur associé) caractérisé par de fréquentes crises généralisées tonico-cloniques associées à des épisodes de fièvre, mais de survenue plus tardive que les CF typiques (6 ans et au-delà) ;

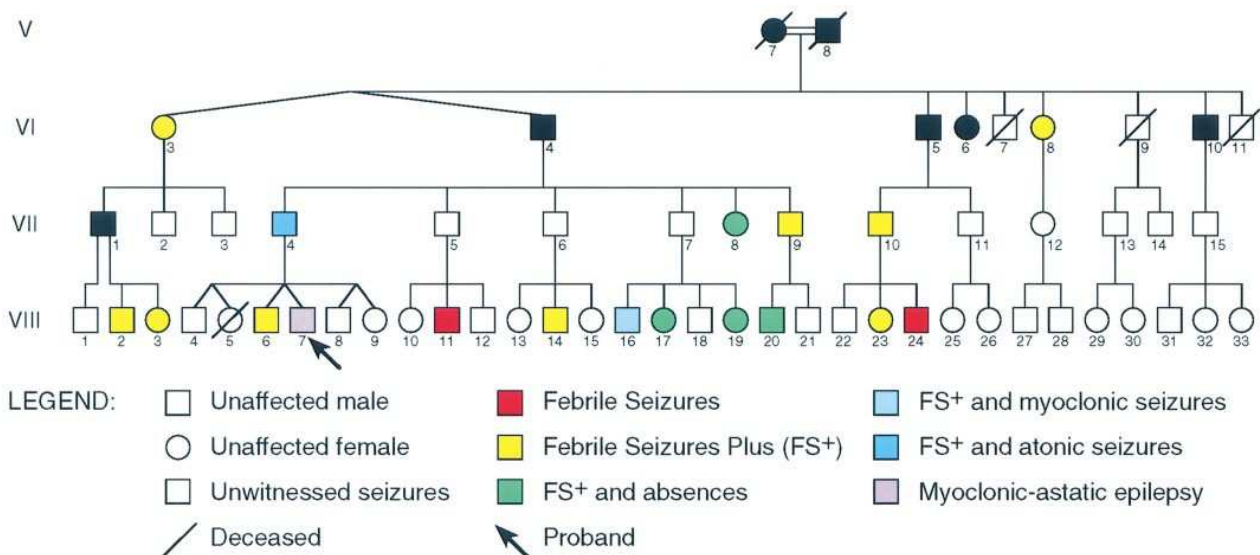
(2) les convulsions fébriles plus et absences (*febrile seizure plus and absences*), associant chez un même sujet absences et FS⁺ ;

(3) les convulsions fébriles plus et crises myocloniques (*febrile seizure plus and myoclonic seizures*) est le troisième phénotype, où des crises myocloniques et des FS⁺ sont présentes chez un même patient ;

(4) les convulsions fébriles plus et crises atoniques (*febrile seizure plus and atonic seizures*), où le malade souffre de FS⁺ et de crises atoniques.

Par conséquent, dans cette famille, les phénotypes observés chez les membres atteints sont hétérogènes et généralisés. De plus, aucun syndrome électro-clinique typique des EGI, telles que l'EAE, l'épilepsie absence juvénile ou l'EMJ, n'a pu être rencontré.

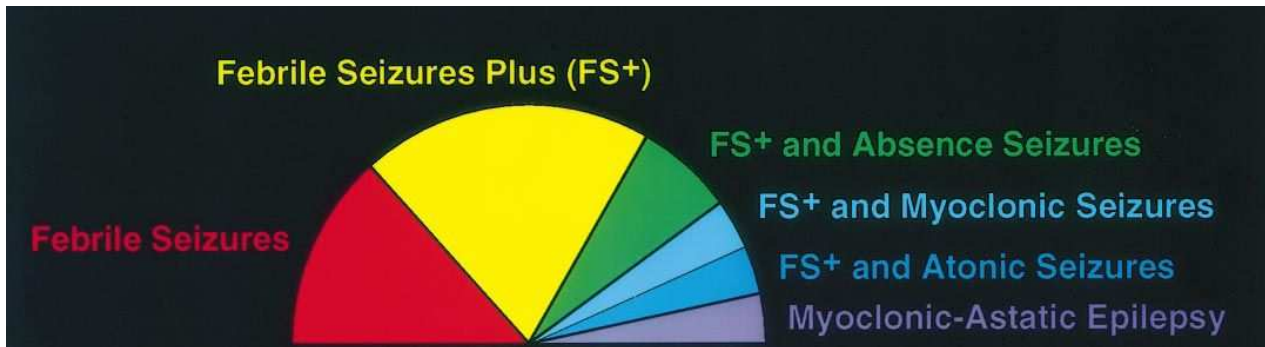
Figure 6 Arbre généalogique du *noyau familial* – hétérogénéité des phénotypes épileptiques (Scheffer and Berkovic 1997)



Bien qu'il n'y ait pas de relation apparente entre les phénotypes de cette famille, les crises épileptiques semblent suivre un modèle autosomal dominant à travers les générations. Le manque d'événements épileptiques chez certains individus peut être expliqué par une pénétrance incomplète (89%).

A la vue de ces phénotypes hétérogènes, les auteurs les ont regroupés sous le concept de *syndrome génétique unique* et l'ont donc nommé Epilepsie Généralisée avec Convulsions Fébriles plus (*Generalized Epilepsy with Febrile Seizures plus*, GEFS⁺). Ce nouveau syndrome comprend un spectre clinique de phénotypes (*Figure 7*) comprenant des crises fébriles classiques, des FS⁺, FS⁺ et absences, FS⁺ et crises myocloniques, FS⁺ et crises atoniques et des EMA.

Figure 7 Spectre clinique de GEFS⁺ (Scheffer and Berkovic 1997)

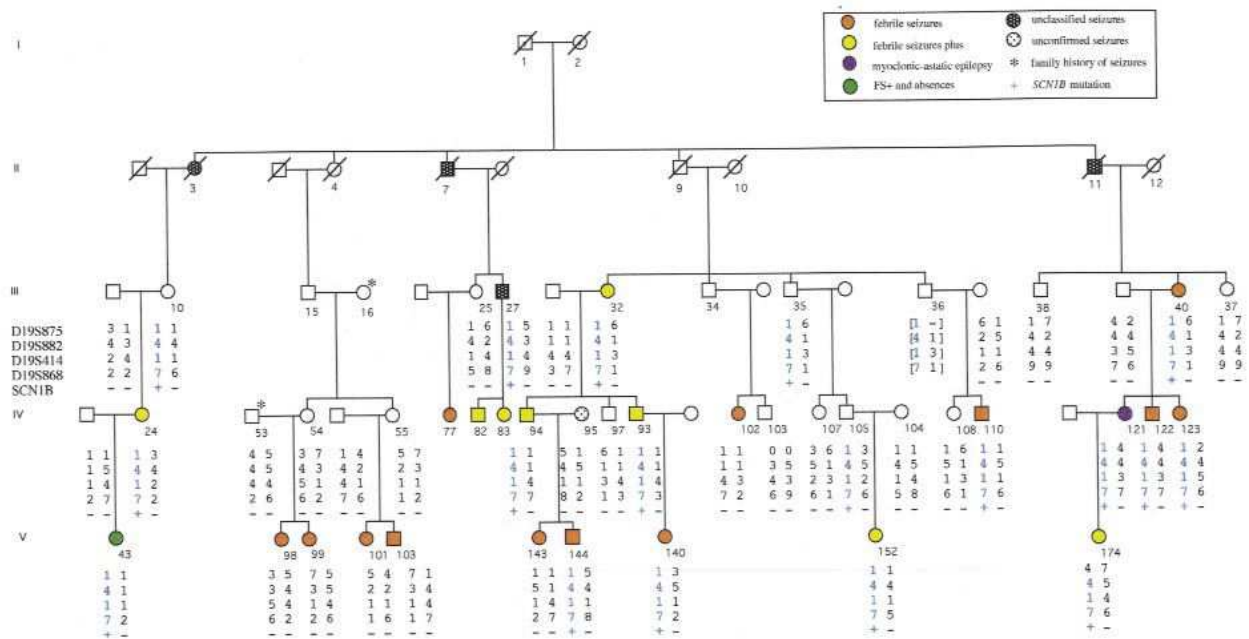


Une seconde étude, où 9 familles ont été étudiées, est venue confirmer la découverte du nouveau syndrome GEFS⁺. Dans ces familles, la maladie se transmet de manière autosomale dominante avec une pénétrance de 60%, qui est plus basse que pour la première famille. Cette publication permet d'étendre le spectre des GEFS⁺, avec l'apparition du phénotype *FS⁺ et ELT* (Singh et al. 1999). Malgré une hérédité en dominance probable dans ces deux études, une hérédité polygénique ou multifactorielle était envisageable. Ainsi, ces deux articles ont ouvert la voie aux études de larges familles qui ont permis de résoudre la base génétique moléculaire de certains syndromes épileptiques.

GEFS⁺ de type 1

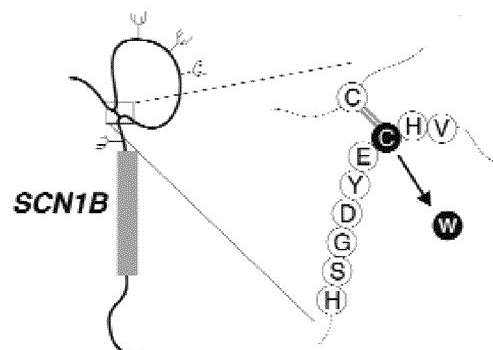
La première étude de liaison génétique a été effectuée dans une famille GEFS⁺ avec une transmission autosomale dominante, une pénétrance de 64% et un taux de phénotypie de 3% (Figure 8). Il a été mis en évidence une liaison avec le chromosome 19q13.1 (Wallace et al. 1998).

Figure 8 Arbre généalogique de la famille GEFS⁺1 (Wallace et al. 1998)



Cette région contient différents gènes candidats, dont le gène codant pour la sous-unité $\beta 1$ du canal sodique voltage-dépendant (*SCN1B*) qui est exprimé dans le cerveau, les muscles et le cœur. Une recherche de mutations dans ce gène a mis en évidence une mutation qui change un résidu cystéine conservé en un tryptophane (C121W) et provoque ainsi la rupture d'un pont disulfure, qui normalement permet le repliement de la partie extracellulaire de la protéine.

Figure 9 Rupture du pont disulfure dans *SCN1B* provoqué par C121W (Wallace et al. 1998)



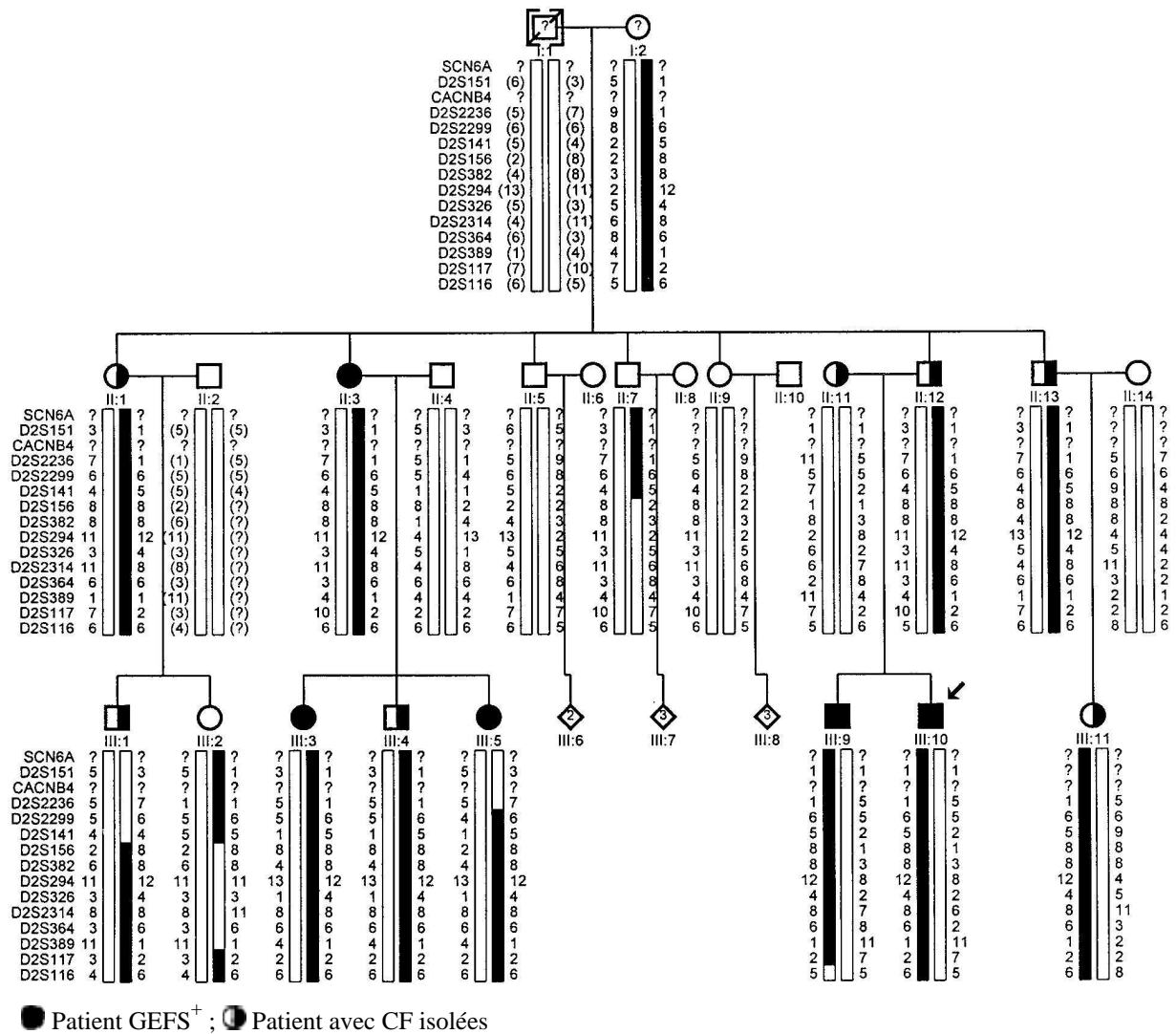
La co-expression de la sous-unité $\beta 1$ mutée avec une sous-unité α normale dans des ovocytes de *Xenopus laevis* a démontré que la mutation interférait avec la capacité que possède la sous-unité β de moduler la cinétique du canal. Cette interférence se traduit sous forme de perte de fonction (Wallace et al. 1998). Cette observation vient appuyer l'hypothèse que les EGI sont une

famille de canalopathies et que d'autres gènes codant pour des sous-unités de canaux sodiques pourraient être impliqués dans des CF et des épilepsies généralisées à hérédité complexe. Quelques années plus tard, la même équipe a mis en évidence la même mutation de *SCN1B* dans une seconde famille (Wallace et al. 2002). D'autres familles avec mutations de *SCN1B* ont été décrites depuis : une délétion de 5 acides aminés dans la partie extracellulaire de *SCN1B*, provoquant un transcrit aberrant avec une possible perte de fonction dans une famille (Audenaert et al. 2003) ; C121W a été retrouvé dans 2 familles, R85C et R85H chacune dans une famille (Scheffer et al. 2007).

GEFS⁺ de type 2

Une année après la publication du premier locus GEFS⁺, un second locus a été découvert sur le chromosome 2 dans deux familles françaises, simultanément. La famille décrite par Moulard et coll. comprend six membres atteints de crises fébriles typiques isolées et cinq membres présentant des crises fébriles associées à des crises tonico-cloniques généralisées. Dans cette famille, le mode de transmission de la maladie est de type autosomal dominant. De plus, la pénétrance du trait paraît être plus élevée que dans les familles GEFS⁺ rapportées précédemment (90%) (*Figure 10*).

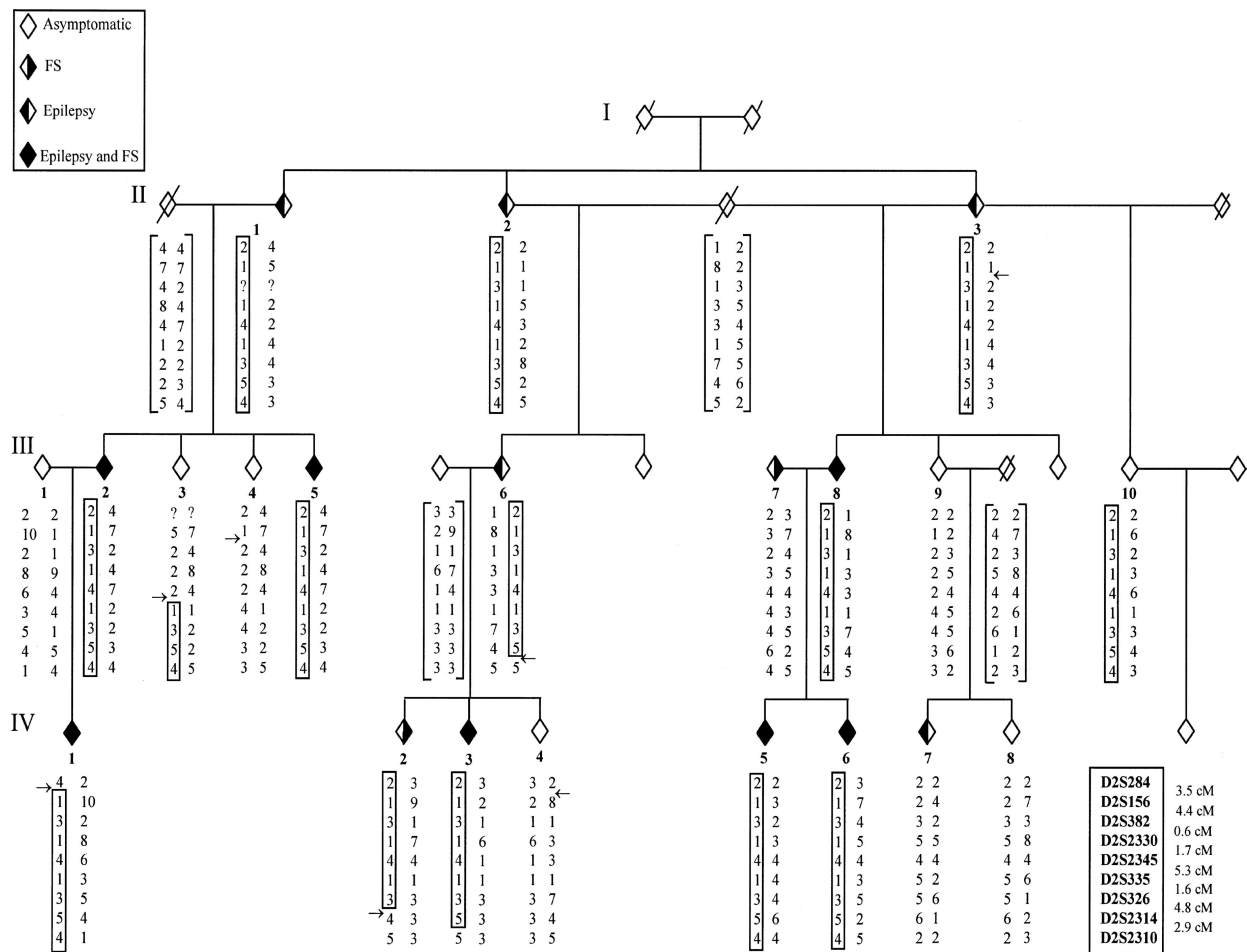
Figure 10 Arbre généalogique de la famille GEFS⁺2 (Moulard et al. 1999)



Le locus incriminé se trouve en 2q24-q33 et s'étend sur 30 cM. Un cluster de trois gènes est localisé dans cette région. Ces gènes codent pour des sous-unités α de canaux sodiques (*SCN1A*, 2q24 ; *SCN3A*, 2q24.3 et *SCN2A*, 2q31). La découverte de ce locus confirmait l'hétérogénéité génétique des GEFS⁺ (Moulard et al. 1999).

La seconde famille liée au chromosome 2 a été découverte par Baulac et coll.. Dans cette famille, les malades présentent des phénotypes très variables comprenant aussi des crises partielles. La maladie, là aussi, se transmet de façon autosomale dominante avec pénétrance incomplète. Il est à noter que les familles de GEFS⁺ peuvent comporter un taux élevé de phénocopies, car les CF affectent 2 à 5% des enfants entre 6 mois et 6 ans (Figure 11)

Figure 11 Arbre généalogique de la famille GEFS⁺2 (Baulac et al. 1999)



Le locus incriminé se trouve à la position 2q21-q23. Cette région, longue de 22 cM, comprend un gène de plus que dans la famille précédente: *SCN3A* (Baulac et al. 1999).

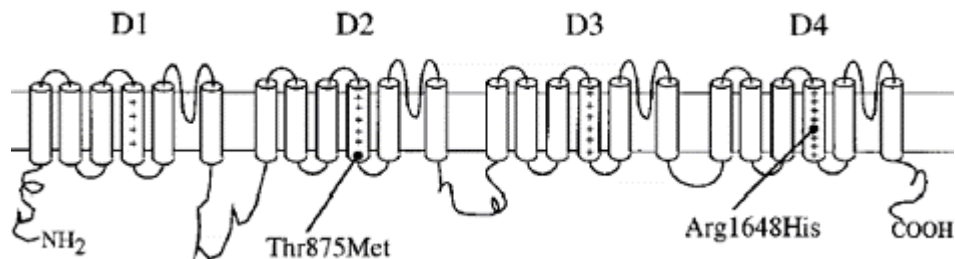
Un an plus tard, le groupe de Lopes-Cendes a effectué l'analyse de la première famille GEFS⁺ décrite par Scheffer et al.. La localisation est la même que pour les 2 familles françaises: 2q23-31. Cet intervalle de 29 cM inclut le cluster de gènes codant pour des sous-unités de canaux sodiques et un cluster de gènes codant pour des canaux potassiques. Cette région incriminée comprend également le gène *GADI* qui code pour une enzyme impliquée dans la synthèse de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) (Lopes-Cendes et al. 2000).

Après ces trois publications, l'hypothèse la plus vraisemblable était que les GEFS⁺ étaient déterminées par un seul gène à effet majeur localisé sur le chromosome 2. Ce nouveau locus a été nommé GEFS⁺ de type 2.

Les deux premières mutations au locus à GEFS⁺2 ont été trouvées dans le gène *SCN1A* dans les familles françaises décrites précédemment (Escayg et al. 2000). Ce gène code pour une sous-unité α du canal sodique voltage-dépendant. Cette sous-unité est faite de quatre domaines

homologues (D1–D4) et chacun d’eux contient six segments transmembranaires (S1–S6). Thr875Met est la mutation présente dans la famille décrite par Moulard et coll.. Elle est localisée dans l’interface intracellulaire du segment D2S4. Arg1648His est la seconde mutation présente dans la famille de l’équipe de Baulac et coll.. Celle-ci se trouve dans le segment D4S4. Ces deux mutations sont localisées dans le segment S4, qui contient de nombreux acides aminés chargés positivement et ont un rôle dans l’ouverture du pore du canal sodique (Escayg et al. 2000).

Figure 12 Mutations Thr875Met et Arg1648His localisées dans D2S4 et D4S4 de *SCN1A*^{a)}, respectivement (Escayg et al. 2000)



^{a)} Le canal sodique voltage-dépendant consiste en un minimum d’une sous-unité α et d’une sous-unité β . La sous-unité α peut former à elle seule des canaux fonctionnels quand elle est exprimée dans les cellules de mammifères. Elle contient toutes les caractéristiques structurales, tels que le pore conducteur d’ions, les senseurs de voltage ainsi que les barrières d’activation et d’inactivation. Les sous-unités β possèdent uniquement des propriétés pour la modulation du canal (Lerche et al. 2001)

Après les deux premières mutations rapportées dans les familles françaises, d’autres études ont montré que les mutations dans *SCN1A* étaient les plus souvent responsables de GEFS⁺ quelque soit l’origine ethnique des familles étudiées (*Table 4*).

Table 4 Mutations de *SCN1A* impliquées dans des familles GEFS⁺2^{a)}

Référence	Exon	Mutation	Acide aminé	Pays/Origine ethnique
Escayg et al., 2000	15	C2624T	Thr875Met	France (Moulard et al. 1999)
Escayg et al., 2000	26	G4943A	Arg1648His	France (Baulac et al. 1999)
Escayg et al., 2001	18	T3610C	Trp1204Arg	Allemagne
	4	A563T	Asp188Val	Australie (Lopes-Cendes et al. 2000)
Wallace et al., 2001b	21	G4057C	Val1353Leu	Ashkénaze
	26	C4968G	Ile1656Met	Druze
Sugawara et al., 2001a	21	T4283C	Val1428Ala	Japon
	26	C5054T	Ala1685Val	
Abou-Khalil et al., 2001	19	A3809C	Lys1270Thr	USA
	24	C5021T	Ala1674Val	
Ito et al., 2002	21	T4250C	Val1417Ala	Japon
	13	A2336G	Tyr779Cys	
Annesi et al., 2003	26	T5522C	Met1841Thr	Italie
Spampanato et al., 2004	26	G5596T	Asp1866Try	Italie
Pineda-Trujillo et al., 2005	26	A5213G	Asp1742Gly	Colombie
Nagao et al., 2005	26	G5569T	Val1857Leu	Japon
Hindocha et al., 2008	26	T5600C	Ile1867Thr	UK

^{a)} par ordre de publication

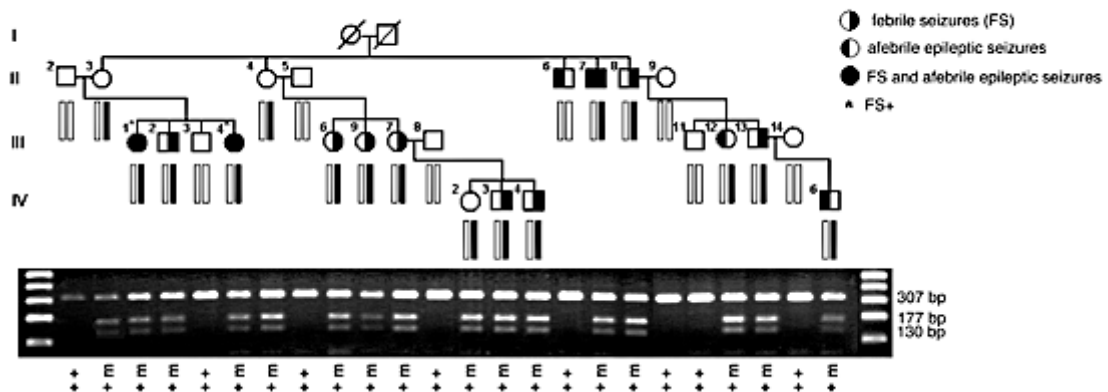
En 2001, Sugawara et al. ont rapporté la découverte d'une mutation dans le gène *SCN2A* chez un patient souffrant de CF associées à des crises afébriles. Ce proband est issu d'une famille GEFS⁺, où le père, l'oncle paternel, la mère et la tante maternelle ont souffert de CF dans leur enfance. La mutation résulte en un changement d'acide aminé (R187W) dans la sous-unité α d'un canal sodique voltage-dépendant de type II. Cette mutation provoque une inactivation du canal plus longue que la normale et prolonge l'état ouvert du canal. Ceci aurait pour effet l'augmentation de l'influx de Na⁺ et cela renforcerait l'hyperexcitabilité neuronale qui induirait l'activité des crises (Sugawara et al. 2001). Par la suite, cette mutation a été testée dans une étude cas-témoins, où la population de cas incluait des GEFS⁺. Mais elle n'a pas été retrouvée. Par conséquent, cette étude n'a pas mis en évidence de relation entre la mutation R187W de *SCN2A* et GEFS⁺ (Nakayama et al. 2002b). Ce locus n'a pas reçu de dénomination internationale.

GEFS⁺ de type 3

Après la publication des deux premières mutations de *SCN1A*, le groupe de Baulac a étudié une nouvelle famille française GEFS⁺ liée au chromosome 5q34. Dans cette région, se trouve un cluster de gènes qui codent pour des sous-unités du récepteur GABA (A), qui possède des sites

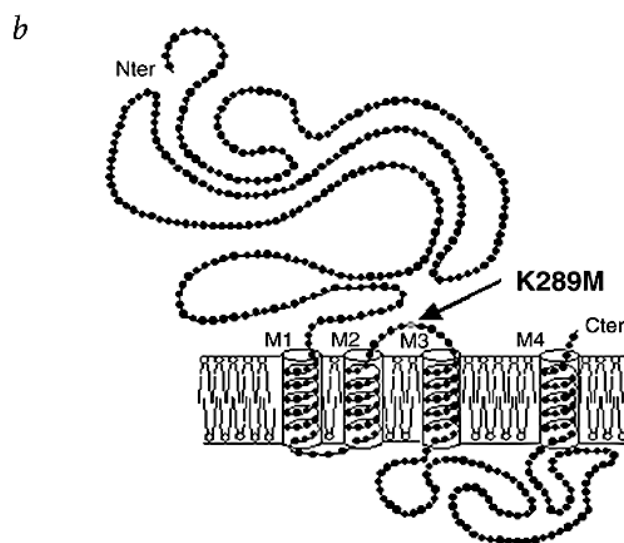
spécifiques pour le GABA, les benzodiazépines, les barbituriques ainsi que les stéroïdes. Après séquençage du gène *GABRG2*, qui code pour la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABA(A), la mutation Lys289Met a été mise en évidence. Elle co-ségrège avec la maladie dans cette famille GEFS⁺.

Figure 13 Arbre généalogique de la famille GEFS⁺3 (Baulac et al. 2001a)



Cette mutation est localisée dans la boucle extracellulaire entre les segments transmembranaires M2 et M3.

Figure 14 Mutation Lys289Met de la protéine GABRG2 (Baulac et al. 2001a)



Selon les auteurs, cette mutation provoquerait une baisse d'amplitude des courants activés par GABA. Cette publication a permis de définir les GEFS⁺ de type 3 liés au gène *GABRG2* (Baulac et al. 2001a).

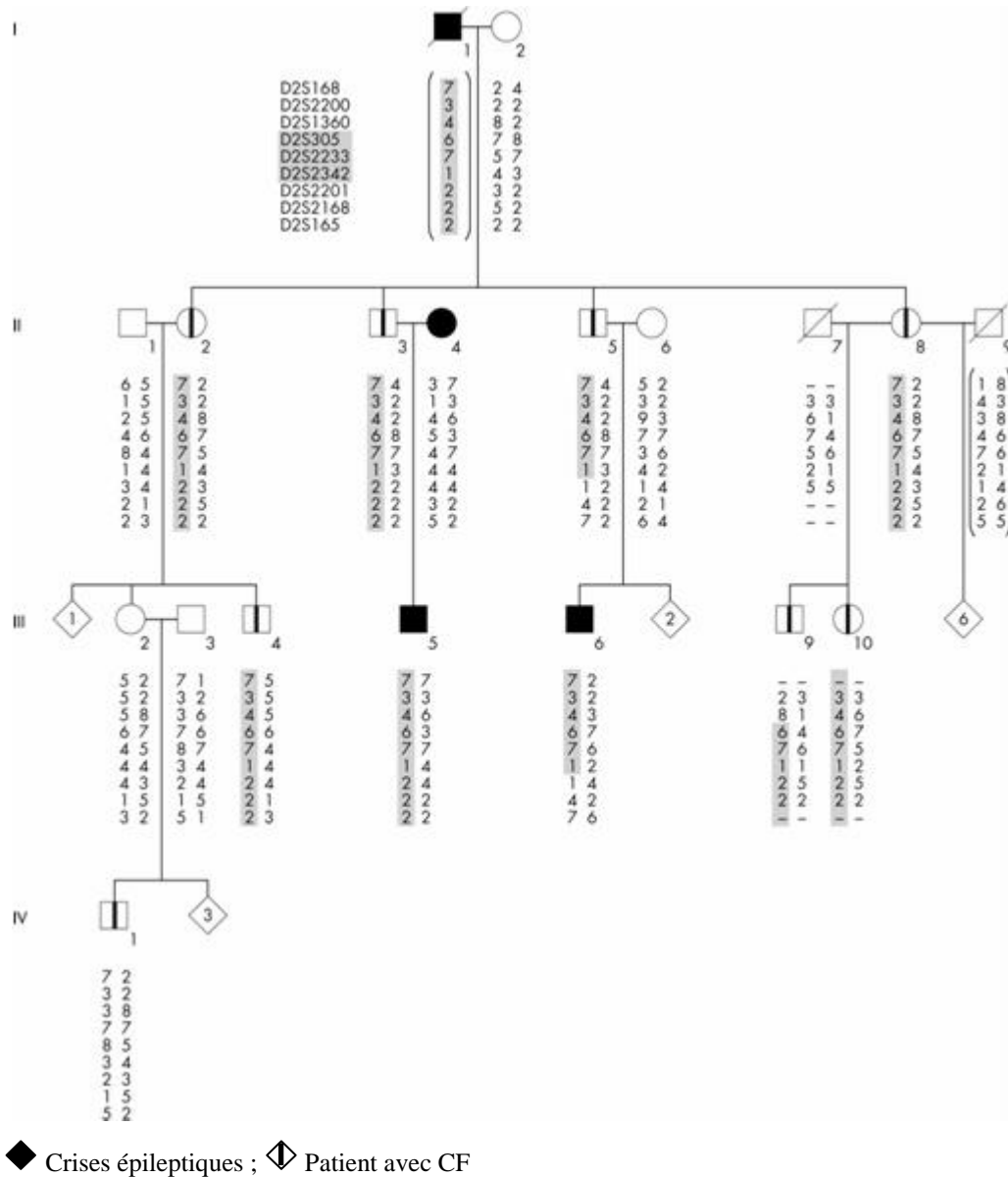
Une seconde mutation dans *GABRG2* a été mise en évidence dans une famille avec deux phénotypes principaux : EAE et CF. Cette famille n'est pas une GEFS⁺ telle que décrite initialement. Elle présente les caractéristiques d'une famille EGI. La mutation R43Q, présente dans cette famille, abolit *in vitro* l'action des benzodiazépines sur le récepteur GABA, car elle empêche l'assemblage correct de la sous-unité $\gamma 2$ au récepteur. Selon les auteurs, cette perte de sensibilité aux benzodiazépines indiquerait que les endozépines pourraient avoir un rôle physiologique dans la prévention des CF et des absences (Wallace et al. 2001)

Une troisième famille GEFS⁺ de type 3 a été décrite et pour la première fois, le phénotype d'épilepsie myclonique sévère du nourrisson (SMEI) a été rapporté chez le proband. La mutation Q315X, retrouvée dans la famille, induit un codon stop prématuré au niveau de la boucle intracellulaire entre les troisième et quatrième domaines transmembranaires de *GABRG2*. Lorsque cette protéine mutante est exprimée dans des ovocytes de *Xenopus laevis*, la sous-unité $\gamma 2$ est complètement abolie et la protéine est retenue dans la lumière du réticulum endoplasmique. Par conséquent, cette découverte renforce l'implication des récepteurs GABA(A) dans l'épilepsie. Il est intéressant de noter la position et/ou la sévérité de la mutation de la sous-unité du récepteur GABA(A) pourrai(en)t déterminer le spectre des phénotypes épileptiques (SMEI, GEFS⁺, EAE, CF) (Harkin et al. 2002).

GEFS⁺ de type 4

Un nouveau locus pour les GEFS⁺ a été découvert dans une famille belge non-consanguine avec CF et épilepsie (*Figure 15*).

Figure 15 Arbre généalogique de la famille GEFS⁺4 (Audenaert et al. 2005)

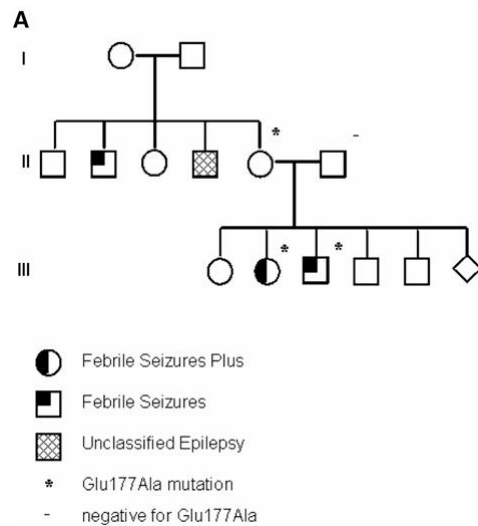


Une analyse pangénomique a identifié une région candidate de 3,24 cM (4,2 Mb) sur le chromosome 2p24. De plus, l'analyse de 50 familles de même origine ethnique, avec au moins un malade souffrant de CF a confirmé ce nouveau locus de susceptibilité en le réduisant à 2,14 cM avec les microsatellites flanquant D2S1360 et D2S2342. Mais malheureusement, aucun gène lié à la maladie n'a été trouvé (Audenaert et al. 2005).

GEFS⁺ de type 5

OMIM (*137163) rapporte un cinquième type de GEFS⁺ dans une petite famille liée au chromosome 1q36.3, où la mutation hétérozygote Glu177Ala du gène *GABRD*, qui code pour la sous-unité δ du récepteur GABA (A), provoque une diminution de l'amplitude du courant de ce récepteur. Dans cette famille, la mère saine possède également cette mutation hétérozygote. Par conséquent, les auteurs suggèrent que Glu177Ala du gène *GABRD* est un variant de susceptibilité pour la maladie (Dibbens et al. 2004).

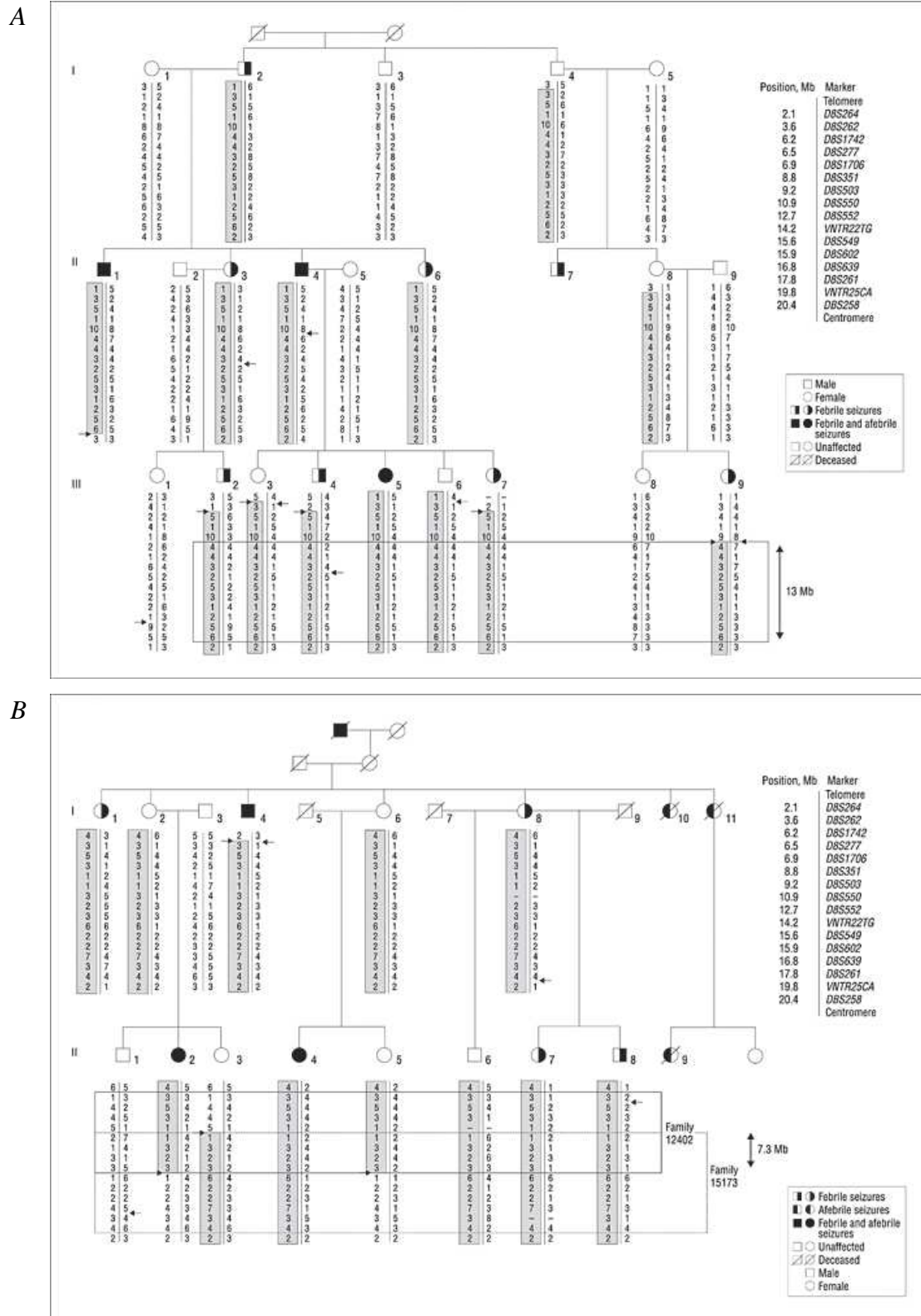
Figure 16 Arbre généalogique de la famille GEFS⁺5 (Dibbens et al. 2004)



GEFS⁺ de type 6

Très récemment, une équipe française vient de publier une nouvelle localisation chromosomique pour le syndrome GEFS⁺ (Baulac et al. 2008). Ils ont procédé, dans 5 familles françaises GEFS⁺, à une analyse d'exclusion des loci FEB et GEFS⁺ déjà publiés. Tous les lod scores se sont avérés négatifs. Par conséquent, ils ont effectué une analyse pangénomique de la famille qui présentait le lod score théorique le plus élevé. Ils ont mis en évidence une région de 13 Mb localisée sur le chromosome 8p23-p21 (Figure 17A). Sur les quatre familles restantes, une seule est aussi liée à cette région. La localisation est un peu différente et fait 12 Mb, mais il y a un chevauchement de 7,3 Mb avec la région de la première famille (Figure 17B). Ces résultats suggèrent, pour ces deux familles, une liaison au même locus. Mais leurs combinaisons alléliques différentes excluent un ancêtre commun.

Figure 17 Arbre généalogique des familles GEFS⁺6 (Baulac et al. 2008)



La région chevauchante de 7,3 Mb contient 80 séquences géniques connues, mais aucun gène codant pour un canal ionique ou un neurotransmetteur. Les auteurs ont, en priorité, séquencé

six gènes exprimés dans le cerveau, mais aucune mutation n'a été trouvée. Par conséquent, ces deux familles n'ont pas révélé de nouveaux gènes de susceptibilité pour le syndrome GEFS⁺.

Dans la littérature, il existe plusieurs équipes qui ont testé les loci et les gènes liés aux différents types de GEFS⁺. Certains ont utilisé l'analyse de liaison génétique (Bonanni et al. 2004 ; Gerard et al. 2002 ; Lerche et al. 2001 ; Selmer et al. 2008) alors que d'autres ont uniquement séquencé les exons où se trouvaient les mutations les plus fréquemment rapportées (Mrabet et al. 2007). Aucune de ces équipes n'a trouvé de nouvelles mutations. Par contre, il est à noter que toutes ces études rapportent une grande diversité de phénotypes dans les familles de GEFS⁺. Il est aussi intéressant de constater que les phénotypes de certaines familles rapportés par Bonanni et coll. incluent des crises focales. Par conséquent, les phénotypes des EGI et des GEFS⁺ peuvent se chevaucher dans certaines familles, ce qui suggérerait un mécanisme génétique commun (Bonanni et al. 2004).

1.7.3 Epilepsie myoclonique sévère du nourrisson

L'épilepsie myoclonique sévère du nourrisson (*Severe myoclonic Epilepsy of Infancy – SMEI*), qui est résistante à toutes formes de traitement, a été décrite pour la première fois par Dravet (Dravet 1978). A cause d'antécédents familiaux d'épilepsie chez les patients SMEI, l'équipe de Singh a publié une étude qui montre que SMEI est associée à une histoire familiale de crises chez 50% des patients. Les membres affectés de ces familles présentent un spectre phénotypique de crises ressemblant à celui des familles GEFS⁺. Par conséquent, SMEI pourrait être considéré comme le phénotype le plus sévère dans le spectre des GEFS⁺ (Singh et al. 2001). Ces conclusions ont été soutenues par la publication de la troisième famille GEFS⁺3 où le proband souffre de SMEI (Harkin et al. 2002). Mais aussi par une seconde équipe qui a confirmé que dans l'histoire familiale d'un patient SMEI, il y a un pourcentage plus élevé de parents épileptiques que dans les familles de personnes saines. Cette étude a permis de mettre en évidence que 10% des mutations de *SCN1A* sont héritées de parents asymptomatiques ou moyennement affectés. Ceci suggère un mode héréditaire complexe du phénotype SMEI qui correspondrait à une mutation à effet majeure modulée par une contribution polygénique. Les données de ces cas familiaux indiqueraient, par conséquent, une pénétrance basse et une expression variable du phénotype. Ceci placerait donc ces familles à l'intérieur du spectre des GEFS⁺ (Nabbout et al. 2003).

Aujourd'hui, il est reconnu que *SCN1A* est le gène majeur responsable pour SMEI. Claes et al. ont publié la première étude rapportant des mutations *de novo* dans *SCN1A* chez des patients SMEI. La fréquence des mutations de *SCN1A* dans cette cohorte belge était de 100% (Claes et al.

2001). Pourtant, d'autres études de différents pays ont revu à la baisse ce premier chiffre (Table 5).

Table 5 Taux de mutations dans *SCN1A* chez les SMEI

Référence	Pourcentage (#patients avec mutation /#patients total)	Pays
Claes et al., 2001	100 (7/7)	Belgique
Sugawara et al., 2002	71.4 (10/14)	Japon
Ohmori et al., 2002	82.7 (24/29)	Japon
Fujiwara et al., 2003	85.7 (30/35)	Japon
Claes et al., 2003	100 (9/9)	Belgique
Wallace et al., 2003	33.3 (8/24)	Australie-Canada
Nabbout et al., 2003	35.5 (33/93)	France-Italie
Fukuma et al., 2004	44.8 (26/58)	Japon
Harkin et al., 2007	79 (52/66)	Etude multicentre

Dans les études européennes, le taux de mutation dépend fortement des expérimentateurs. Par conséquent, ces différences ne sont certainement pas dues à l'origine ethnique ou aux conditions géographiques des patients, mais plutôt à la stricte définition du phénotype et des critères d'inclusion des malades.

Sugawara et al. ont montré que les mutations rapportées dans les familles de GEFS⁺ sont des mutations faux-sens. Celles-ci provoquent généralement une augmentation de l'influx d'ions sodiques. Par contre, les mutations les plus courantes des patients SMEI, sont des mutations non-sens et tronquantes. Ces dernières pourraient provoquer une baisse de l'influx d'ions sodiques. Il existe aussi des mutations tronquantes de protéines présentes chez les patients SMEI. Elles provoquent une incurabilité de la maladie, alors que les mutations faux-sens du même gène chez les GEFS⁺ créent des phénotypes beaucoup moins extrêmes (Sugawara et al. 2002). La même équipe a aussi montré que des mutations de patients SMEI engendrent des canaux mutants avec des courants sodiques entrants remarquablement atténués ou à peine détectables. Ceci indique que ces mutations amènent à une perte de fonction et contribueraient au développement des phénotypes des SMEI (Sugawara et al. 2003). Une revue a recensé des mutations de *SCN1A* présentes chez des patients SMEI, GEFS⁺ et CF. Les résultats ont montré que le spectre clinique des mutations *SCN1A* allait des CF à SMEI en passant par les GEFS⁺ et confirment ainsi que SMEI est la forme la plus sévère du spectre (Ceulemans et al. 2004).

La plupart des mutations retrouvées chez des patients SMEI sont des mutations *de novo*, c'est-à-dire non-présentes chez les parents. Pourtant, plusieurs équipes ont mis en évidence un

mosaïcisme cellulaire pour des mutations *SCN1A* chez des parents de patients SMEI. Gennaro et ses collègues ont montré une première famille où la mère, qui a souffert de CF dans l'enfance, possède un mosaïcisme somatique pour une mutation dans *SCN1A* présente chez ses enfants malades. Dans la deuxième famille, décrite par cette équipe, la mère saine montre un mosaïcisme confiné à ses cellules germinales. Ces indications démontrent qu'un enfant souffrant de SMEI avec une « mutation *de novo* » peut être, en fait, le descendant d'un parent mosaïque (Gennaro et al. 2006). Dans le même temps, une deuxième équipe confirme ce résultat en publiant deux familles caucasiennes avec des mosaïcismes somatiques et germinaux (Depienne et al. 2006). Un troisième groupe démontre que ce phénomène existe aussi chez des malades d'origine japonaise (Morimoto et al. 2006). Finalement, un quatrième laboratoire a trouvé un mosaïcisme dans des dérivés de cellules ectodermes chez un père, ayant souffert de CF, de deux enfants SMEI (Marini et al. 2006).

Bien que les mutations *de novo* de *SCN1A* soient considérées comme la principale cause de SMEI, il a été rapporté d'autres mécanismes génétiques provoquant la maladie. L'équipe de Pereira a rapporté le cas d'une patiente souffrant d'une épilepsie sévère accompagnée de retards développementaux et de caractères dysmorphiques. Certains aspects de son phénotype se rapprochent de celui des SMEI. Elle présentait un caryotype foetal normal. Mais un nouveau caryotype a été effectué après sa naissance et celui-ci présentait une délétion à l'état hémizygote incluant les gènes *SCN1A* et *SCN2A*. Tout comme pour SMEI, le syndrome décrit ci-dessus, peut être considéré comme un phénotype sévère des GEFS⁺ (Pereira et al. 2004).

Cette observation a conduit à envisager l'existence de microdélétions indétectables par simple analyse de séquençage, pour les SMEI sans mutation dans *SCN1A*. Suls et al. ont été les premiers à confirmer cette hypothèse. Ils ont, dans un premier temps, remarqué que ces patients étaient « homozygotes » pour tous les SNP testés. Grâce à une PCR quantitative appelée *multiplex amplicon quantification (MAQ)* et à de l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH), ils ont ensuite démontré que des patients SMEI sans mutation dans *SCN1A* ne possédaient qu'une seule copie du gène. Par conséquent, cette haploinsuffisance du gène *SCN1A* est une nouvelle cause de SMEI (Suls et al. 2006). Une deuxième équipe a confirmé cette observation en identifiant de nouveaux patients sans mutation dans *SCN1A* et hémizygotes pour la région de *SCN1A* (Madia et al. 2006). Une troisième équipe a rapporté des microdélétions de *SCN1A* encore plus courtes : des délétions exoniques de quelques centaines de paires de bases (pb) chez des patients SMEI (Mulley et al. 2006).

Tout récemment, Møller et ses collaborateurs ont rapporté un patient avec SMEI, chez lequel aucune mutation ni microdélétion de *SCN1A* n'avaient été détectée. Ils ont identifié une

translocation équilibré t(2;5)(q24.3,q34) *de novo*. Le point de cassure sur le chromosome 2q24.3 tronque le gène *SCN1A*. Par conséquent, les auteurs recommandent de faire des investigations sur des éventuels réarrangements chromosomiques possibles chez des patients sans mutation ni microdélétion de *SCN1A* (Moller et al. 2008).

1.7.4 Les convulsions fébriles (CF)

Comme évoqué plus haut, les CF sont l'événement convulsif humain le plus commun. Ce trouble n'est pas considéré comme une épilepsie en tant que telle, mais comme un syndrome spécial provoqué par la fièvre. Bien que le pronostic soit généralement bon, les personnes souffrant de CF, ont un risque plus grand de développer des crises afébriles spontanées. De plus, 13% des patients épileptiques et 11% des patients avec EGI ont des antécédents de CF. La susceptibilité de faire des CF et une épilepsie est généralement considérée comme non-spécifique en terme de crises épileptiques et syndromes, mais est néanmoins très utile pour l'approche génétique (Baulac et al. 2004).

De fortes évidences épidémiologiques montrent que les CF sont associées à des crises ultérieures afébriles ou non-provoquées. Plusieurs facteurs ayant des effets prédisposant à des épilepsies ultérieures ont été identifiés : des anomalies développementales, une histoire familiale d'épilepsies, des CF récurrentes, une brève période de fièvre avant la CF ainsi que des CF complexes (Baulac et al. 2004).

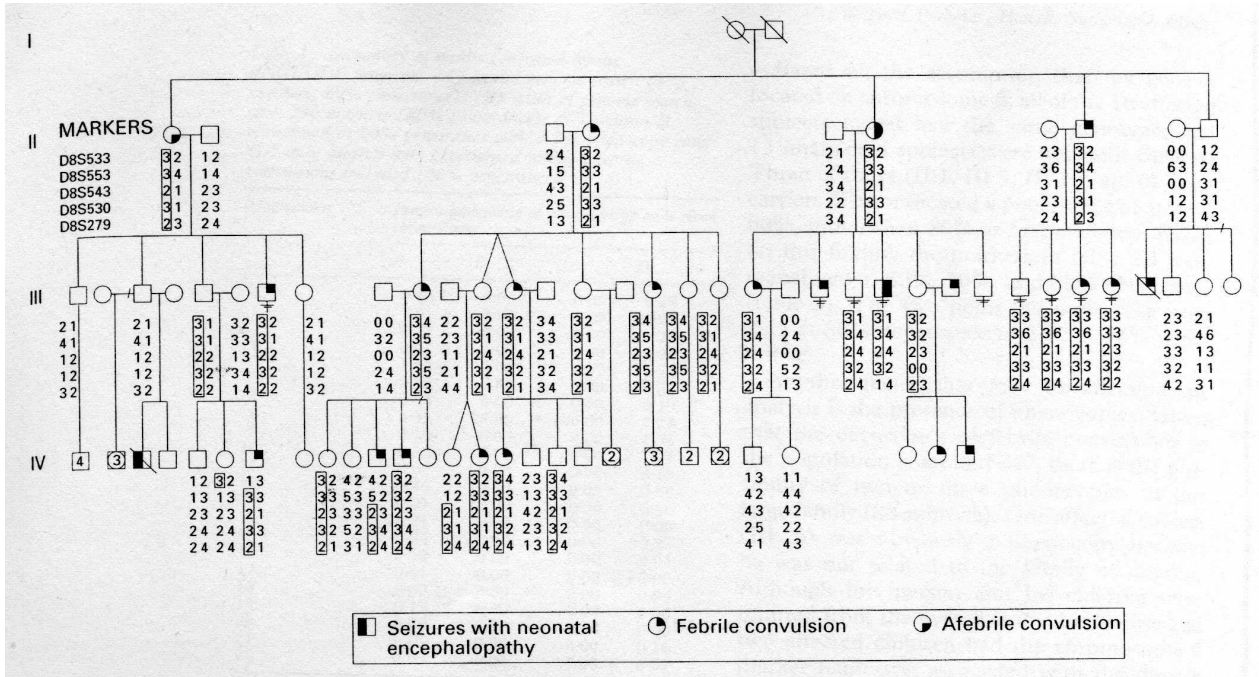
Des études familiales et de jumeaux ont mis en évidence une importante composante génétique liée à l'étiologie des CF (Corey et al. 1991 ; Hauser et al. 1985 ; Tsuboi 1987 ; Tsuboi and Endo 1991). Il faut souligner que dans certaines formes monogéniques de CF, certains patients développeraient une épilepsie ultérieure avec un risque plus élevé que les personnes saines. Dans un certain nombre de familles avec plusieurs membres malades, les CF récurrentes ou complexes sont un syndrome communs aux affectés et une histoire de crises afébriles est souvent présente (Pal et al. 2003b). Ces phénotypes familiaux suggèrent une importante composante génétique. OMIM fait état de 9 loci génétiques liés à ces formes familiales.

FEB1

La toute première étude de liaison des CF a été réalisée dans une large famille australienne. La transmission la plus vraisemblable du trait était autosomale dominante avec des taux de pénétrance et de phénocopie estimés à 60% et 3% respectivement. Un seul locus majeur a été identifié sur le chromosome 8 à la position 8p13-21 et a été dénommé *FEB1* avec un lod score

maximum à 3,40 dans la région flanquée des marqueurs D8S553 et D8S279 (Wallace et al. 1996).
A ce jour, ce locus n'a pas encore été confirmé dans une autre famille.

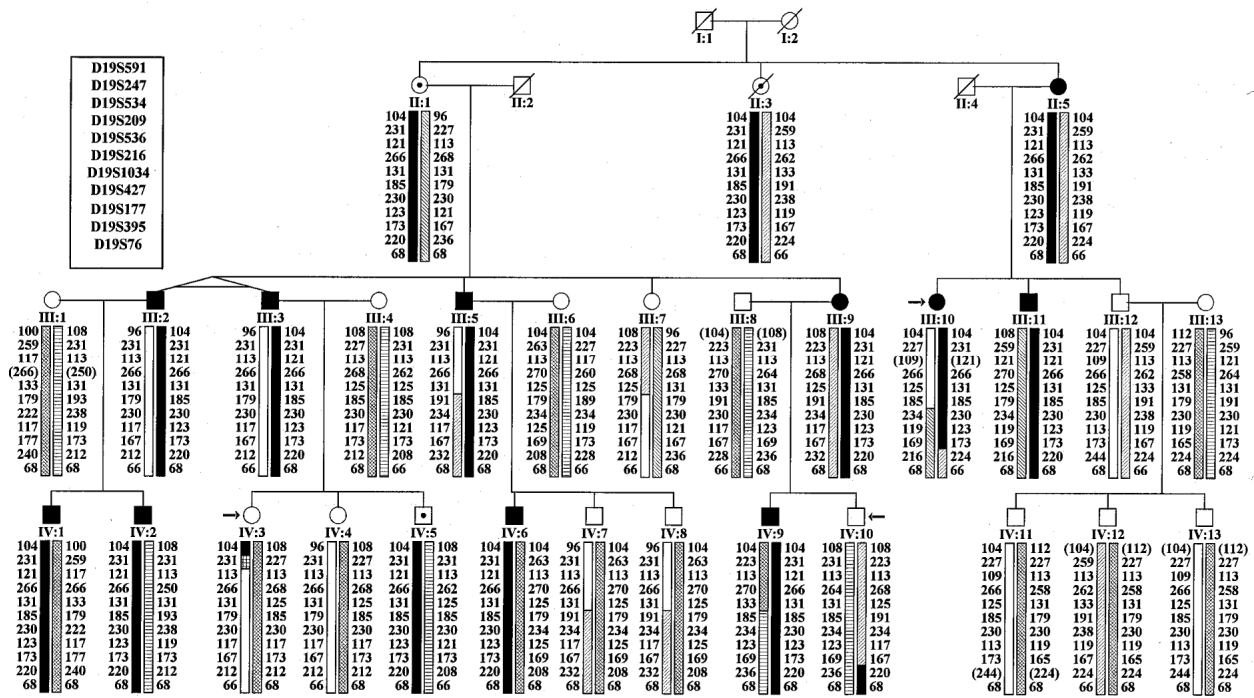
Figure 18 Arbre généalogique de la famille FEB1 (Wallace et al. 1996)



FEB2

Le second locus FEB2 a été mis en évidence dans une grande famille américaine sur le chromosome 19p13.3, entre les microsatellites D19S591 et D19S395, selon un modèle autosomal dominant avec une pénétrance de 95% (Johnson et al. 1998) (Figure 19).

Figure 19 Arbre généalogique de la famille FEB2 (Johnson et al. 1998)



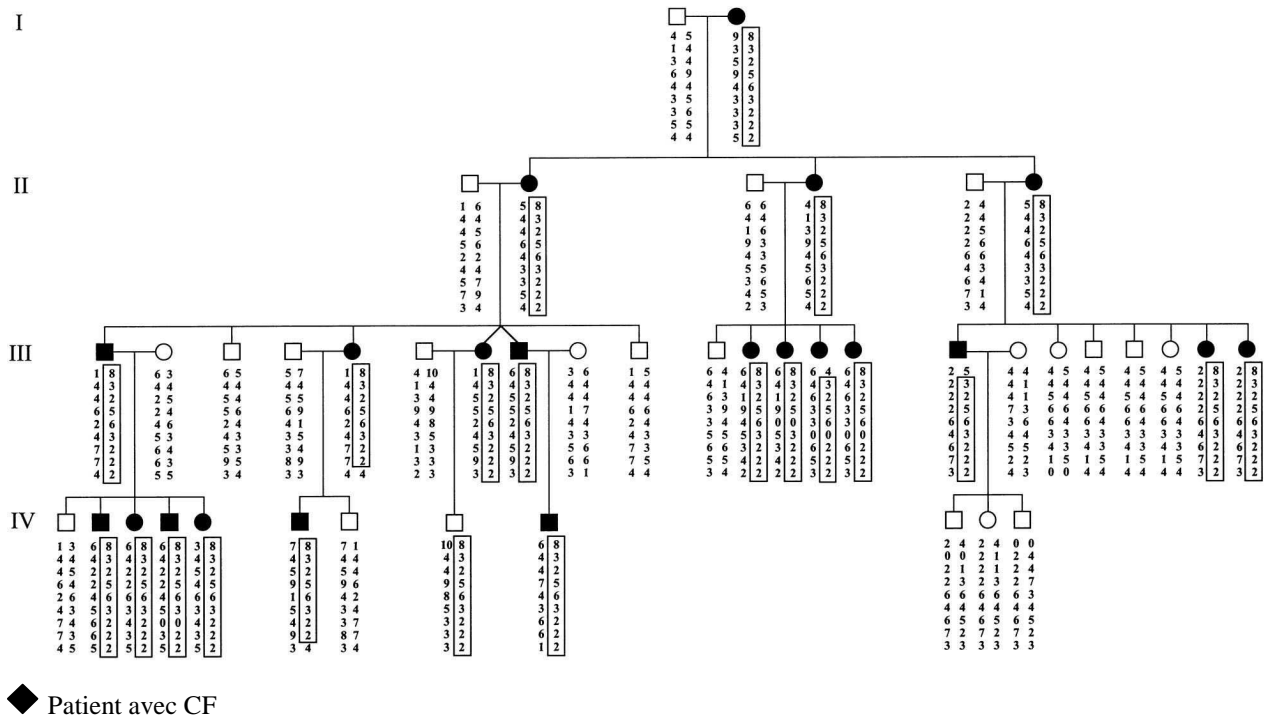
◆ Individu malade ; ◇ Individu avec un diagnostic peu clair ou porteur obligatoire.

La liaison à ce locus a été confirmée par une autre équipe dans une autre famille présentant des CF complexes (Kugler et al. 1998). Dans cet article, d'autres familles ont été étudiées mais aucun liaison, ni avec FEB1 ni avec FEB2, n'a été observée, suggérant l'existence d'au moins trois loci (Kugler et al. 1998).

FEB3

Le troisième locus, FEB3, a été découvert dans une grande famille originaire de l'Utah. La maladie se transmet de manière autosomale dominante. FEB3 se situe sur le chromosome 2q23-24. Ce dernier est identique à celui incriminé chez les GEFS⁺ de type 2 (Figure 20).

Figure 20 Arbre généalogique de la famille FEB3 (Peiffer et al. 1999)



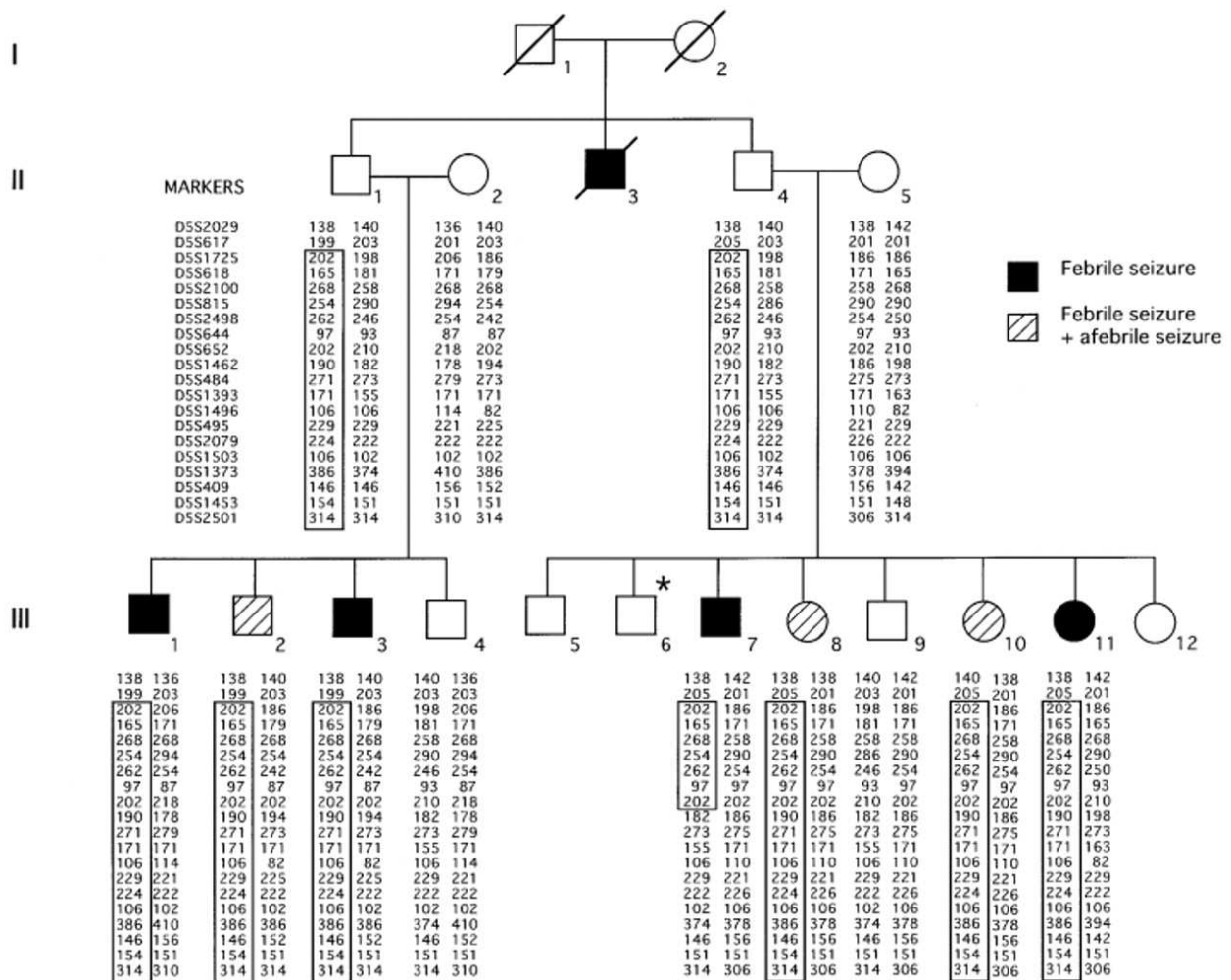
Selon les auteurs, tous les membres atteints de la famille n'ont pas fait de CF au-delà de 6 ans. C'est pour cela qu'ils ne la considèrent pas comme une famille GEFS⁺, mais comme une pure famille CF. Pourtant, plus loin, ils rapportent des crises afébriles ainsi que des crises partielles chez certains atteints (Peiffer et al. 1999). Ces faits ont été critiqués par deux équipes, sur la base des données cliniques. Cette famille n'est certainement pas une pure CF, mais la quatrième famille GEFS⁺2 liée au chromosome 2 (Moulard et al. 2000 ; Scheffer et al. 2000).

Récemment, dans une famille italienne comprenant 12 affectés sur 23, le trait considéré comme pure CF a été liée au chromosome 2. Une mutation probablement responsable d'une perte de fonction a été trouvée dans *SCN1A* (M145T). Toute comme dans la famille précédente, les phénotypes des patients ne sont pas de véritables pures CF. Par la suite, trois d'entre eux ont développé une épilepsie afébrile partielle simple avec comme origine le lobe temporal. De plus, ces trois patients ont aussi souffert de crises partielles complexes et de crises tonico-cloniques nocturnes secondairement généralisées (Mantegazza et al. 2005). Le phénotype présent dans cette famille est donc probablement GEFS⁺2.

FEB4

Nakayama et al. ont effectué une analyse pangénomique dans une famille japonaise. Ils ont rapporté une localisation sur le chromosome 5q14-15. Ce résultat a été confirmé par l'analyse non-paramétrique de 39 familles nucléaires. De plus, une association entre CF et plusieurs microsatellites de la région a été observée (Nakayama et al. 2000)

Figure 21 Arbre généalogique de la famille FEB4 (Nakayama et al. 2000)



Deux ans plus tard, la même équipe a publié une étude dans laquelle le gène *MASSI* (*monogenic audiogenic seizure-susceptible*), autrement appelé *GPR98* a été analysé chez des patients issus de 48 familles avec CF. Ce gène code pour un récepteur couplé à une protéine G exprimé dans le cerveau, dont le domaine transmembranaire lie Ca^{2+} . Une mutation naturelle de ce gène, qui provoque des crises audiogéniques, a été rapporté chez la souris (Skradski et al. 2001 ; Skradski et al. 1998). Nakayama et son équipe ont recensés 25 altérations de *MASSI* chez leurs

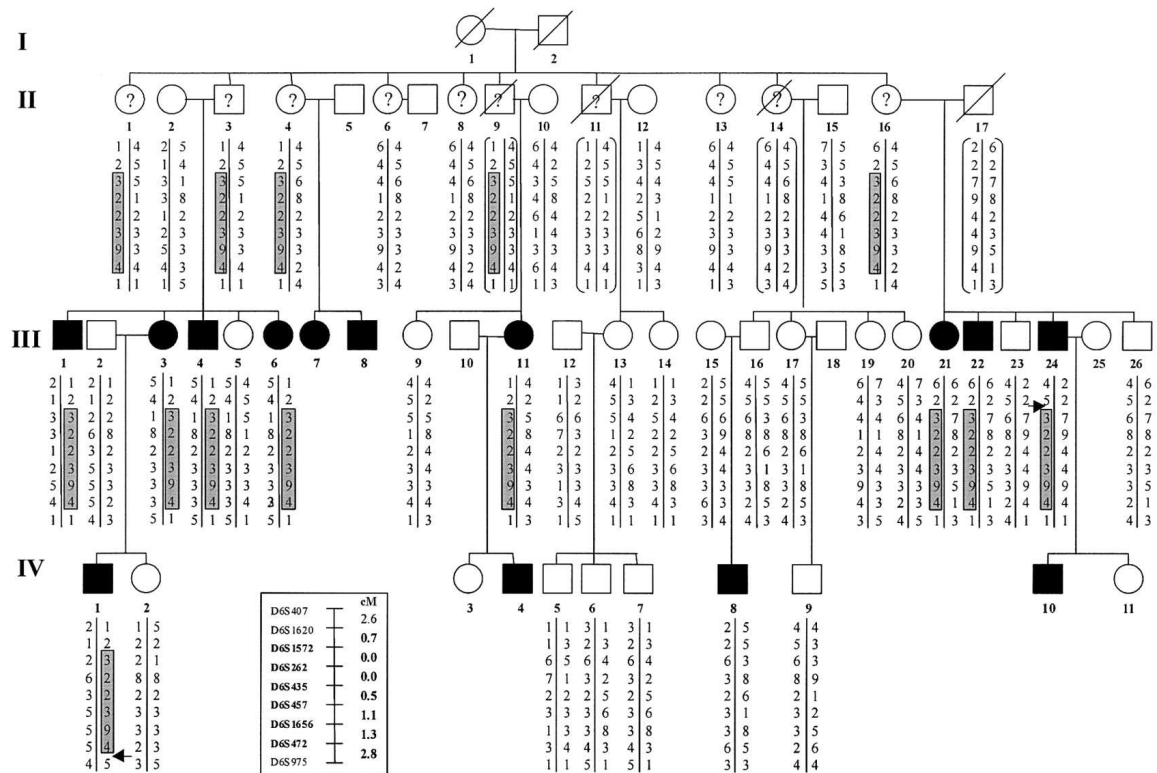
cas, mais une seule a été réellement associée aux CF. Cette mutation non-sens (S2652X) provoque la délétion en C-terminal de 126 acides aminés dans une petite famille de CF et crises afébriles (Nakayama et al. 2002a).

Récemment, dans une famille flamande les CF ont été cartographiées sur le chromosome 5q14.3-q23.1. Cette région recouvre celle rapportée dans la population japonaise. Afin de confirmer ce locus de susceptibilité, 48 familles hollandaises avec CF ont été analysées. Malheureusement, aucune association significative n'a été retrouvée. Une analyse mutationnelle de *MASS1* a été effectuée dans la famille liée au locus FEB4. Aucune mutation n'a été trouvée (Deprez et al. 2006). Cela signifierait qu'il existe peut-être dans cette famille un autre gène dans ou proche de la région FEB4 responsable de la maladie.

FEB5

Une équipe française a analysé trois familles de CF pures non-consanguines avec une transmission autosomale dominante de la maladie, ce qui n'était pas le cas pour les précédentes familles liées aux loci FEB1, FEB3 et FEB4, où certains individus souffraient aussi de crises afébriles (Baulac et al. 2004). Une de ces familles a permis l'identification d'un cinquième locus, FEB5, localisé sur le chromosome 6q22-q24 (*Figure 22*).

Figure 22 Arbre généalogique de la famille FEB5 (Nabbout et al. 2002)



◆ Individu malade

Pour l'une des deux autres familles, le trait ségrégeait aussi avec ce locus, mais l'analyse de liaison suggérait une région plus étendue que pour la première famille, aussi bien en centromérique qu'en télomérique. De plus, les haplotypes pour les microsatellites communs aux deux régions, étaient différents dans les deux familles. Ceci mettrait donc en évidence deux événements mutationnels distincts. La troisième famille n'était pas liée à ce locus. Par conséquent, ce résultat suggère une hétérogénéité génétique aussi pour les formes de CF pures autosomales dominantes (Nabbout et al. 2002)

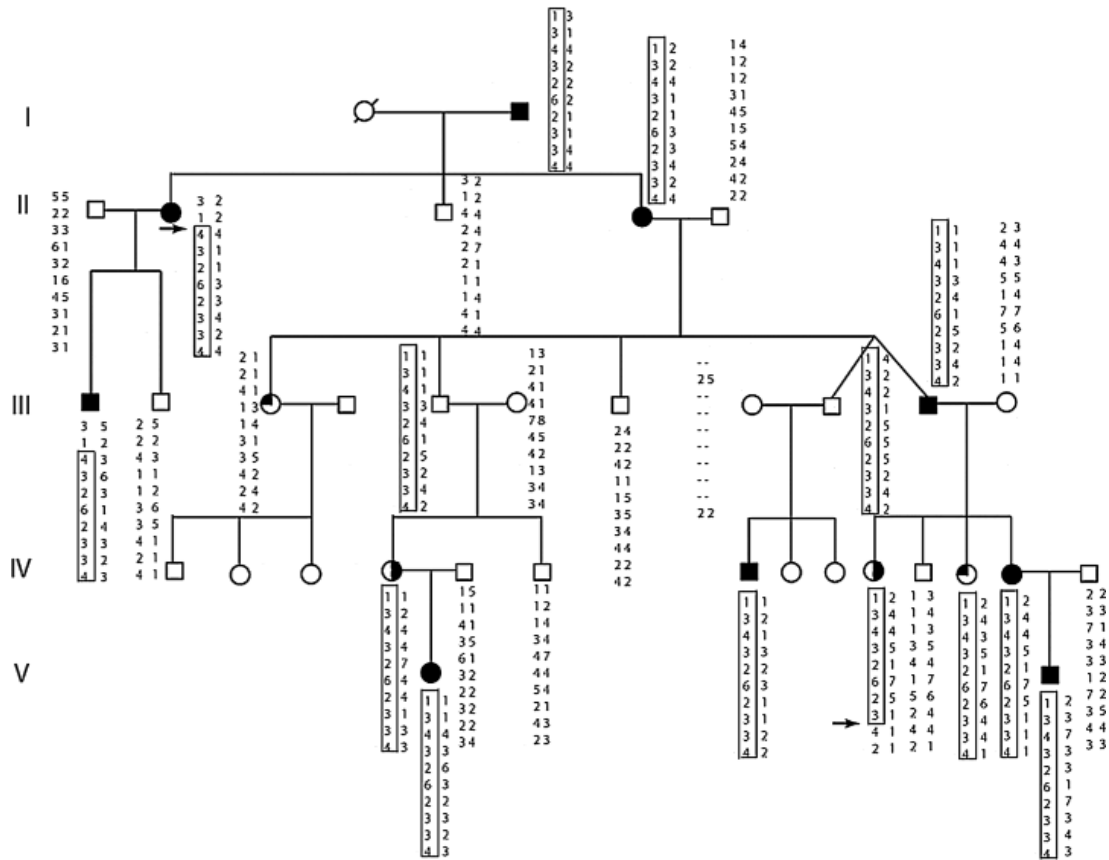
FEB6

Une analyse de liaison pangénomique a été réalisée dans une cohorte de 59 familles nucléaires japonaises. Les résultats ont suggéré une liaison des CF au chromosome 18p11.2. Cette région comprend le gène *IMPA2*, qui code pour la monophosphatase (IMPase) myo-inositol 2. Dans le chemin de signalisation du phosphatidylinositol, IMPase est inhibée par le lithium, qui a un effet pro-convulsant et stimulée par la carbamazépine, qui est un anti-convulsivant. Dans la présente étude, aucune mutation non-synonyme n'a été découverte chez les cas. Pourtant, un haplotype particulier semble être associé à la maladie. Selon les auteurs, cet haplotype pourrait être associé avec la régulation de l'expression d'*IMPA2*, bien qu'ils ne l'aient pas prouvé. Une autre possibilité serait que la véritable mutation causative se trouve proche du gène et qu'elle soit en DL avec l'haplotype d'*IMPA2*. Mais à l'époque, les auteurs semblaient sceptiques, car le gène le plus proche se trouvait à 100 kb (Nakayama et al. 2004).

FEB7

Récemment, une nouvelle famille avec CF et crises afébriles, transmission autosomale dominante et pénétrance incomplète de la maladie a été liée à la région chromosomique 21q22. Quelques gènes de la région codant pour des canaux ioniques ont été séquencés. Mais pour l'instant aucun gène muté n'a été découvert (Hedera et al. 2006) (*Figure 23*).

Figure 23 Arbre généalogique de la famille FEB7 (Hedera et al. 2006)

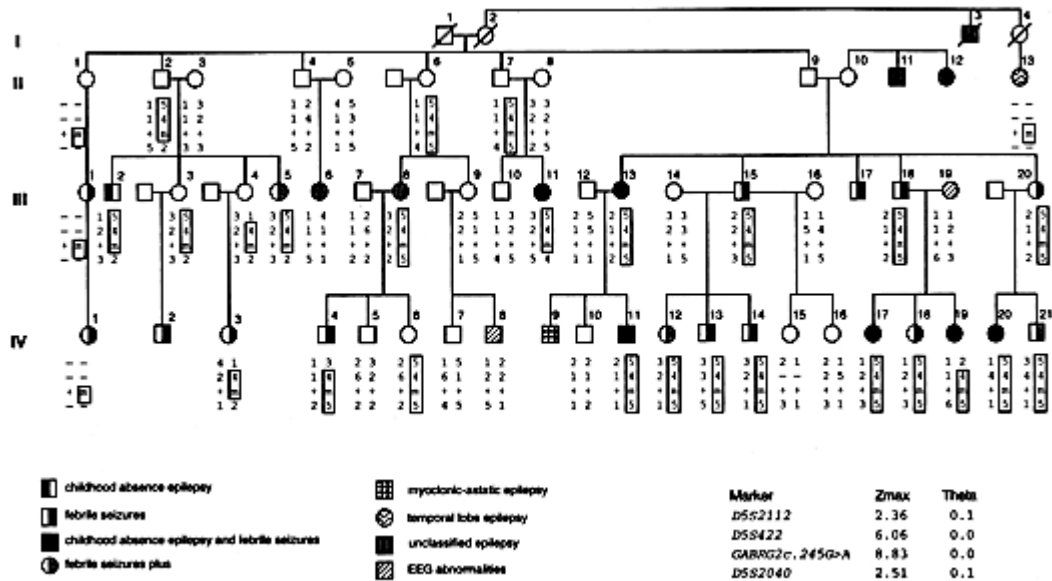


- Individu malade avec des CF récurrentes ; ◐ Individu malade avec des CF récurrentes et des crises afébriles ;
- ◑ Individu malade avec une seule CF

FEB8

OMIM (#611277) rapporte un 8^{ème} locus FEB sur le chromosome 5q31.1-33.1. La première famille citée est celle de l'équipe Wallace, déjà évoquée plus haut dans les GEFS⁺3. Comme expliqué auparavant, elle n'est pas une GEFS⁺ au sens strict, car les absences et les CF ont un âge de début et une physiologie distincts, d'après les auteurs. Elle présenterait donc des caractéristiques d'une famille EGI. Pourtant la mutation R43Q de *GABRG2* a été trouvée chez tous les affectés. Cette découverte suggère que la mutation a des effets âge-dépendants sur les différents réseaux neuronaux, ce qui influence ces phénotypes cliniques distincts (Figure 24).

Figure 24 Arbre généalogique de la famille FEB8 (Wallace et al. 2001)



Cette même mutation a été retrouvée dans une autre famille avec CF et absences. Les auteurs suggèrent que le phénotype *absences* est certainement dû à l'interaction de *GABRG2* et d'un ou d'autres gènes dans cette famille, alors que le phénotype CF est vraiment dû à la mutation R43Q de *GABRG2* (Marini et al. 2003).

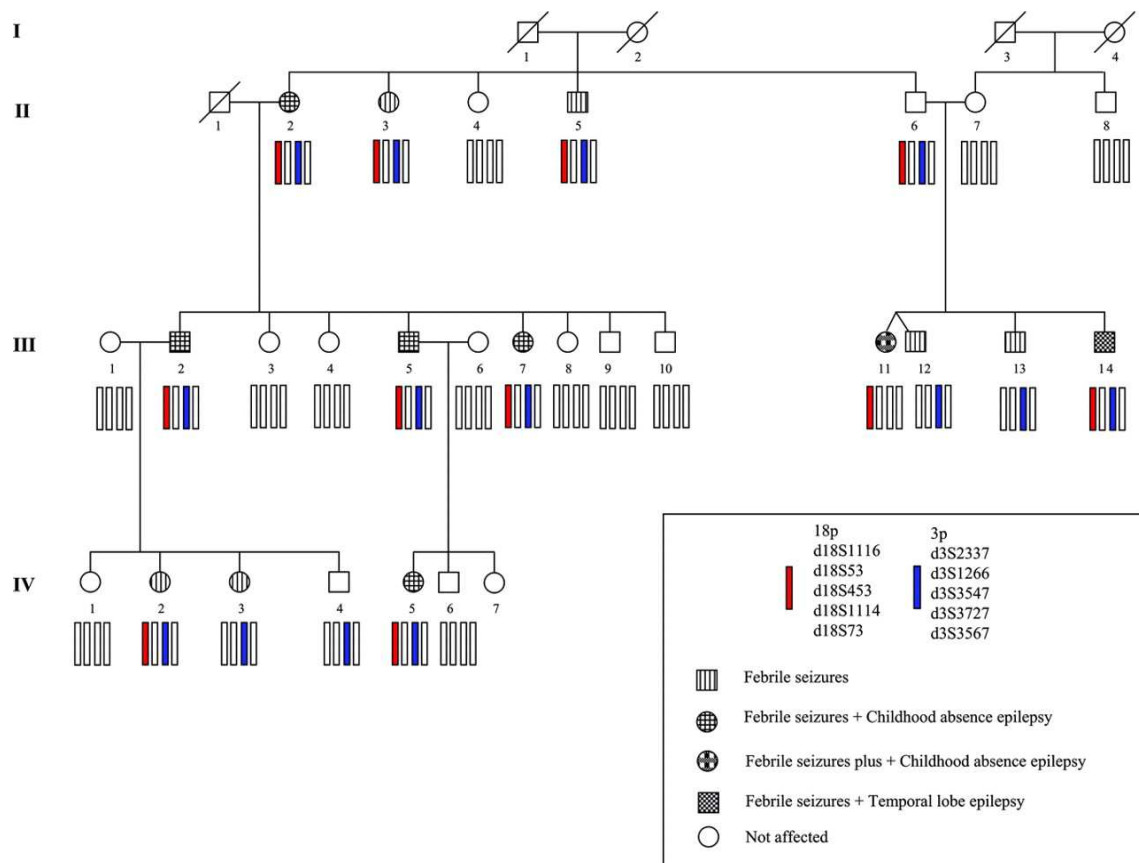
Une étude mutationnelle de *GABRG2* par SSCP dans une cohorte de patients avec absences, a mis en évidence une mutation dans un site donneur d'épissage. Cette mutation, qui devrait produire une protéine non-fonctionnelle, co-ségrège avec la maladie dans une famille dans laquelle le père a présenté des CF isolées et les deux enfants des CF et des absences (Kananura et al. 2002).

Récemment, une nouvelle étude mutationnelle de *GABRG2* dans une cohorte de CF, GEFS⁺ et absences a identifié une mutation hétérozygote (R139G) dans une famille avec 2 enfants et leur père souffrant de CF isolées. Dans cette famille, la pénétrance paraît incomplète, car le grand-père sain porte aussi cette mutation faux-sens (Audenaert et al. 2006).

FEB9

Le dernier locus FEB connu à ce jour se trouve sur le chromosome 3p24.2-23. Dans une famille le trait est constitué de CF isolée ou associée à une ELT pharmacorésistante avec sclérose hippocampique et d'absences. Une étude pangénomique ainsi qu'une analyse haplotypique de la famille a montré une liaison au chromosome 3, mais les auteurs ne pouvaient pas exclure un segment génomique sur le chromosome 18p, qui est le locus FEB6, discuté plus haut. Six gènes candidats de la région 3p24.2-23 et *IMPA2* du locus 18p ont été séquencés, et mais aucune mutation n'a été mise en évidence. Par conséquent, Nabbout et son équipe suggère que le locus sur le chromosome 18 pourrait agir comme un gène modificateur, alors que le locus sur le chromosome 3 détermine le phénotype CF de cette famille (Nabbout et al. 2007).

Figure 25 Arbre généalogique de la famille FEB9 (Nabbout et al. 2007)



Le locus FEB9 clôt les études familiales des CF. Le nombre de loci de susceptibilité découverts pour cette maladie souligne l'existence de l'hétérogénéité génétique des CF. Comme évoqué plus haut, les études familiales et de jumeaux ont permis de mettre en évidence une composante polyfactorielle chez des patients isolés avec CF, car chez ces cas, les CF sont

considérées comme un trait complexe. C'est pourquoi, afin d'essayer d'identifier des gènes de susceptibilité, des études d'association cas-témoins ont été menées chez des cas de CF isolés. Voici les études d'associations pour les CF publiées à ce jour.

- *GABRG2* – Comme évoqué plus haut, des mutations de ce gène ont été décrites dans des familles de GEFS⁺ (Baulac et al. 2001a ; Harkin et al. 2002) et FEB8 (Audenaert et al. 2006 ; Kananura et al. 2002 ; Marini et al. 2003 ; Wallace et al. 2001). Une première étude d'association a été effectuée dans une population japonaise. Deux variants polymorphes de *GABRG2* ont été testés. Les résultats statistiquement positifs suggèrent que ce gène pourrait être un des facteurs de susceptibilité pour les CF (Chou et al. 2003b). Une seconde étude d'association japonaise a testé trois polymorphismes exoniques. Les résultats indiquent que ces variations génomiques ne sont pas significativement impliquées dans l'étiologie des CF dans cette cohorte de malades japonais (Nakayama et al. 2003). Par conséquent, d'autres études de liaisons et d'associations, dans des populations d'ethnies différentes, devraient être entreprises afin de pouvoir estimer le rôle de *GABRG2* dans l'étiologie des CF.

- *Interleukine-1 β (IL-1 β)* – IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire majeure qui joue un rôle dans la réponse inflammatoire et la fièvre. Par conséquent elle peut jouer un rôle dans le développement des CF. Une première étude a rapporté une augmentation statistiquement significative de l'allèle 2 du promoteur de *IL-1 β (IL-1 β -511T)* chez des enfants finlandais. De plus, cet allèle a été associé *in vitro* à une augmentation de production d'interleukine-1. Par conséquent, les patients possédant l'allèle 2, pourraient avoir une augmentation de réaction pro-inflammatoire durant un épisode de fièvre. Cette réaction pro-inflammatoire pourrait être un facteur de prédisposition aux CF (Virta et al. 2002). Une seconde étude a aussi rapporté un résultat positif dans une population japonaise de CF (Kira et al. 2005). Pourtant, cette association n'a pas été retrouvée dans les études suivantes : une association négative a été montrée dans un groupe allemand de CF (Tilgen et al. 2002). Une autre équipe a trouvé un résultat négatif chez des cas taïwanais (Chou et al. 2003c). Une troisième équipe a publié un résultat négatif chez des CF d'origine turque (Haspolat et al. 2005). Cette divergence de résultats est peut-être due aux variations ethniques et/ou phénotypiques de la maladie. Tsai et ses collègues ont testé les allèles de l'exon 5 de *IL-1 β* . Ces derniers ne seraient pas des marqueurs pertinents dans la susceptibilité aux CF, car aucune association positive n'a été trouvée dans leur cohorte de patients japonais (Tsai et al. 2002b).

- *Interleukine-1RA (IL-1RA)* – L'antagoniste du récepteur IL-1 est une cytokine anti-inflammatoire qui entre en compétition avec IL-1 β et IL-1 α lors de sa liaison aux récepteurs IL-1. Toujours le groupe de Tsai a rapporté une association positive entre l'allèle 1 et la

susceptibilité aux CF chez des patients japonais (Tsai et al. 2002b). Pourtant, une seconde équipe n'a pas confirmé ce résultat dans leur cohorte turque (Haspolat et al. 2005).

- *Interleukine-1 α (IL-1 α)* – IL-1 α est aussi une cytokine pro-inflammatoire. De plus, elle est l'agoniste de IL-1 β , car ces deux cytokines agissent sur le même récepteur IL-1. Le polymorphisme *IL-1 α -889* a été testé dans la population turque citée précédemment, mais aucune association positive n'a été trouvée (Haspolat et al. 2005).

- *Interleukine-4 (IL-4)* – Cette protéine est une cytokine avec des propriétés anti-inflammatoires et qui inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires, telle qu'IL-1 β . Une étude d'association a testé le polymorphisme de l'intron 3 d'*IL-4* chez des cas atteints de CF. Aucune association n'a été trouvée entre ce polymorphisme et la maladie (Tsai et al. 2002a).

- *KCNQ2* – Des mutations dans ce gène, codant pour une sous-unité du canal potassique voltage-dépendant, ont été rapportées dans les CNFB (Biervert et al. 1998 ; Singh et al. 1998). Cette sous-unité contribue au courant M, qui régule le seuil bas de l'excitabilité électrique dans le SNC. Chou et al. ont effectué une étude d'association pour investiguer si les polymorphismes du gène *KCNQ2* pouvaient être des marqueurs de susceptibilité aux CF. Les résultats ont suggéré que ces variations n'étaient pas de bons marqueurs pour la prédiction de la susceptibilité aux CF (Chou et al. 2002).

- *CHRNA4* – Ce gène code pour la sous-unité $\alpha 4$ du récepteur nicotinique acétylcholine neuronal. Il a été identifié pour la première fois dans l'épilepsie autosomale dominante nocturne du lobe frontal (Steinlein et al. 1997). Les mutations découvertes dans ce gène semblent causer l'excitation neuronale. Par conséquent, ce gène pourrait avoir un rôle dans le développement des CF. Une première étude cas-témoins dans une population chinoise a démontré une association entre le gène *CHRNA4* et les CF. Ces résultats suggèrent que ce gène ou un gène très proche pourrait être un des facteurs de susceptibilité pour les CF (Chou et al. 2003a). Mais une deuxième étude dans une population australienne n'a pas retrouvé cette association (Mulley et al. 2004). Il est important de noter que ces deux études d'associations ont été réalisées dans deux populations indépendantes. Par conséquent, les différences ethniques et géographiques pourraient expliquer les divergences de résultats (Mulley et al. 2004).

- *CHRN2* – Ce gène code pour la sous-unité $\beta 2$ du récepteur nicotinique. Le type de récepteur à l'acétylcholine le plus représenté dans le cerveau semble être composé des sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 2$. Une étude d'association dans une population taïwanaise a montré que les fréquences génotypiques et alléliques n'étaient pas statistiquement différentes dans le groupe de cas et dans le groupe de témoins (Peng et al. 2004).

▪ *BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)* – Ce gène code pour un facteur neurotrophique dérivé du cerveau qui augmente l'excitabilité neuronale. Il est surexprimé dans des zones impliquées dans l'épileptogenèse. Un variant de *BDNF*, Val66Met, a été identifié et associé à un trafic intracellulaire et à une régulation de sécrétions anormaux de la protéine (Egan et al. 2003). Ainsi, il a été testé dans une étude cas-témoins taiwanais, mais les résultats ont montré que ce polymorphisme de *BDNF* n'était pas associé aux CF (Chou et al. 2004).

▪ *CSBKIG2* – Ce gène code pour l'isoforme casein kinase I gamma 2, qui est un membre de la grande famille des casein kinases I (CKI). Ces dernières peuvent affecter le développement du cerveau et être associées au trafic vésiculaire, ainsi qu'à la libération des neurotransmetteurs des petites vésicules synaptiques. *CSBKIG2* a été choisi comme gène candidat aux CF, car il se trouve au locus FEB2 (19p13.3). Un SNP particulier ainsi qu'un haplotype à 2 SNP sont significativement associés aux CF dans une cohorte de patients chinois (Yinan et al. 2004).

▪ *SEZ-6 (Seizure-Related 6)* – Ce gène a été identifié pour la première fois dans une collection de cDNA de neurones corticaux primaires de souris. Ces derniers étaient traités au pentylentetrazole, qui est un anti-convulsivant. *SEZ-6* a montré une augmentation d'expression en présence de pentylentetrazole. Ainsi, ce gène a été relié aux crises épileptiques (Shimizu-Nishikawa et al. 1995). *SEZ-6* est exprimé dans les neurones corticaux et code pour une protéine transmembranaire avec de multiples motifs (Herbst and Nicklin 1997). Un groupe chinois a étudié l'ADN de 60 CF et 15 contrôles afin de rechercher des mutations dans ce gène. Aucune mutation n'a été trouvée chez les contrôles et 21 des malades (35%) présentaient une mutation, le plus souvent sous forme hétérozygote (Yu et al. 2007). Cette association demande encore confirmation dans d'autres groupes plus grands de cas-témoins de même ou de différente ethnicité.

1.7.5 L'épilepsie du lobe temporal (ETL)

CF, sclérose hippocampique et ETL

L'étude épidémiologique de l'équipe de Falconer, basée sur un groupe de 100 patients ayant subi une chirurgie pour une ELT, a mis en lumière deux points importants (Falconer et al. 1964) :

- (1) La sclérose hippocampique est le fait le plus marquant la pathologie de ces patients.

(2) Une proportion significative de patients avec sclérose hippocampique ont des antécédents de CF prolongées dans la petite enfance (30% des patients avec sclérose hippocampique *vs* 6% des patients sans sclérose hippocampique).

Ce deuxième point a été confirmé par plusieurs études rétrospectives (Cendes et al. 1993 ; Kuks et al. 1993 ; Maher and McLachlan 1995). Pourtant, d'autres études de populations ont montré des résultats différents (Camfield et al. 1994 ; Nelson and Ellenberg 1976 ; Tarkka et al. 2003). Par conséquent, l'interprétation de ces observations reste controversée. La première possibilité serait que les CF précoces endommagent l'hippocampe et serait, par conséquence, la cause de la sclérose hippocampique. La deuxième possibilité serait qu'à cause d'un hippocampe endommagé lors d'une blessure pré ou périnatale ou par une prédisposition génétique, l'enfant développerait des CF prolongées.

Une étude d'IRM a montré que des individus, appartenant à une famille avec CF, présentaient de discrètes anomalies de l'hippocampe, même parmi les personnes asymptomatiques. Ceci suggère que des dommages préexistants peuvent conduire aux CF ou à une ELT (Fernandez et al. 1998). Une autre étude d'IRM a montré que des CF prolongées et focales peuvent occasionnellement produire de graves blessures à l'hippocampe et par conséquent évoluer vers une atrophie chez certains enfants (VanLandingham et al. 1998). De plus récentes études IRM, dans des familles avec des épilepsies méso-temporales (Kobayashi et al. 2002 ; Kobayashi et al. 2001), ont indiqué que les anomalies hippocampiques, incluant l'atrophie, ne sont pas la seule conséquence des crises répétées et que des mécanismes génétiquement déterminés pourraient jouer un rôle important dans le développement de dommages de l'hippocampe, car dans certaines familles, il existe des membres avec des anomalies hippocampiques et qui ne sont pas affectés par la maladie. Ce phénomène pourrait donc être héréditaire chez ces cas familiaux (Kobayashi et al. 2002). De plus, des évidences expérimentales actuelles ont suggéré que des CF prolongées ne pouvaient pas être suffisantes à elles seules pour causer une épilepsie subséquente. Ces CF maintiendraient plutôt de façon permanente un seuil de crises épileptiques en introduisant une réorganisation axonale à long terme dans la formation hippocampique immature, ce qui, en retour pourrait faciliter une seconde blessure indépendante (Bender et al. 2003).

La prédisposition génétique apparaît comme être un important facteur causal pour la sclérose hippocampique et pour les syndromes subséquents spécifiques présentant des CF. Par conséquent, la relation entre les CF et le développement d'une épilepsie ultérieure est fréquemment génétique et il y existe un nombre de gènes syndrome-spécifique pour les CF. Comme évoqué précédemment, le syndrome GEFS⁺ comprend aussi des ELT (Singh et al. 1998). Récemment, l'équipe de Scheffer a rapporté trois familles GEFS⁺ avec ELT et une mutation

spécifique de *SCN1B* (C121W) (Scheffer et al. 2007). Il existe aussi des familles dans lesquelles des CF sont associées à une ELT subséquente (Baulac et al. 2001b ; Depondt et al. 2002). L'une d'entre elle montre une hérédité digénique probable : les affectés avec CF et ELT partagent un haplotype commun pour les chromosomes 1q25-q31 et 18qter (Baulac et al. 2001b).

Etudes familiales

L'ELT, sous-divisée en mésiale, latérale et néocorticale, est une maladie typiquement sporadique ou spontanée. Pourtant, il existe des familles dans lesquelles plusieurs individus souffrent d'ELT. Par conséquent, il est de plus en plus évident que les variations génétiques jouent un rôle dans l'étiologie des ETL (Baulac et al. 2004). Cette hypothèse est appuyée par le fait que plusieurs formes familiales d'ELT ont été rapportées.

- *L'épilepsie latérale temporale autosomale dominante* où la région latérale du lobe temporal est incriminée. Ce syndrome a été localisée sur le chromosome 10q24 (Brodtkorb et al. 2002 ; Ottman et al. 1995 ; Poza et al. 1999) et des mutations dans le gène *LGII* (*leucine rich, glioma inactivated 1*) ont été rapportées dans plusieurs familles (Gu et al. 2002 ; Hedera et al. 2004 ; Michelucci et al. 2003 ; Pisano et al. 2005). La protéine LGII joue un rôle dans la migration neuronale et l'organisation corticale (Kalachikov et al. 2002). De plus, certaines mutations rapportées produisent des protéines tronquées et des pertes de fonction, ce qui expliquerait l'épileptogenèse de ce type d'épilepsie. Toutefois, dans certaines familles, aucune mutation n'a été trouvée (Ayerdi-Izquierdo et al. 2006 ; Berkovic et al. 2004 ; Chabrol et al. 2007 ; Morante-Redolat et al. 2002). Ces résultats suggèrent une hétérogénéité génétique de la maladie.

- *L'épilepsie familiale mésiale du lobe temporal* où certaines formes familiales ne présentent aucune anomalie hippocampique, ni aucune association avec les CF. Le symptôme le plus commun dans cette épilepsie est le sentiment de « déjà vu ». La maladie possède un mode héréditaire autosomal dominant avec une pénétrance incomplète (Gambardella et al. 2000). Peu de grands arbres généalogiques ont été rapportés et aucune réelle localisation n'a été trouvée dans certaines familles (Maurer-Morelli et al. 2006). Pourtant, récemment, un locus liée à l'épilepsie familiale mésiale du lobe temporal a été découvert sur le chromosome 4q13.2-q21.3 (Hedera et al. 2007).

Etudes d'associations

Depuis quelques années, beaucoup d'études ont essayé de montrer des associations entre des polymorphismes de gènes spécifiques et ETL dans de larges cohortes de cas sporadiques. Mais rien de définitif n'a été établi, car ces études manquent de puissance et n'ont pas été confirmées.

- *GABA (B) récepteur 1 (GABA(B[1]))* code pour un récepteur inhibiteur qui lie le GABA. Les récepteur GABA(B) sont des récepteurs-protéine G qui contrôlent la libération de neurotransmetteurs et la neurotransmission excitatrice postsynaptique silencieuse. Les récepteurs GABA(B) fonctionnent en formant un assemblage hétéromérique de sous-unités GABA(B) récepteur 1 [GABA(B[1])] et 2. Les récepteurs GABA(B) sont fortement exprimés dans le système limbique, spécialement dans les cellules pyramidales des structures CA1 et CA3 de la formation hippocampique et dans les cellules granulaires du gyrus denté. Plusieurs études ont montré l'implication de ce récepteur dans la pathogenèse des ELT humaines. Billington et son équipe ont montré une surexpression de l'ARNm de GABA(B[1]) dans des hippocampes de patients souffrant de sclérose hippocampique et d'ELT (Billington et al. 2001). Peters et al. ont testé le gène *GABA(B[1])* chez des patients EMJ, car il est localisé dans une région de susceptibilité aux EMJ (6p21.3). Ils ont découvert quelques polymorphismes, dont la mutation faux-sens G1465A dans l'exon 7. Elle amène à une substitution d'acide aminé Gly489Ser (Peters et al. 1998). Sur ces bases moléculaires, Gambardella et al. ont testé ce polymorphisme dans une population de cas ELT. Ils ont montré une association entre le phénotype A/G et le trait. Selon eux, ce polymorphisme conférait une grande susceptibilité aux ELT (Gambardella et al. 2003a). Pourtant, plusieurs études ultérieures n'ont pas retrouvé cette association positive dans des cohortes de ELT caucasiens (Cavalleri et al. 2005 ; Ma et al. 2005 ; Salzmann et al. 2005 ; Stogmann et al. 2006 ; Tan et al. 2005) et chinois (Ren et al. 2005). Mais une étude encore sous-pressionne rapporte un résultat statistiquement significatif dans un échantillon de patients argentins avec des ELT et sclérose hippocampique. Les auteurs expliquent leur résultat par le fait que leur population est similaire à celle de la première étude de Gambardella, car dans leur pays, il existe des flux migratoires en provenance d'Italie (Kauffman et al. 2008).

- *PDYN* est le gène de la prodynorphine qui code pour un peptide anti-convulsivant, la dynorphine. Il est un bon candidat comme gène suppresseur de crises, car il pourrait avoir un rôle modulateur dans la susceptibilité à l'ETL (Stogmann et al. 2002). L'équipe de Zimprich a décrit un polymorphisme dans le promoteur du gène. Cette variation montre une à quatre répétitions d'un élément de 68 pb. Ce dernier contient un site d'attachement par répétition

pour le facteur de transcription AP-1. Lors de l'activation de ce gène par le complexe AP-1, l'allèle H (3 ou 4 répétitions) est associé à une augmentation de l'expression du gène, alors que l'allèle L (1 ou 2 répétitions) montre une baisse de l'expression génique (Zimprich et al. 2000). Stogamm et ses collaborateurs ont montré que des patients avec une histoire familiale de crises et homozygotes pour l'allèle L ont un risque plus élevé pour l'ETL (Stogmann et al. 2002). Mais ce résultat n'a pas été répliqué dans trois populations caucasiennes indépendantes (Cavalleri et al. 2005 ; Gambardella et al. 2003b ; Tilgen et al. 2003).

- *ApoE* code pour l'apolipoprotéine de type E. Elle serait impliquée dans la réponse hippocampale aux lésions : les astrocytes répondent aux dégâts neuronaux en synthétisant et en relâchant ApoE. Trois isoformes majeures ont été identifiées $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$ (Blumcke et al. 1997). L'allèle $\epsilon 4$ prédispose au développement de plaques β -amyloïde. Il est ainsi un déterminant génétique à la susceptibilité de la maladie d'Alzheimer (Schellenberg, 1995). La première étude d'association entre *ApoE*, ETL et âge de début n'a pas trouvé de résultat positif (Gambardella et al. 1999). Pourtant, lors d'une seconde étude, une association significative a été montrée entre un âge précoce de la maladie et la présence de l'allèle $\epsilon 4$ (Briellmann et al. 2000). Trois autres études suivantes n'ont pas répliqué ce résultat (Cavalleri et al. 2005 ; Gambardella et al. 2005 ; Yeni et al. 2005).

- *L'interleukine-1 (IL-1)* a deux formes distinctes : IL-1 α et IL-1 β . Elles se lient au même récepteur IL-1. La protéine *Interleukin receptor antagonist* (IL-1RA) se lie aussi à ce récepteur et inhibe la liaison d'IL-1 α et IL-1 β . Ces dernières sont impliquées dans diverses réponses immunes, processus inflammatoires, apoptotiques et hématopoïétiques. Elles sont produites par les monocytes et les macrophages. De plus, IL-1 α et IL-1 β sont aussi synthétisées par les cellules gliales et neuronales (Hopkins and Rothwell 1995). Leur implication dans le SNC a été démontrée par la présence d'une haute intensité en récepteurs IL-1 dans les couches moléculaires et granulaires du gyrus denté (Ban et al. 1991). Ceci suggère un rôle physiologique pour IL-1 dans l'hippocampe. Tous ces arguments sont en faveur de l'implication de certains SNP des gènes *IL-1 α* , *IL-1 β* et *IL-1RA* dans les ETL (Kanemoto et al. 2000). Le premier variant allélique se trouve dans *IL-1 α* : *IL-1 α -889*. Ce SNP en 5' de la région régulatrice possède 2 allèles, 1 et 2. Une association entre la maladie d'Alzheimer et l'allèle 2 a été publiée (Nicoll et al. 2000). Les deux SNP suivant se trouvent dans le gène *IL-1 β* : *IL-1 β -511*, un site de liaison AP-2 et *IL-1 β +3953*, qui n'a pas de fonction connue (Dominici et al. 2002). Le dernier SNP appartient au gène *IL-1RA*, *IL-1RA-int2*, qui est un polymorphisme de répétitions en tandem de longueur variable (VNTR, acronyme anglais) localisé dans l'intron 2. Ce marqueur génique est une

séquence conservée de 86 pb, qui contient un site probable de liaison protéique et pourrait influencer l'expression du gène (Vamvakopoulos et al. 2002).

Interleukin 1 α a été testé par Kanemoto et al.. Ils ont effectué une étude d'association entre *IL-1 α -889* et ELT. Ils ont divisé leur groupe de cas japonais en deux sous-groupes : ELT avec sclérose hippocampique (ELT-HS⁺) et ELT sans sclérose hippocampique (ELT-HS⁻). Ils n'ont pas trouvé d'association positive dans ces deux sous-groupes (Kanemoto et al. 2000). Un groupe turc a testé ce même SNP de *IL-1 α* dans des groupes indépendants de ELT-HS⁺ et de ELT sans antécédents de convulsions fébriles (ELT-CF⁻). Des résultats non-significatifs ont été rapportés (Ozkara et al. 2006).

Interleukin 1RA a aussi été testé par Kanemoto et ses collègues dans les mêmes groupes de patients et de contrôles, cités ci-dessus. Le SNP *IL-1RA-int2* n'a pas été montré comme associé dans cette étude (Kanemoto et al. 2000).

Interleukin 1 β – SNP, *IL-1 β +3953* et *IL-1 β -511* – a été étudié par le groupe de Kanemoto dans leurs populations. Ils ont trouvé une association positive pour le SNP *IL-1 β -511* et ELT-HS⁺, où la fréquence du génotype 2-2 était plus élevée que dans le groupe contrôle. Dans un groupe plus grand de patients, les auteurs ont confirmé leur résultat positif (Kanemoto et al. 2000). Une équipe chinoise, trois études caucasiennes et le groupe turc cité plus haut n'ont pas retrouvé d'association significativement positive dans leur cohorte respective (Buono et al. 2001 ; Cavalleri et al. 2005 ; Heils et al. 2000 ; Jin et al. 2003 ; Ozkara et al. 2006). Le groupe turc a aussi testé le SNP *IL-1 β +3953* dans leur cohorte, mais ils n'ont pas trouvé d'association positive (Ozkara et al. 2006).

▪ *PRNP* code pour une protéine prion, qui est une sialoglycoprotéine membranaire liée au cuivre exprimée dans le SNC. Sa localisation est principalement présynaptique. Bien que sa fonction exacte ne soit pas encore bien comprise, elle semble impliquée dans la protection contre le stress oxydatif, l'adhésion cellulaire, la différenciation et la survie dans le SNC. Un variant, Asn171Ser, a été rapporté par l'équipe de Walz comme associé au développement des ELT réfractaires avec SH dans une cohorte de patients brésiliens, avec des ancêtres européens et africains. Les auteurs ont observé le variant chez 23% des patients, mais ne l'ont pas détecté chez les contrôles (Walz et al. 2003). Une seconde équipe n'a pas retrouvé cette association (Cavalleri et al. 2005). Récemment, une troisième équipe a étudié ce gène dans une cohorte de patients ELT avec une forme peu sévère d'ELT non familial. L'analyse statistique a révélé une différence modérée de la distribution du variant Met129Val entre les cas et les

contrôles. De plus, l'allèle 129Val est plus fréquent chez les femmes ELT que dans le groupe contrôle (Labate et al. 2007).

- *5-HTT* code pour le transporteur de la sérotonine qui est un important neurotransmetteur et neuromodulateur. 5-HTT est donc un régulateur clé du niveau de neurotransmission sérotonénergique, car il est le facteur le plus important dans l'inactivation de la sérotonine. Ce transporteur est une cible pour les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine qui a une action anticonvulsivante. Une équipe italienne a testé un VNTR dans le deuxième intron du gène, qui peut jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle du gène de manière allèle-dépendante. Les longueurs communes de ce VNTR sont 9, 10 et 12-répétitions. L'allèle 12-répétitions paraît avoir plus de propriétés activatrices de transcription que l'allèle 10. Les auteurs ont montré que les patients ELT avaient une fréquence statistiquement plus basse pour l'allèle 10-répétitions que les contrôles (Manna et al. 2007).

- *ABCB1* est un gène qui code pour la P-glycoprotéine. Cette dernière fait partie d'une famille de protéines de transport non spécifique de diverses substances, qui joue un rôle prédominant dans la résistance à divers traitements dont les antiépileptiques. Le groupe de Zimprich a identifié un haplotype particulier, constitué de 3 SNP dans les exons 12, 21 et 26 d'*ABCB1*, plus fréquemment présent chez les patients ELT fortement pharmaco-résistants comparés au groupe ELT répondant le mieux au traitement (Zimprich et al. 2004).

1.8 Stratégies de génétique moléculaire utilisées dans l'analyse des épilepsies

La revue des différentes études ci-dessus montre que dans le domaine de la génétique des épilepsies, aussi bien des études d'associations que des études de liaison, ont été réalisées. Même si l'identification de mutations pour de rares syndromes épileptiques monogéniques a été couronnée de succès, cela contraste avec la lenteur des progrès pour la plus part des syndromes épileptiques communs. Voilà pourquoi, le débat à propos de la meilleure approche à adopter face à ces épilepsies polygéniques et complexes existe depuis longtemps et est toujours d'actualité.

1.8.1 Stratégies biologiques

La découverte des *polymorphismes*, ou variations de l'ADN, a permis de les utiliser comme marqueurs génétiques dans des études de liaison et d'association. Historiquement, les premières variations découvertes s'appelaient *RFLP* (*Restriction Fragment Length*

Polymorphisms) ou *polymorphismes de longueur de fragments de restriction*. Dans les années quatre-vingt, ils ont été utilisés pour étudier les maladies humaines héréditaires, cartographier le génome humain, et les premières études de liaison génétique (Botstein et al. 1980). Ces derniers ont été vite remplacés par un deuxième type de marqueurs, les VNTR. Ils sont hautement polymorphiques, car ils possèdent un nombre variable de courtes répétitions en tandem (Weber and May 1989).

Actuellement, dans le domaine des maladies génétiques humaines, l'étude par microsatellites est en train de s'effacer au profit des SNP ou variation polymorphique d'une seule paire de base. Un SNP a une position bien définie sur le génome humain. Il est bi-allélique avec, pour chacune des bases alternatives, une fréquence appréciable de plus de 1% dans la population générale (Wang et al. 1998). Les SNP possèdent deux propriétés essentielles par rapport aux microsatellites : ils sont plus répandus que les microsatellites et ils sont localisés à l'intérieur même des régions codantes des gènes, ce qui peut affecter la transcription des ARN et par conséquent, la traduction en protéines.

Les avancées récentes dans le domaine des techniques d'analyse pangénomiques ont récemment permis de mettre en évidence des variations structurelles de l'ADN. Ce sont des variations de nombre de copies de fragments génomiques (*Copy Number Variants, CNV*, en anglais). Il existe différentes classes de CNV : les insertions, les délétions, ainsi que les duplications. Les CNV peuvent concerner de quelques kb jusqu'à plusieurs centaines de kb d'ADN et ainsi contenir des gènes entiers, ainsi que leur région régulatrice. Par conséquent, les CNV peuvent amener à des variations phénotypiques mais aussi à des maladies, car ils peuvent influencer l'expression des gènes directement ou indirectement par effet de position. Par conséquent, ces CNV sont apparus ces derniers mois comme pouvant jouer un rôle majeur dans la vulnérabilité à plusieurs maladies communes (Feuk et al., 2006, *Nature*, 7, 85).

1.8.2 Stratégies statistiques

Etudes de liaison et clonage positionnel

Comme vu précédemment, plusieurs études de liaisons dans des familles GEFS⁺ et CF ont été effectuées grâce aux microsatellites, mais aussi grâce aux SNP. Seuls quelques gènes, par clonage positionnel, ont été liés à ces deux syndromes (*MASS1, IMPA2, SCN1B, SCN1A, GABRG2* et *GABRD* (Audenaert et al. 2006 ; Baulac et al. 2001a ; Dibbens et al. 2004 ; Escayg et al. 2000 ; Nakayama et al. 2000 ; Nakayama et al. 2004 ; Wallace et al. 1998)). Ces résultats sont

le reflet du grand pouvoir statistique des analyses de liaison lorsqu'elles sont utilisées dans un contexte de maladies à transmission mendéliennes. Historiquement, le taux peu élevé de faux-positifs dans les études de liaisons est dû grâce au seuil rigoureux du lod score établi à 3 par Morton et ses collègues (Morton 1955). Toutefois, dans les études de liaison, il est recommandé de recruter de grandes familles. Leur provenance d'isolats populationnels endogames avec un nombre limité d'ancêtres communes sont des avantages majeurs. Ainsi, cela évite une trop grande hétérogénéité génétique entre les différents membres de la famille et cela augmente la fréquence des effets fondateurs (Risch 2000).

Durant les deux dernières décennies, les études de liaisons ont aussi permis l'identification de gènes liés à d'autres maladies à hérédité mendéliennes, différentes des épilepsies. Plusieurs de ces gènes sont aussi des formes de maladies communes comme le cancer du sein (*BRCA-1* et *-2*) et la maladie d'Alzheimer (*presenilin-1* et *-2*). L'étude de formes familiales par clonage positionnel de maladies communes est certainement ainsi un moyen d'identifier des mutations responsables de formes sporadiques. Cette approche est cependant limitée car la plupart des cas de maladies communes sont vraisemblablement déterminée par plusieurs variants génétiques ayant chacun un effet faible. L'analyse de liaison qui requiert une forte corrélation entre le génotype et le phénotype est donc inadaptée (Risch 2000).

Etudes d'associations familiales

Dans un premier temps, les études d'associations familiales ont été utilisées afin d'éviter le biais de stratification ethnique potentiel des études cas-témoins. Ce biais est dû au fait que les fréquences alléliques peuvent varier entre les deux cohortes en fonction de leur origine ethnique différente. Il existe deux types de méthodes : les triades et les paires de germains.

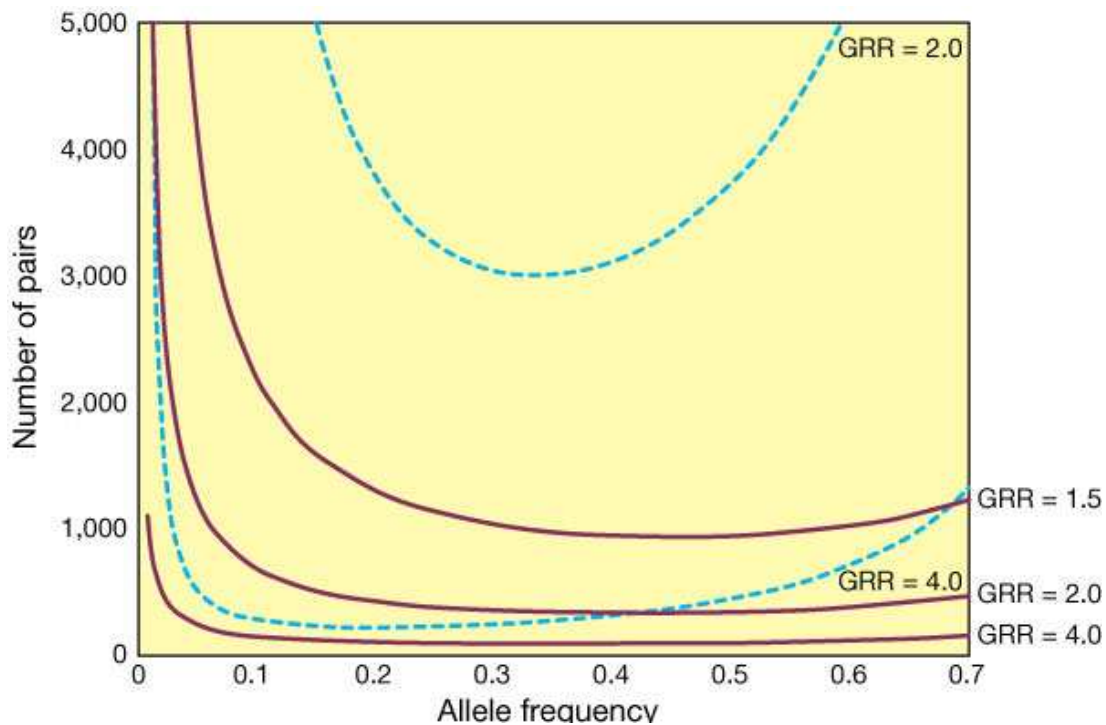
- *Les études de triades* (cas-parents contrôles ou trios) sont fondées sur l'analyse de familles nucléaires qui comprend le malade ainsi que ses deux parents. Elle est utile pour étudier les effets génétiques d'une maladie qui se basent sur le génotype de l'individu malade. Cette méthode est hautement informative et offre une robustesse face à de fausses conclusions induites par une structure génétique cachée. De plus, cette méthode est utile pour étudier les effets conjoints des gènes candidats et de l'environnement. En revanche, dans le cas des épilepsies, les études de trios peuvent amener à un biais de sélection pour des épilepsies à début précoce, car dans ce cas, le matériel génétique, provenant des deux parents, est plus facilement disponible que dans le cas des épilepsies à début tardif. Alors, l'étude comporte un biais de recrutement qui n'est pas représentatif de la maladie et qui doit être corrigé. Un dernier

problème se pose lors de l'utilisation de ce genre d'études : elles manquent souvent de puissance, car il est difficile de recruter un nombre suffisant de triades pour que le résultat soit significatif.

▪ *Les études de paires de germains (sib-pair)* repose uniquement sur les paires de germains atteints. Elle consiste à comparer les allèles reçus par les paires de germains (frères/sœurs) malades à ceux de leurs deux parents. Cette méthode est basée sur les allèles communs et identiques par descendance. Donc, sa seule contrainte est de pouvoir reconnaître sans équivoque l'origine paternelle et maternelle des allèles, dont les plus informatifs se situeront proche du locus de la maladie. De plus, cette stratégie évite d'avoir à faire des hypothèses sur le mode de transmission de la maladie. Par ailleurs, elle permet de contourner le problème de la pénétrance incomplète, puisque seuls les sujets atteints sont pris en considération. En revanche, elle suppose l'absence de cas non génétiques, de sorte que sa puissance est considérablement diminuée si la proportion de phénocopies est élevée. Le bémol de cette méthode est le nombre de paires à étudier. Il dépend du risque associé à l'allèle de susceptibilité et de sa fréquence dans la population d'origine. Par conséquent, il peut aller de quelques dizaines à quelques milliers de paires. Donc, ces études ont vraiment tendance à manquer de puissance. Ceci explique pourquoi cette méthode n'est pas fréquemment utilisée. De plus, la plupart des maladies sélectionnées pour ce genre d'études sont les maladies à âge de début précoce.

Les résultats des deux méthodes précédentes pour les maladies non-mendéliennes ont été décevants, faute d'un nombre suffisant de familles recrutées. C'est pourquoi, à l'heure actuelle, l'approche de l'étude d'association cas-témoins est privilégiée. Risch a établi un graphique qui montre le nombre de pairs qu'il faut recruter dans une configuration *sib-pair* comparée à une configuration *cas-témoins* en fonction de la fréquence allélique. Ainsi, il démontre que les études *sib-pair* perdent énormément de pouvoir statistique par rapport aux études *cas-témoins*, car pour un risque relatif de la maladie à 2 et une fréquence allélique de 0.3, il faut moins de 1'000 pairs *cas-témoins*, alors qu'il faut plus de 3'000 *sib-pairs* (Risch 2000) (*Figure 26*).

Figure 26 Comparaison entre études *sib-pair* et *cas-témoins* (Risch 2000)



Comparaison entre études sib-pair (ligne pointillée) et cas-témoins (ligne pleine), avec GRR = Risque relatif du génotype.

Etudes d'associations cas-témoins

A l'heure actuelle, dans le domaine des épilepsies communes et multifactorielles, malgré des premières études de réplication négatives et peu de résultats convaincants, il semblerait que les études cas-témoins soient la méthode de choix pour comprendre leurs bases génétiques.

Les études d'associations comparent la fréquence d'allèles spécifiques chez des cas affectés comparés à des contrôles sains. Un allèle est dit associé à une maladie si sa fréquence diffère entre les cas et les témoins plus que ne le prédirait la chance (Lander and Schork 1994), prouvant ainsi que les contrôles sont représentatifs de la population testée pour tous les aspects autres que le statut malade. Malgré un résultat statistiquement significatif, celui-ci n'est pas suffisant pour qu'il y ait association, car il faut tenir compte du déséquilibre de liaison (DL) (Page et al. 2003). Un DL signifie qu'il existe une association plus fréquente que ne le voudrait le hasard entre des allèles particuliers de deux loci distincts. Il s'agit d'un phénomène fréquent qui se produit en l'absence de sélection, d'hétérogénéité de la population, de mariages non dus au hasard ou d'autres facteurs de confusion. Ce phénomène reflète généralement une liaison génétique très étroite entre ces deux loci, due à une proximité physique sur le même chromosome. Cette liaison a tendance à s'amenuiser avec le temps, en raison des phénomènes de recombinaison. Par

conséquent, en raison d'un DL entre deux allèles, le premier peut être trouvé associé, alors qu'en réalité, c'est le second variant en DL qui est réellement pathogénique et causal. De plus, une association peut se produire par chance à cause de la faiblesse méthodologique utilisée. Par conséquent, la preuve ultime d'une association est l'étude de réplication des résultats initiaux dans différentes populations et la démonstration que l'allèle associé altère la fonction biologique amenant à la maladie (Page et al. 2003). Pourtant la non-réplication des études cas-témoins est fréquente. En voici quelques raisons.

Comme évoqué plus haut, il peut exister un *biais de stratification de population*. Ainsi, des populations peuvent présenter des distributions de fréquences alléliques différentes aux mêmes loci pour des raisons autres que l'implication de ces allèles dans l'affection étudiée. Ce biais serait causé par la constitution de la population de cas par des groupes ethniques distincts ayant des fréquences alléliques différentes pour des gènes « malades » et « non-malades ». Si la population contrôle ne reflète pas exactement la structure ethnique de la population malade, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas composées des mêmes sous-groupes de populations, alors ces deux populations peuvent avoir des fréquences alléliques différentes aux mêmes loci sans rapport avec la maladie étudiée. Il en va de même si la prévalence de la maladie n'est pas stable dans les populations de cas et de témoins. Donc, ces deux événements peuvent amener à de fausses associations entre maladie étudiée et gènes qui, en réalité, ne sont pas associés biologiquement.

Les études d'associations posent un autre problème : le choix du marqueur fonctionnel responsable de la maladie. Actuellement, les SNP sont les marqueurs les plus couramment utilisés. Chaque SNP peut être potentiellement testé pour une association avec n'importe quel phénotype épileptique. Cela amène à une avalanche d'associations positives, parmi lesquelles beaucoup seront de faux positifs dus à la chance.

Le DL, comme discuté plus haut, est un autre problème, car le génome humain est fait de blocs de DL. Donc, il est possible qu'un allèle associé à un certain phénotype se trouve à l'intérieur d'un bloc haplotypique et il sera difficile d'identifier le véritable variant causant la maladie parmi tous les SNP constituant le bloc (Tan et al. 2004). Le choix du bon variant à tester est donc primordial. Pour le déterminer, il faut tester et typer un très grand nombre de marqueurs qui ne sont pas liés les uns aux autres et qui se trouvent dans des blocs haplotypiques différents. Ces contrôles génomiques permettent aussi de voir si les marqueurs testés ont des proportions différentes dans les sous-populations, montrant ainsi si les populations de cas et de témoins ont une structure ethnique identique.

Le choix du phénotype est un aspect très important dans les études d'association. Pour des maladies plurifactorielles, il est intéressant d'étudier des phénotypes quantitatifs, constituant un

continuum de syndromes cliniques. Ces phénotypes seraient les maillons entre la complication clinique et les variants génétiques de susceptibilité. Leur étude présente plusieurs avantages. Ainsi, on peut espérer que le déterminisme génétique soit d'autant moins complexe et hétérogène que l'on se rapproche d'avantage de l'expression des gènes. Par ailleurs, ces phénotypes peuvent être mesurés avant les manifestations cliniques de la maladie, y compris dans les populations saines, et faciliter ainsi la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués. Les phénotypes quantitatifs peuvent aussi bien faire l'objet d'études d'association que d'études de liaison. La combinaison de ces deux types d'approches, consistant à étudier dans les familles la co-ségrégation de marqueurs de gènes candidats avec un phénotype quantitatif, peut se révéler un outil d'analyse puissant pour progresser dans la recherche des variants fonctionnels.

Enfin, malgré plus de 50 études d'association en épilepsie et plus de 30 gènes impliqués, l'impression générale est que les associations sont incertaines et que les répliques sont négatives. Les problèmes viennent de la possible stratification de la population utilisée, de la taille inadéquate des échantillons de cas et de témoins, de la limite de la significativité statistique et de la plausibilité biologique peu convaincante du marqueur testé. Ainsi, Tan et son équipe ont proposé une liste de recommandations à suivre lors d'études d'associations cas-témoins (Tan et al. 2004) (*Table 6*) :

Table 6 Liste de recommandations pour les études d'association en génétique des épilepsies (Tan et al. 2004)

Checklist	Notes
1. Study design	
<i>a. Clearly defined phenotype</i>	Cases should be defined by using standard ILAE classification (108), with supporting clinical, EEG, and neuroimaging data
<i>b. Defined source of controls</i>	For population controls, preference should be given to ethnically matched controls derived from the same source population as cases; family-based controls should be considered; use of two or more independent control groups is preferred, with controls selected to provide maximal similarity to cases to reduce confounding; arbitrary "off-the-shelf" controls are discouraged
<i>c. Adequate sample size</i>	Consideration must be given to effect size and allele frequencies when calculating appropriate sample sizes to provide $\geq 80\%$ statistical power; larger sample sizes are ideal; other factors such as weak effects, rare alleles, and incomplete LD should ideally be factored in as a "worst-case scenario"; replication studies should be statistically powered to detect a smaller effect size than the original positive study
2. Molecular genetics	
<i>a. Blinding</i>	Analysis should be performed blinded

Checklist	Notes
<i>b. Case-control batches</i>	If analysis is performed in batches, cases and controls should be present in each batch to avoid genotyping errors introducing bias
3. Statistical analysis	
<i>a. Clear a priori hypothesis</i>	Testing multiple hypotheses, then publishing only positive findings is disingenuous and leads to false-positive results
<i>b. Multiple testing</i>	If multiple testing with multiple markers or with independent phenotypes is done, this must be stated and corrected for; subgroup analysis should be considered only as hypothesis generating, unless the subgroup was prespecified in the study design, and biologic plausibility demonstrated
<i>c. Population stratification</i>	Cases and controls should be matched for ethnic and/or geographic origin; methods used to correct for cryptic stratification should be considered for positive studies
<i>d. Haplotypes</i>	If haplotypes are used, the method of construction must be described
4. Results	
<i>a. Strength of association</i>	Odds ratios and 95% confidence intervals should be stated
<i>b. Positive results</i>	Steps taken to minimize potential sources of bias in the study should be described
<i>c. Negative results</i>	Was the study adequately powered? possible reasons for negative findings such as sample size, unexpectedly low allele frequencies, or decreased statistical power with family-based controls should be stated
5. Biologic plausibility	
<i>a. Functional changes</i>	The putative associated allele should be shown to alter function in a biologically meaningful way linked to the epilepsy phenotype
<i>b. Marker polymorphisms</i>	If functional changes are unconvincing (e.g., silent SNPs), demonstration of the size of the block of linkage disequilibrium that the associated polymorphism falls into should be demonstrated; sequencing for other potentially pathogenic variants within this block should be carried out to search for the true causative variant
<i>c. Dose-effect relation</i>	A linear trend in disease risk should be shown to exist with increasing numbers of copies of the risk allele; if this is not shown, is the mechanism for a dominant effect explicable from a biologic viewpoint?
6. Replicability	
<i>a. Independent replication</i>	Replication in an independent group lends strength to the association
<i>b. Two independent datasets</i>	Studies involving two independent datasets of case-control groups that both show convincing association are preferred

Variants communs et variants rares dans les épilepsies communes et multifactorielles

Durant ces dernières décennies, les études en génétique des épilepsies ont permis de découvrir, avec succès, un certain nombre de gènes liés aux épilepsies monogéniques. Ces formes sont une rare minorité parmi toutes les épilepsies connues à ce jour. La grande majorité des épilepsies, dénommées aussi « épilepsies communes », sont de type complexe et multifactoriel. Selon certains auteurs, les épilepsies complexes se développeraient, par chance, à cause d'événements méiotiques qui créeraient une combinaison d'allèles de susceptibilité avec un effet suffisant, chez un même individu, pour atteindre l'hyperexcitabilité neuronale qui mènerait au seuil critique de la crise d'épilepsie (Mulley et al. 2005).

A l'heure actuelle, aucune étude d'associations cas-témoin n'a réellement réussi à mettre en évidence un « gène commun aux épilepsies complexes », car justement, ces épilepsies seraient génétiquement trop hétérogènes pour que l'approche *étude d'association SNP-maladie* puisse aboutir au succès. Par conséquent, les études d'associations n'auraient pas assez de pouvoir pour détecter les petits effets de plusieurs variants géniques présents chez un patient (Tan et al. 2004). En revanche, avec le développement actuel des techniques d'études *pangénomiques*, les études d'association pourraient devenir beaucoup plus fréquentes dans le domaine des épilepsies complexes, afin d'identifier des régions du génome contenant des gènes de susceptibilité. Cette approche démontrerait alors la validité du modèle général *maladies communes - variants communs* (Mulley et al. 2005), où l'addition de variants polymorphes avec une fréquence de >1% en population générale (Bodmer and Bonilla 2008), chez un même individu, provoquerait le phénotype malade.

En revanche, les variants rares, mis en évidence par les études de formes familiales rares d'épilepsies, sont considérés comme des gènes effet majeur au sein de ces familles. Ils interagiraient avec des gènes « modificateurs » afin de moduler le phénotype chez les atteints de ces familles. Ainsi, ces gènes modificateurs peuvent être considérés comme les équivalents des gènes de susceptibilité des épilepsies complexes. Par conséquent, les épilepsies monogéniques seraient le cas extrême du modèle *maladies communes - multiplicité de variants rares*. Mulley et coll. énoncent que les études d'associations ne sont pas la bonne méthode à adopter dans le cadre d'épilepsies complexes, si ces pathologies suivent ce modèle. Mais intuitivement, la part de la variation génétique, impliquée dans les épilepsies communes, doit être un mélange d'allèles de susceptibilité appartenant à ces deux modèles (Mulley et al. 2005).

1.9 Conclusion introductive

Au cours de ces dernières décennies, l'existence d'une composante génétique dans les épilepsies humaines, suggérée par les études d'agrégations familiales et de jumeaux, a été confirmée grâce aux avancées technologiques dans le domaine de la biologie moléculaire : études de liaison, d'association et d'identification de gènes.

C'est au travers d'études familiales de liaison et d'études d'associations cas-témoins qu'il est apparu une hétérogénéité et la reconnaissance de phénotypes non reconnus dans la CIESE, telle qu'elle avait été établie en 1989. Cette classification internationale est ainsi apparue obsolète. De nouvelles épilepsies sont apparues, par exemple les GEFS⁺, qui sont avant tout reconnues par leur caractéristique familiale. Un syndrome ne peut ainsi plus être reconnu sur les éléments cliniques d'un seul sujet, mais seulement grâce aux tableaux cliniques de tous les membres de sa famille. Les barrières entre les différents syndromes, établies par la classification internationale, sont entrain de s'estomper, permettant la reconnaissance de maladies épileptiques.

C'est grâce à ces études familiales que la plupart des gènes, liés à une épilepsie, ont été découverts. Ils ont été cartographiés dans de rares familles multigénérationnelles et identifiés par clonage positionnel ou par une approche gène-candidat. De plus, ils ont rarement été associés à des épilepsies à hérédité complexe, où il existe des interactions multiples entre gènes avec ou sans influences environnementales. Comme pour les autres maladies complexes, identifier de nouveaux gènes mutés responsables de différents types d'épilepsies est le challenge de l'avenir. Il aidera à poser un meilleur diagnostic et à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'épileptogenèse, mais il permettra aussi le développement de tests prénataux, de conseils génétiques et de nouvelles thérapies.

Exposé des travaux

2 Etudes d'associations

2.1 GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) and temporal lobe epilepsy (Salzmann et al. 2005)

L'étude d'association cas-témoins ci-après consistait à confirmer la contribution génétique du polymorphisme G1465A du récepteur GABA(B[1]) dans un échantillon de patients souffrant d'épilepsie du lobe temporal (ELT), ainsi que d'effectuer une analyse exploratoire dans d'autres sous-groupes phénotypiques. D'après les résultats de cette étude, les distributions génotypiques et alléliques du polymorphisme d'intérêt n'ont montré aucune différence entre les patients et le groupe contrôle. Par conséquent, l'association entre le variant G1465A et ELT non-lésionnelles n'a pas pu être répliquée. Ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique qui a permis d'exclure un effet majeur du polymorphisme G1465A du récepteur GABA(B[1]) dans la susceptibilité des ELT non-lésionnelles. Toutefois, il reste nécessaire de tester ce variant dans de plus grands échantillons afin de déterminer son rôle réel dans la susceptibilité aux ELT non-lésionnelles.

Brief Communications

GABA_B Receptor 1 Polymorphism (G1465A) and Temporal Lobe Epilepsy

*Annick Salzmann, *Bruno Moulard, †Arielle Crespel, †Michel Baldy-Moulinier,
*Catherine Buresi, and *Alain Malafosse

*Division of Neuropsychiatry, University Hospital of Geneva, Geneva, Switzerland; and †Epilepsy Laboratory,
University Hospital of Montpellier, Montpellier, France

Summary: *Purpose:* To reevaluate the genetic contribution of the polymorphism G1465A of the gene coding for γ -aminobutyric acid (GABA)_B receptor 1 subunit [GABA_B(1)] in a sample of French patients with temporal lobe epilepsy (TLE) and to perform an exploratory analysis in other phenotypic subgroups.

Methods: The 134 patients were genotyped for the polymorphism G1465A. This sample was divided in two groups. The first one had patients with nonlesional TLE, and the second one, with lesional TLE. Then these two groups were compared with a sample of 145 healthy individuals.

Results: The genotype and allele distributions for the polymorphism G1465A showed no difference between patients and controls.

Conclusions: The association between the variant G1465A and the sample of patients could not be replicated, so these results exclude a major effect of this polymorphism in the susceptibility to nonlesional TLE. Larger samples should be tested to determine whether the G1465A in exon 7 of the GABA_B(1) receptor gene is a susceptibility factor for nonlesional TLE. **Key Words:** GABA_B receptor—Temporal lobe epilepsy—Genetics—Association study.

Temporal lobe epilepsy (TLE) is a common, heterogeneous epilepsy syndrome. In the etiology of this focal epilepsy, both environmental and genetic factors play a role. Genetic predisposition is probably an important causative factor, especially in TLE with mesial temporal sclerosis and febrile seizures (1). Several associations of TLE with various candidate genes have been reported, but most of them remain controversial. The strengths and weaknesses of candidate gene-association studies are now well known, and guidelines have been published (2). Replication of initial results in independent groups is of utmost importance in view of evaluating the real effect of genetic markers.

One of the best candidates for TLE is the gene coding for γ -aminobutyric acid (GABA_B) receptor 1 subunit [GABA_B(1)]. Indeed a recent article reported a deregulation in the product of this gene (3). Moreover, a missense mutation G1465A in exon 7 provokes an amino acid substitution Gly489Ser within the N-terminal extracellular

domain of the GABA_B(1) subunit, which is necessary for heterodimeric assembly of the receptor. Gambardella et al. (4) recently reported a highly significant overrepresentation of the G1465A heterozygote in 141 patients with nonlesional TLE (no focal mass lesion such as cerebral tumor, cortical dysgenesis, vascular lesion or malformation, or post-traumatic scar detected on the MRI study) compared with 372 controls.

The aim of this study was to replicate this result in a sample of French patients with nonlesional TLE and to perform an exploratory analysis in other phenotypic subgroups.

SUBJECTS AND METHODS

Consecutively admitted patients meeting criteria for partial epilepsy were admitted in the epilepsy unit of the university hospital of Montpellier (France). These patients have a severe form of epilepsy with poor control of their seizures, although they were treated with two or three single drugs or a combination of drugs. Diagnosis was based on patient history, clinical examination, interictal and ictal EEG analysis carried out with monitoring video-EEG,

Accepted January 30, 2005.

Address correspondence and reprint requests to Dr. A. Malafosse at Division de Neuropsychiatrie, Hôpital Belle Idée, 2 chemin du Petit Bel Air, 1225 Chêne-Bourg, Suisse. E-mail: alain.malafosse@hcuge.ch

TABLE 1. Demographic and clinical characteristics

Variables	Group 1 (n = 110)	Group 2 (n = 24)
M, no. (%)	47 (42.73)	13 (54.17)
F, no. (%)	63 (57.23)	11 (45.83)
Family history of FC/epilepsy, no. (%)	21 (20)	3 (11.54)
Antecedent FC, no. (%)	55 (50)	1 (3.85)
Age at onset, yr, mean \pm SD	15.05 \pm 5.23	14.21 \pm 6.05
Duration of epilepsy, yr, mean \pm SD	24.54 \pm 3.27	21.21 \pm 4.56
Hippocampal sclerosis, no. (%)	108 (98.18)	0

FC, febrile convulsion.

and MRI evaluation. The study group was divided in two groups (Table 1). The first one comprised patients with a nonlesional TLE, according to the same criteria as those used in Gambardella et al. (4). The other group was composed of patients with lesional TLE (vascular malformation, cortical dysplasia, nervous system tumor, etc.).

The healthy control group was recruited among blood donors from the same hospital. To minimize morbidity among subjects in this group, only blood donors older than 35 years and without personal and/or family history of epilepsy and seizure were included. Patients and controls were European whites for at least two generations. Written informed consent was obtained from all participating subjects. The Research Ethics Board of the Department of Clinical Neurosciences of Geneva reviewed and approved the study.

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by use of the Nucleon BACC 2 kit (Amersham). The transition G1465A in exon 7 of the GABA_B(1) receptor gene was detected by polymerase chain reaction (PCR) followed by digestion of amplified fragments with the appropriate restriction enzyme, as described by Gambardella et al. (4).

The analysis of allelic association consisted of comparison of marker allele and genotype numbers between patients and control subjects by using χ^2 statistics. To reduce the possibility of stratification bias, an effort was made to match patients and control subjects carefully for ethnogeographic origin. A Bonferroni correction for mul-

tiplex comparison (two groups of patients) was used, and the significance level was set at $p = 0.025$.

RESULTS

The genotypic distributions of patients and controls were in Hardy–Weinberg equilibrium in the overall sample.

Table 2 shows the genotype and allele distributions for the GABA_B(1) receptor gene polymorphism in the sample of 110 patients with nonlesional TLE (group 1), who are comparable to the patients from Gambardella et al. (4), and the control subjects. No difference was found between the patients and the controls in the samples. Similarly, genotype and allele frequencies in controls from both the present study and from that of Gambardella et al. (4) are not different. On the contrary, a highly significant difference in the genotype and allele distribution was found between patients from the two studies ($p = 8.10^{-5}$). No difference was observed for the other group.

DISCUSSION

We were unable to replicate the association between the G1465A in exon 7 of the GABA_B(1) receptor gene and nonlesional TLE reported by Gambardella et al. (4). This result allows exclusion of a huge effect of the G1465A heterozygote in the susceptibility to nonlesional TLE, suggested in this study [OR(95% CI) = 38.0 (8.82–163.73)]. Moreover, because patients in the present study have a severe form of TLE with a higher rate of febrile seizure and hippocampal sclerosis than did those in the study of Gambardella et al. (4), our result does not support their suggestion that G1465A heterozygous patients have a higher risk of developing severe TLE.

However, it remains possible that this GABA_B(1) receptor gene variant has a real but modest effect on TLE. For unknown reasons (e.g., clinical characteristics, ethnogeographic origin), Gambardella et al. (4) may have been able to detect this effect in a relatively small sample (N = 141). Our sample size was large enough to provide a power of $\geq 99\%$ for detection of an association of similar

TABLE 2. Population association between GABA_B(1) G1465A genotype and epilepsy

G1465A polymorphism	Patients		Controls		
	Gambardella et al., 2003	Group 1	Group 2	Present study	Gambardella et al., 2003
Genotype	141	110	24	145	372
A/A	0 (0.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0.0)
A/G	24 (17.0)	2 (1.82)	0 (0)	0 (0)	2 (0.5)
G/G	117 (83.0)	108 (98.18)	24 (100)	145 (100)	370 (99.5)
	$p_{bc} = 8.10^{-5}$	NS	NA		NS
Allele	282	n = 220	n = 48	n = 290	744
A	24 (8.5)	2 (0.91)	0 (0)	0 (0)	2 (0.3)
G	258 (91.5)	218 (99.09)	48 (100)	290 (100)	742 (99.7)
		NS	NA		

magnitude to that reported by Gambardella et al. (4), but not if one consider the lower bound of the estimated OR(95% CI) of 8.82 (55%). As recently suggested by Lohmueller et al. (5), this may be an explanation for a sizeable fraction of nonreplication. Undetected differences between the two populations also may explain this nonreplication.

Even if TLEs are nonlesional, we should also keep in mind that they are probably determined by gene-environment interactions. Testing the effect of a single variant in different samples without taking into account putative environmental susceptibility or protective factors, which may have different frequencies in these different samples, may lead to false nonreplication.

Whatever the reason for the present nonreplication, larger samples will be necessary to determine definitively whether the G1465A in exon 7 of the GABA_B(1) receptor gene is a susceptibility factor for nonlesional TLE. The sole firm conclusion allowed from the present study is that

this variant does not play a major role in the vulnerability to this disorder.

Acknowledgment: This study was supported by the University Hospital of Geneva. We thank Dr. Roger Snowden, Director Product & Process Research *Firmenich S.A.*, for correcting the manuscript.

REFERENCES

1. Ottman R. Genetics of the partial epilepsies: a review. *Epilepsia* 1989;30:107-11.
2. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001;2:91-9.
3. Princivalle AP, Duncan JS, Thom M, et al. GABA_{B1a}, GABA_{B1b}, and GABA_{B2} mRNA variants expression in hippocampus resected from patients with temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2003;122:975-84
4. Gambardella A, Manna I, Labate A, et al. GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2003;60:560-3.
5. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, et al. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 2003;33:177-82.

2.1.1 Discussion complémentaire

Il nous a été impossible de répliquer l'association entre G1465A de l'exon 7 du gène qui code pour le récepteur GABA(B[1]) et les ELT non-lésionnelles, comme rapportée par Gambardella et al. (Gambardella et al. 2003a). Notre résultat permet d'exclure un effet important de l'hétérozygote G1465A dans la susceptibilité des ELT non-lésionnelles, alors que l'étude initiale mettait en avant une forte association entre ce variant et la maladie (OR [IC : 95%] = 38,0 [8,82–163,73]). De plus, nos patients présentent une forme plus sévère d'ELT avec un taux plus élevé de convulsions fébriles et de scléroses hippocampiques que dans l'étude originale (Gambardella et al. 2003a). Par conséquent, nos résultats ne soutiennent pas l'hypothèse de l'équipe italienne que l'hétérozygotie de G1465A entraîne un risque plus élevé de développer une ELT sévère.

L'équipe de Gambardella et al. considère que le gène *GABA(B[1])* est un candidat pour la vulnérabilité à l'ELT. Elle se base, entre autre, sur un article du groupe de Peters étudiant *GABA(B[1])* comme gène candidat au locus *EJMI*, à la position 6p21.3 du chromosome 6. Dans cet article, les auteurs ont séquencé toute la région codante de ce gène chez des patients EMJ. Ils ont découvert la mutation non-sens G1465A qui amène à la substitution Gly489Ser. Peters et son équipe ont trouvé cette mutation chez 5 patients index souffrant d'EMJ et chez des patients d'une même famille avec un phénotype EGI, mais aussi chez leur mère non-affectée. De même, ce polymorphisme Gly489Ser a été découvert aussi bien chez des personnes affectées et non-affectées d'autres familles. Ainsi, cette équipe exclue cette variation du gène de *GABA(B[1])* comme étant la cause primaire d'EGI dans ces familles (Peters et al. 1998).

Au moment de la publication de notre article (Salzmann et al. 2005), d'autres équipes ont aussi publiés des études de réplifications négatives (Cavalleri et al. 2005 ; Ma et al. 2005 ; Stogmann et al. 2006 ; Tan et al. 2005) chez des ELT caucasiens et (Ren et al. 2005) chez des ELT chinois. Récemment, une étude encore sous-presse rapporte un résultat statistiquement significatif pour des ELT argentins avec sclérose hippocampique. Les auteurs expliquent leur résultat positif par une origine commune de leur population et de celle de la première étude de Gambardella, la population argentine ayant pour origine principale l'Italie (Kauffman et al. 2008). Une seconde étude aussi sous-presse rapporte une association non-significative du variant G1465A dans une population de patients chinois avec une ELT mésoiale (Wang et al. 2008).

La publication de ces nombreux résultats négatifs nous conduit à rappeler les recommandations de Tan et al. (Tan et al. 2004) pour les études d'association génétique des épilepsies. En premier lieu, une bonne conception de l'étude est indispensable, en définissant

clairement le phénotype des cas et la provenance des contrôles. La taille des échantillons de cas et de témoins doit être adéquate afin d'avoir assez de pouvoir statistique. Lors de l'analyse statistique, il est important de poser une hypothèse *a priori* claire. Il faut vérifier si les populations de cas et de contrôles sont correctement appariées. Au niveau du choix du gène candidat, il est essentiel d'avoir des preuves biologiques de sa possible implication dans les épilepsies. Il en va de même pour le SNP testé, car il est connu qu'une mutation non-sens, provoquant une substitution d'acide aminé, n'a pas forcément un effet sur le phénotype de la maladie. Par conséquent, le choix du bon SNP est une donnée très pertinente à l'heure actuelle (Horne and Camp 2004). Seul 10% de tous les SNP seraient situés dans une région d'importance fonctionnelle ou structurelle (Wjst 2004), ce qui en fait des instruments de choix dans les études d'association de maladies complexes. En résumé, il apparaît très peu probable que le polymorphisme G1465A du gène *GABA(B[1])* est impliqué dans la vulnérabilité aux épilepsies en général et en particulier aux ELT.

2.2 Candidate Genes for Temporal Lobe Epilepsy: a Replication

Study (Salzmann et al. 2008)

Cette seconde étude de réplication cas-témoins consiste à examiner, dans notre cohorte d'ELT, la contribution génétique de gènes préalablement associé à la maladie : *Apolipoprotein E* (*ApoE*) (Briellmann et al. 2000), *Interleukin 1 α* (*IL-1 α*), *Interleukin 1RA* (*IL-1RA*), *Interleukin 1 β* (*IL-1 β*) (Kanemoto et al. 2000), *Prodynorphin* (*PDYN*) (Stogmann et al. 2002). Pour cela, nous avons étudié les marqueurs suivants dans notre cohorte de 109 ELT : isoformes $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ d'*ApoE* (Briellmann et al. 2000) ; *IL-1 α* -889 ; VNTR dans l'intron 2 de *IL-1RA* ; *IL-1 β* -511, *IL-1 β* +3953 (Kanemoto et al. 2000) ; VNTR dans le promoteur de *PDYN* (Stogmann et al. 2002). Dans cette étude, nous avons confirmé le rôle d'*ApoE*, *IL-1 α* et *IL-1RA* dans la susceptibilité aux ELT. Par contre, nous n'avons pas répliqué les associations pour les gènes *IL-1 β* et *PDNY*.

Candidate genes for temporal lobe epilepsy: a replication study

Annick Salzmann · Nader Perroud · Arielle Crespel
Carmen Lambercy · Alain Malafosse

Received: 1 July 2008 / Accepted in revised form: 14 November 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract The objective of this study is to replicate previously published results regarding the involvement of several susceptibility genes in temporal lobe epilepsy (TLE): *interleukin 1 β* (*IL-1 β*), *interleukin 1 α* (*IL-1 α*), *interleukin 1RA* (*IL-1RA*), *apolipoprotein E* (*ApoE*) and *prodynorphin* (*PDYN*). We used a case-control approach comparing several polymorphisms within these candidate genes between unrelated TLE patients and matched controls. We were thus able to confirm the role of *ApoE*, *IL-1 α* and *IL-1RA* genes in TLE disease, but failed to confirm the involvement of *IL-1 β* and *PDYN*. This failure should be interpreted with caution, as this may be due to the small size of our study groups and the resultant lack of statistical power.

Keywords Temporal lobe epilepsy · Prodynorphin · Apolipoprotein E · Interleukin 1 · Genetics · Association

Introduction

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common form of partial epilepsy [1] and this disorder is considered to be polygenic and complex. Various susceptibility genes and environmental factors are believed to be involved in the aetiology of TLE and concordance between genotype and phenotype is relatively weak. To understand the genetic background of complex diseases, association studies have been proposed as a method of choice [2]. However, this approach remains controversial and, in order to avoid false-positive association, replication of the first case-control study in independent groups of patients is recommended [3]. Recently a number of groups, including our own, have reported non-replications between several putative susceptibility genes and TLE [1, 4].

Since several other studies have reported an association between common variants in specific genes and TLE, our aim, in the present study, is to replicate them: *apolipoprotein E* (*ApoE*) [5], *interleukin 1 α* (*IL-1 α*), *interleukin 1 β* (*IL-1 β*), *interleukin 1RA* (*IL-1RA*) [6] and *prodynorphin* (*PDYN*) [7].

Methods

Subjects

Our study group consisted of 109 unrelated patients with a diagnosis of non-lesional TLE. They were admitted under partial epilepsy criteria in the epilepsy unit of the university hospital of Montpellier (France). These patients suffered from a severe form of epilepsy with poor control of their seizures. Poor control is defined as a failure to respond to two or three single drugs or a com-

A. Salzmann · C. Lambercy · A. Malafosse (✉)
Division of Medical Genetics
University Hospitals of Geneva
Geneva, Switzerland
e-mail: alain.malafosse@hcuge.ch

A. Crespel
Epilepsy Laboratory
University Hospital of Montpellier
Montpellier, France

N. Perroud · A. Malafosse
Department of Psychiatry
University Hospitals of Geneva
Geneva, Switzerland

bination of them. Diagnosis was based on patient history, clinical examination, interictal and ictal EEG analysis carried out with monitoring video-EEG, and MR evaluation. Demographic and clinical characteristics of our cohort of TLE patients have been reported in detail in a previous study [4].

The healthy control group was recruited from blood donors at the hospital in Geneva. To minimise morbidity among subjects in this group, only blood donors older than 35 years and without personal and/or family history of epilepsy and seizure were included. Patients and controls were European Caucasian for at least two generations. Written informed consent was obtained from all participants. The Research Ethics Board of the Department of Clinical Neurosciences of Geneva reviewed and approved this study.

Molecular methods

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by use of the Nucleon BACC 2 kit (Amersham). Genotyping reactions were carried out as described in the different studies [6, 8, 9].

Statistical analysis

For our statistical analysis, in addition to the total cohort of patients, we divided the TLE group into subgroups, according to the existence or not of familial risk and hippocampal sclerosis. This was done in order to facilitate comparison between our data and that from analogous published work. In order to perform case-control genetic comparisons, differences in genotype and allele frequencies between all TLE, TLE subgroups and healthy controls were analysed by using the Chi-square test: 3 by 2 tables for *PDYN*, *IL-1 α* and *IL-1 β* ; 4 by 2 tables for *IL-1RA*. As age at onset displayed a non-parametric curve, the Mann–Whitney *U*-test was used in place of the *t*-test for the comparison of age at onset and the presence or absence of the *ApoE* ϵ 4 allele. We used the statistical package SPSS V.11.0.

As we compared genotypic and allelic distributions of various polymorphic markers between healthy and diseased subjects, a Bonferroni correction should be applied to correct for multiple testing. Adjustments for multiple comparisons are recommended to avoid excessively easy rejection of the null hypothesis. However, reducing the type I error increases the type II error and therefore increases the frequency of incorrect statements of no relationship between two factors. This could thus lead to missing an association in data that is not the result of chance [10]. The

rejection of the null hypothesis should be considered by taking into account both the evidence from the data and the relevance of other explanations. Moreover, our argument is based on previous findings and should be seen as a confirmation of research in the field of TLE. In this present study, choosing not to penalise ourselves by missing possibly important findings, we decided not to correct our results for multiple testing.

Ethnicity was recorded using a self-reporting questionnaire including perceived nationality, mother tongue and ethnicity of the subject together with all four grandparents. To reduce the possibility of stratification bias, we used an average F_{ST} between pairs of ethnic populations between 0.0009 and 0.0048 (table 5.5.1 in ref. [11]).

Power calculation

Statistical power to detect associations was estimated using the Genetic Power Calculator (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/gpc/>). For age at onset we aimed to detect genetic effects explaining at least 2% of variance in the trait under an additive genetic model for a polymorphism with a minor allele frequency of 0.12. Power for detecting such effect was calculated for the nominal significance level $\alpha=0.05$. For discrete traits, power for each study was calculated separately using an additive model with genetic relative risk of 2 and an α level=0.05.

Results

Throughout our study, genotypic distributions in both patients and controls were in Hardy–Weinberg equilibrium.

Apolipoprotein E

Five studies have been published on *ApoE* and TLE age at onset [1, 5, 12–14]. In one of them, a positive association was found between early age at onset of the disease and the presence of *ApoE* ϵ 4 allele (ϵ 4⁺: 5 \pm 5 years vs. ϵ 4⁻: 14.9 \pm 10 years; $p=0.005$) [5]; however, the four other studies were unable to replicate this positive association. Our results confirmed a significant association between an early age at onset of epilepsy and the presence of allele ϵ 4 (ϵ 4⁺: 10.54 \pm 6.36 years vs. ϵ 4⁻: 16.51 \pm 9.90 years; $p=0.003$) (Table 1). The study had 99% power to detect a gene effect, explaining 2% of the variance in the trait (Table 1).

Table 1 *ApoE* allele and genotype distributions and association between $\epsilon 4$ allele and age at onset

	Controls	Patients	<i>p</i>	Age at onset of seizures		<i>p</i> (Mann–Whitney <i>U</i> -test)	Power
	n (%)	n (%)		Presence of $\epsilon 4$ allele	Absence of $\epsilon 4$ allele		
Genotype	227	109	NS*				
$\epsilon 2-2$	0 (0.0)	0 (0.0)					
$\epsilon 2-3$	25 (11.0)	9 (8.3)					
$\epsilon 2-4$	5 (2.2)	1 (0.9)		n=26	n=80		
$\epsilon 3-3$	151 (66.5)	72 (66.1)		Age: 10.54±6.36	Age: 16.51±9.90	<i>p</i>=0.003	0.99
$\epsilon 3-4$	43 (18.9)	27 (24.8)					
$\epsilon 4-4$	3 (1.3)	0 (0.0)					
Allele	454	218	NS*				
$\epsilon 2$	30 (6.6)	10 (4.6)					
$\epsilon 3$	370 (81.5)	180 (82.6)					
$\epsilon 4$	54 (11.9)	28 (12.8)					

*NS, non-significant

Interleukin 1 α

Based on pathophysiological hypotheses, several association studies have been carried out between interleukin-related genes and TLE. Two were performed with *IL-1 α* and both showed no association [6, 15].

We partitioned our cohort of patients, like Kanemoto's group, based on the existence or non-existence of a hippocampal sclerosis (TLE-HS⁺) [6], and like Ozkara's team, based on the absence of antecedent of febrile convulsion (TLE-FC⁻) [15]. We found a significant positive genotypic association between the whole TLE sample and the promoter *IL-1 α* -889 SNP, but this was observed in TLE-HS⁺ patients (Table 2). However, as shown in Table 2, we did not have enough power to detect any significant association between TLE-HS⁻ and controls (power=43%). Given the high frequency of the 1 allele in this sample (80.4%), an association could be suspected and further study with higher number of individuals is warranted. Interestingly, we also found a positive association between *IL-1 α* -889 SNP and TLE-FC⁻ (Table 2), but no statistical difference between TLE-HS⁺-FC⁻ vs. controls (data not shown).

Interleukin 1RA

IL-1RA is the second interleukin-related gene studied by Kanemoto et al. [6]. Once again they failed to show any association.

We observed significant differences in the allelic and genotypic frequencies between patients and controls, but here this concerns TLE-HS⁻ (Table 3).

Interleukin 1 β

In this case, Kanemoto et al. [6] and Ozkara et al. [15] did not find an association between *IL-1 β* -3953 and TLE. We were also unable to find any significant statistical difference (Table 4).

In contrast, Kanemoto et al. found a statistically higher frequency of the *IL-1 β* -511 2-2 genotype in TLE-HS⁺ subjects compared to control subjects [6], and confirmed this result using a larger study group [16]. However this association was not observed in five other ethnically variable populations [1, 15, 17–19] or in our cohort of patients (Table 5).

In addition, we analysed the two *IL-1 β* SNP haplotypes for the two subgroups of TLE (data not shown) and again we found no significant association. However, and as previously stated, negative results involving the TLE-HS⁻ group should be kept with caution as power to detect an association is limited.

Prodynorphin

Stogmann et al. reported that *PDYN* promoter L allele confers an increased risk for TLE in patients with a family history of seizures (OR=2.25 (CI 1.41–3.62); *p*=0.0006) [7]. This result remained unconfirmed in three independent Caucasian populations [1, 20, 21].

In the present study, we find a non-significant trend of excess of the L allele in those patients with a family history of epilepsy (OR=1.60 (CI 0.82–3.31); *p*=0.163) (Table 6).

Table 2 *IL-1 α -889* allele and genotype distributions

Allele	Controls		TLE		TLE-HS ^a		TLE-FC ^c		<i>p</i> _u ^d				
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)						
1	470 316 (67.2)	218 166 (76.1)	172 129 (75.0)	46 37 (80.4)	108 82.0 (75.9)	0.059	0.89	0.066	0.43	0.018	0.95	0.079	0.74
2	154 (32.8)	52 (23.9)	43 (25.0)	9 (19.6)	26.0 (24.1)	0.027	0.104			0.0078		0.022	
Genotype	235	109	86	23	54								
1-1	99 (42.1)	65 (59.6)	50 (58.1)	15 (65.2)	33 (61.1)								
1-2	118 (50.2)	36 (33.1)	29 (33.7)	7 (30.4)	16 (29.6)								
2-2	8 (7.7)	8 (7.3)	7 (8.1)	1 (4.4)	5 (9.3)								

^aTLE-HS^a, TLE with hippocampal sclerosis; ^bTLE-HS^b, TLE without hippocampal sclerosis; ^cTLE-FC^c, TLE without antecedents of febrile convulsion; ^d*p*_u, *P* uncorrected

Table 3 *IL-1RA* allele and genotype distributions

Genotype	Controls		TLE-HS ^a		TLE-HS ^b		<i>p</i> _u ^c
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
1-1	242 128 (52.9)	86 43 (50.0)	23 5 (21.7)	0.768	0.95	0.51	0.64
1-2	90 (37.2)	36 (41.9)	13 (56.5)				
1-4	5 (2.1)	1 (1.2)	0 (0.0)				
1-5	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.3)				
2-2	16 (6.6)	6 (7.0)	4 (17.4)				
2-4	3 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)				
Allele	484	172	46				
1	351 (72.5)	123 (71.5)	24 (52.2)	0.525			
2	125 (25.8)	48 (27.9)	21 (45.7)				
4	8 (1.7)	1 (1.4)	0 (0.0)				
5	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.2)				

^aTLE-HS^a, TLE with hippocampal sclerosis; ^bTLE-HS^b, TLE without hippocampal sclerosis; ^c*p*_u, *P* uncorrected

Table 4 *IL-1β*+3953 allele and genotype distributions

	Controls	TLE-HS ⁺ ^a	TLE-HS ⁻ ^b	<i>p</i> _u ^c			
	n (%)	n (%)	n (%)	TLE-HS ⁺ ^a vs. controls	Power	TLE-HS ⁻ ^b vs. controls	Power
Genotype	234	86	23	NS ^d	0.97	NS ^d	0.60
1-1	118 (50.4)	45 (52.3)	14 (60.9)				
1-2	101 (43.2)	34 (39.5)	8 (34.8)				
2-2	15 (6.4)	7 (8.2)	1 (4.3)				

^aTLE-HS⁺, TLE with hippocampal sclerosis; ^bTLE-HS⁻, TLE without hippocampal sclerosis; ^c*p*_u, *p* uncorrected; ^dNS, non-significant

Table 5 *IL-1β*-511 allele and genotype distributions

	Controls	TLE-HS ⁺ ^a	TLE-HS ⁻ ^b	<i>p</i> _u ^c			
	n (%)	n (%)	n (%)	TLE-HS ⁺ ^a vs. controls	Power	TLE-HS ⁻ ^b vs. controls	Power
Genotype	227	86	23	NS ^d	0.98	NS ^d	0.51
1-1	99 (43.6)	35 (40.7)	12 (52.2)				
1-2	108 (47.6)	45 (52.3)	9 (39.1)				
2-2	20 (8.8)	6 (7.0)	2 (8.7)				

^aTLE-HS⁺, TLE with hippocampal sclerosis; ^bTLE-HS⁻, TLE without hippocampal sclerosis; ^c*p*_u, *p* uncorrected; ^dNS, non-significant

Table 6 *PDYN* allele and genotype distributions

	Controls	Familial- risk TLE	OR (95% CI)	<i>p</i> _u ^a	Power	Nonfamilial- risk TLE	OR (95% CI)	<i>p</i> _u ^a	Power
	n (%)	n (%)				n (%)			
Allele	412	42		0.163	0.68	166		NS ^b	0.98
L	106 (25.7)	15 (35.7)	1.60 (0.82– 3.31)			50 (30.1)	1.24 (0.84–1.85)		
H	306 (74.3)	27 (64.3)	0.62 (0.32–1.21)			116 (69.9)	0.80 (0.54– 1.20)		
Genotype	206	21	0.32			83		NS ^b	
LL	14 (6.8)	2 (9.5)	1.44 (0.30–6.83)			7 (8.4)	1.26 (0.49–3.25)		
LH	78 (37.9)	11 (52.4)	1.81 (0.73–4.45)			36 (43.4)	1.26 (0.75–2.11)		
HH	114 (55.3)	8 (38.1)	0.50 (0.20–1.25)			40 (48.2)	0.75 (0.45–1.25)		

^a*p*_u, *p* uncorrected; ^bNS, non-significant

Discussion

In this present paper, we attempt to replicate published association studies between TLE, and subtypes of this disease, and several candidate genes.

Some evidence has implicated ApoE in the hippocampal response to injury. Indeed, astrocytes reply to neuronal damage by synthesising and releasing ApoE. Three major isoforms of ApoE have been identified, ε2, ε3 and ε4 [8]. The *ApoE* ε4 allele has often been associated with neurological diseases and/or their early-age

onset in carriers: Alzheimer's disease [22], amyotrophic lateral sclerosis [23] and Parkinson's disease [24]. Although three other TLE association studies were unable to find such effect [1, 13, 14] and the present sample size is small, we have enough power to detect a statistically significant result between an early age at onset of TLE and the presence of the ε4 allele. Moreover, the present study is the second one that reports an early age at onset in ε4 TLE carriers. These results suggest that TLE is one of the multiple neurological diseases for which ApoE has a general role in

neuronal degeneration or regeneration, rather than a specific role in their aetiopathogenesis.

IL-1 shows two structurally distinct forms, IL-1 α and IL-1 β , that act on the IL-1 receptor. Interleukin 1 receptor antagonist protein (IL-1RA) acts on the same receptor and inhibits IL-1 α and IL-1 β binding. IL-1 α and IL-1 β are involved in various immune responses, inflammatory processes, apoptosis and haematopoiesis. They are produced by monocytes and macrophages. Moreover, IL-1 α and IL-1 β are also synthesised by glial and neuronal cells [25]. Their implication in the central nervous system was demonstrated by the presence of high-density IL-1 receptors in molecular and granular layers of dentate gyrus [26], suggesting a physiological role for IL-1 in the hippocampus.

In contrast to Kanemoto et al. [6], we found a positive association between TLE and *IL-1 α -889*, which is a variation in the 5' regulatory region. This result is in agreement with the work of Peltola et al. These authors also found a significantly higher frequency for *IL-1 α* allele 1 in patients with localisation-related epilepsy, such as TLE, lobe temporal epilepsy, parieto-occipital epilepsy and multifocal epilepsy [27]. Despite higher frequencies of *IL-1 α* allele 1 and genotype 1-1 in all the sub-groups compared to the controls, only some of them reach significance (the whole TLE population and the TLE-HS⁺ and TLE-FC⁻ sub-groups). This is probably due to a lack of statistical power and larger groups of patients will be needed to confirm this association and determine whether it is subgroup specific. It is noteworthy that the *IL-1 α -889* polymorphism is functional: 2-2 homozygotes showed an increased transcriptional activity compared to 1-1 homozygotes and heterozygotes [28]. This suggests that vulnerability to TLE may be related to deregulation of the immune system, a hypothesis further supported by the finding that three immune-related proteins are down- or up-regulated – specifically the complement factor 3, C3 – in brain of TLE patients [29]. Interestingly, the promoter region of C3 was found to be very responsive to IL-1 [30].

Discrepancies have been reported in the association studies between various epileptic syndromes and the *IL-1RA* VNTR, which is described as a putative protein-binding site and may influence gene expression [31]. For the first time, in contrast to the research of Kanemoto et al. [6] and despite weak statistical power, we observed quite a strong positive association between this variant and TLE: when compared to controls, TLE-HS⁻ patients displayed lower frequencies of allele 1 and genotype 1-1, and higher frequencies of allele 2 and genotype 1-2 and 2-2. Tsai et al. reported an association between the same polymorphism and FS, but in the opposite sense: the *IL-1RA* allele 1 was significantly more frequent in FS chil-

dren than in controls [32]. Due to the small sample size, we were unable to test the associations between *IL-1RA* VNTR and the TLE-HS⁻-FC⁺ and TLE-HS⁻-FC⁻ sub-groups. Before proposing pathophysiological hypotheses for these different associations, replication using larger study groups is required.

Similarly, conflicting results were also reported for *IL-1 β -511* SNP, which is an AP-2 binding site [33]. The positive association with *IL-1 β -511* SNP observed in a Japanese population [6] may be restricted to this ethnic population. However *IL-1 β -511* allele 2 was significantly more present in Caucasian patients with localisation-related epilepsy, such as TLE, lobe temporal epilepsy, parieto-occipital epilepsy and multifocal epilepsy [27]. Finally, the *IL-1 β -511* SNP was associated with FS only in Finnish [34] and German cohorts of patients [35]. Very recently, Kauffman et al. assessed a meta-analysis by pooling together all published studies up to March 2007, regardless of the cohorts' ethnicity. They found a modest association between *IL-1 β -511* allele 2 and TLE-HS⁺ [36]. It is noteworthy that our results also showed no significant association for the *IL-1 β +3953* SNP, in accordance with previously published studies [6, 15]. In contrast, the present negative results for TLE-HS⁻ and these two SNP must be interpreted with caution due to the weak power of association detection.

Finally, this present study, as well as some previous related studies [1, 20, 21], were unable to replicate the initial association between *PDYN* and TLE with a family history for seizures [7]. However, a recently stratified analysis, which pools four previous studies [1, 7, 20, 21], showed a significant association [37]. Our non-observance of this association is possibly due to a lack of statistical power. Moreover, a study reported an association between 32 autosomal dominant lateral temporal epilepsy index cases and *PDYN* [38].

Conclusion

The present study adds further data to the search for susceptibility genes involved in TLE. Despite failure to replicate most of the previously reported positive associations, the publishing of our results is important for future meta-analyses. Similarly, the positive association we report for the first time with *IL-1 α* and *IL-1RA* requires further analysis for confirmation of this result.

Acknowledgements This study was supported by the University Hospitals of Geneva. We thank Dr. Roger Snowden, Firmenich S.A., for correcting the manuscript

Conflict of Interest statement The Authors certify that there is no actual or potential conflict of interest in relation to this article

References

- Cavalleri GL, Lynch JM, Depondt C et al (2005) Failure to replicate previously reported genetic associations with sporadic temporal lobe epilepsy: where to from here? *Brain* 128:1832–1840
- Cardon LR, Bell JI (2001) Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2:91–99
- Tan NC, Mulley JC, Berkovic SF (2004) Genetic association studies in epilepsy: “the truth is out there”. *Epilepsia* 45:1429–1442
- Salzmann A, Moulard B, Crespel A et al (2005) GABA receptor 1 polymorphism (G1465A) and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 46:931–933
- Briellmann RS, Torn-Broers Y, Busuttill BE et al (2000) APOE epsilon4 genotype is associated with an earlier onset of chronic temporal lobe epilepsy. *Neurology* 55:435–437
- Kanemoto K, Kawasaki J, Miyamoto T et al (2000) Interleukin (IL)1beta, IL-1alpha, and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 47:571–574
- Stogmann E, Zimprich A, Baumgartner C et al (2002) A functional polymorphism in the prodynorphin gene promoter is associated with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 51:260–263
- Blumcke I, Broekhaus A, Scheiwe C et al (1997) The apolipoprotein E epsilon 4 allele is not associated with early onset temporal lobe epilepsy. *Neuroreport* 8:1235–1237
- Zimprich A, Kraus J, Woltje M et al (2000) An allelic variation in the human prodynorphin gene promoter alters stimulus-induced expression. *J Neurochem* 74:472–477
- Rothman KJ (1990) No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology* 1:43–46
- Cavalli-Sforza L, Menozzi P, Piazza A (1994) History and geography of human genes. Princeton University Press, New Jersey
- Gambardella A, Aguglia U, Cittadella R et al (1999) Apolipoprotein E polymorphisms and the risk of non-lesional temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 40:1804–1807
- Yeni SN, Ozkara C, Buyru N et al (2005) Association between APOE polymorphisms and mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Eur J Neurol* 12:103–107
- Gambardella A, Aguglia U, Chifari R et al (2005) ApoE epsilon4 allele and disease duration affect verbal learning in mild temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 46:110–117
- Ozkara C, Uzan M, Tanriverdi T et al (2006) Lack of association between IL-1beta/alpha gene polymorphisms and temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Seizure* 15:288–291
- Kanemoto K, Kawasaki J, Yuasa S et al (2003) Increased frequency of interleukin-1beta-511T allele in patients with temporal lobe epilepsy, hippocampal sclerosis, and prolonged febrile convulsions. *Epilepsia* 44:796–799
- Heils A, Haug K, Kunz WS et al (2000) Interleukin-1beta gene polymorphism and susceptibility to temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Ann Neurol* 48:948–950
- Buono RJ, Ferraro TN, O’Connor MJ et al (2001) Lack of association between an interleukin 1 beta (IL-1beta) gene variation and refractory temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 42:782–784
- Jin L, Jia Y, Zhang B et al (2003) Association analysis of a polymorphism of interleukin 1 beta (IL-1 beta) gene with temporal lobe epilepsy in a Chinese population. *Epilepsia* 44:1306–1309
- Tilgen N, Rebstock J, Horvath S et al (2003) Prodynorphin gene promoter polymorphism and temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 53:280–281
- Gambardella A, Manna I, Labate A et al (2003) Prodynorphin gene promoter polymorphism and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 44:1255–1256
- Schellenberg GD (1995) Genetic dissection of Alzheimer disease, a heterogeneous disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8552–8559
- Moulard B, Sefiani A, Laamri A et al (1996) Apolipoprotein E genotyping in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: evidence for a major influence on the clinical presentation and prognosis. *J Neurol Sci* 139[Suppl]:34–37
- Li YJ, Hauser MA, Scott WK et al (2004) Apolipoprotein E controls the risk and age at onset of Parkinson disease. *Neurology* 62:2005–2009
- Hopkins SJ, Rothwell NJ (1995) Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci* 18:83–88
- Ban E, Milon G, Prudhomme N et al (1991) Receptors for interleukin-1 (alpha and beta) in mouse brain: mapping and neuronal localization in hippocampus. *Neuroscience* 43:21–30
- Peltola J, Keranen T, Rainesalo S, Hurme M (2001) Polymorphism of the interleukin-1 gene complex in localization-related epilepsy. *Ann Neurol* 50:275–276
- Dominici R, Cattaneo M, Malferrari G et al (2002) Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. *Immunogenetics* 54:82–86
- Jamali S, Bartolomei F, Robaglia-Schlupp A et al (2006) Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. *Brain* 129:625–641
- Wilson DR, Juan TS, Wilde MD et al (1990) A 58-base-pair region of the human C3 gene confers synergistic inducibility by interleukin-1 and interleukin-6. *Mol Cell Biol* 10:6181–6191
- Vamvakopoulos JE, Taylor CJ, Morris-Stiff GJ et al (2002) The interleukin-1 receptor antagonist gene: a single-copy variant of the intron 2 variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism. *Eur J Immunogenet* 29:337–340
- Tsai FJ, Hsieh YY, Chang CC et al (2002) Polymorphisms for interleukin 1 beta exon 5 and interleukin 1 receptor antagonist in Taiwanese children with febrile convulsions. *Arch Pediatr Adolesc Med* 156:545–548
- Dominici R, Malferrari G, Mariani C et al (2002) The Interleukin 1-beta exonic (+3953) polymorphism does not alter in vitro protein secretion. *Exp Mol Pathol* 73:139–141
- Virta M, Hurme M, Helminen M (2002) Increased frequency of interleukin-1beta (-511) allele 2 in febrile seizures. *Pediatr Neurol* 26:192–195
- Tilgen N, Pfeiffer H, Cobilanschi J et al (2002) Association analysis between the human interleukin 1beta (-511) gene polymorphism and susceptibility to febrile convulsions. *Neurosci Lett* 334:68–70
- Kauffman MA, Moron DG, Consalvo D et al (2008) Association study between interleukin 1 beta gene and epileptic disorders: a HuGe review and meta-analysis. *Genet Med* 10:83–88
- Makoff A (2007) Genetics of epilepsy: Epilepsy Research Foundation workshop report – What is the role of replication? *Epileptic Disord* 9:206–209
- Bovo G, Diani E, Bisulli F et al (2008) Analysis of LGII promoter sequence, PDYN and GABBR1 polymorphisms in sporadic and familial lateral temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett* 2:436:23–26

2.2.1 Discussion complémentaire

Grâce à cette étude de réplication, nous confirmons l'association significative de l'allèle $\epsilon 4$ d'*ApoE* avec un début précoce de l'ELT. De plus, pour la première fois, *IL-1 α* et *IL-1RA* sont associés à l'ELT dans une cohorte caucasienne. Il est important que ces résultats soient répliqués dans des cohortes indépendantes, afin de confirmer que ce ne sont pas de faux positifs. En ce qui concerne les résultats négatifs, les mêmes recommandations sont à respecter que pour l'étude précédente. Par conséquent, tous ces résultats doivent être interprétés avec prudence, car l'effet de variants dans les maladies à hérédité complexe est sans doute faible. Ainsi, afin de détecter ces effets, il faut utiliser des échantillons beaucoup plus importants que ceux utilisés jusqu'alors. Ceci peut aussi s'effectuer sous forme de méta-analyse, à condition que tous les résultats, qu'ils soient positifs ou négatifs, soient publiés.

2.3 Validation de gènes mis en évidence dans les ELT mésiales par microarray

En collaboration avec l'équipe du Dr. P. Szepetowski (INSERM, Marseille, France), nous avons mené une étude de validation de gènes identifiés par microarray (Jamali et al. 2006).

2.3.1 Etudes transcriptionnelles des gènes par microarray

Le développement récent des techniques de profilage d'expression des gènes par microarray a permis d'effectuer des études transcriptionnelles de gènes en utilisant différents tissus de patients ELT impliqués dans cette pathologie. En complément à cette approche systématique, la quantification par *real-time* PCR est un outil puissant pour confirmer les résultats des études d'expression.

Récemment, Jamali et al. ont effectué une étude d'expression génique par microarray dans une cohorte de patients avec ELT mésiale suivie d'une validation par *real-time* PCR. Pour cela, ils ont utilisé des fragments de cortex entorhinal faisant partie de la zone épileptogène du patient, ainsi qu'une partie de néocortex temporal latéral non-épileptogène. De plus, lors de l'autopsie de personnes saines, des régions homologues ont été prélevées comme contrôles. Une expression différentielle de six gènes a été mise en évidence dans les tissus de patients avec ELT mésiale et confirmés par RT-PCR. Trois gènes surexprimés codent pour des protéines du système immunitaire : *CD99* qui code pour un antigène de surface impliqué dans le processus d'adhésion des cellules T ; *CD74* qui code pour une protéine qui participe à la présentation de l'antigène ; *C3* qui code pour le composant C3 du système du complément. Parmi les trois gènes sous-exprimés, *FHL2* code pour une protéine associée à une sous-unité du canal potassique et à la presenilin-2 associée à la maladie d'Alzheimer. Les deux autres gènes sous-exprimés codent pour des récepteurs aux neurotransmetteurs : *HTR2A* code pour le récepteur à la sérotonine de type 2 et *NPY1R* code pour le récepteur de type 1 du neuropeptide Y (Jamali et al. 2006).

Des études plus récentes sont venues confirmer ces résultats. Des PCR quantitatives de l'expression des gènes du système du complément ont été effectuées sur des échantillons d'hippocampes normaux et de patients avec ELT présentant ou non une sclérose hippocampique. Une équipe a montré que *C3* était significativement surexprimé chez des patients avec ELT et sclérose hippocampique (Aronica et al. 2007). Une autre étude par microarray a été effectuée sur des échantillons d'hippocampes de patients souffrant d'ELT avec ou sans sclérose hippocampique. Les résultats ont révélé des changements de l'expression génique des échantillons

provenant des patients avec sclérose hippocampique, dont une augmentation de l'expression des gènes associés à la structure astrocytaire, à la régulation du calcium, à la réponse inflammatoire, dont CD74 (Lee et al. 2007).

2.3.2 Matériel et Méthodes

Descriptions des cohortes étudiées et des SNP choisis

Notre contribution a visé à valider l'implication de *CD74*, *NPY1R*, *HTR2A* ainsi que *C3* dans notre cohorte de patients ELT et de contrôles Caucasiens (Salzmann et al. 2005).

Tous les SNP choisis pour cette étude ne sont pas en déséquilibre de liaison les uns par rapport aux autres. Par conséquent, ils appartiennent à des blocs haplotypiques distincts les uns des autres. De plus, pour chacun des SNP choisis, l'allèle le plus rare devait avoir au minimum une fréquence $\geq 0,2$. Pour les trois premiers gènes, nous avons testé, un à deux SNP par gène : rs2569103 (5'UTR) et rs3797618 (intron 1) pour *CD74*; rs9764 (3'UTR) et rs4057797 (flanquant *NPY1R*) pour *NPY1R*; rs6311 (5'UTR) pour *HTR2A*.

De part son importance dans le système immunitaire, plusieurs SNP de *C3* ont été typés : CA-Repeat (microsatellite en 5'UTR), rs339392 (5'-UTR), rs2230199 (exon 3), rs428453 (exon 19), rs344550 (exon 34) et rs379527 (3'UTR). Grâce à un résultat statistiquement significatif chez nos patients ELT avec antécédents de CF, nous avons testé tous les SNP de *C3* dans notre cohorte de CF, recrutée entre les hôpitaux de Genève, Neuchâtel, Paris et Montpellier (*Table 7*).

Table 7 Caractéristiques démographiques et cliniques de la cohorte de CF

Variables	n = 97
M, no. (%)	54 (55.7)
F, no. (%)	43 (44.3)
Âge moyen	7.74
CF simples, no. (%)	83 (85.6)
CF complexes, no. (%)	14 (14.4)
Antécédents d'épilepsie	19 (19.6)

Toutes nos cohortes de cas et de témoins sont des Caucasiens d'Europe de l'ouest depuis, au moins, deux générations. L'origine ethnique a été déterminée par auto-questionnaire.

Méthodes statistiques

L'analyse statistique a été effectuée pour l'ensemble de la cohorte de patients ELT, ainsi que pour différents sous-groupes pertinents : TLE-HS⁺ – ELT avec sclérose hippocampique ; TLE-HS⁻ – ELT sans sclérose hippocampique ; TLE-FS⁺ – ELT avec antécédents de CF ; TLE-FS⁻ – ELT sans antécédents de CF. Afin d'effectuer des comparaisons génétiques entre les cas et les contrôles, nous avons utilisé le test de X^2 (Chi 2) et des tables de contingence 2 x 2 pour *CD74*, rs2569103 (5'UTR), rs3797618 (intron 1) ; *NPY1R*, rs9764 (3'UTR), rs4057797 (flanquant *NPY1R*) ; *HTR2A*, rs6311 (5'UTR) ; *C3*, rs2230199 (exon 3), rs428453 (exon 19), rs344550 (exon 34), rs379527 (3'UTR).

Pour analyser *C3* CA-Repeat, ainsi que l'haplotype CA-Repeat, rs339392 (5'-UTR), rs2230199 (exon 3), rs428453 (exon 19), rs344550 (exon 34), rs379527 (3'UTR), dans la cohorte ELT et des sous-groupes ci-dessus, ainsi que la cohorte de CF, nous avons utilisé le programme UNPHASED, qui permet d'estimer des haplotypes et d'accomplir des tests d'associations. UNPHASED est une application qui effectue des analyses génétiques d'associations dans des familles nucléaires et chez des sujets non-apparentés. Ce programme calcule une inférence de maximum de vraisemblance pour les effets des haplotypes et des génotypes, même si des phases sont incertaines et qu'il manque des génotypes. Le test de la vraisemblance calcule une différence de risque entre un haplotype comparé à tous les autres réunis (Dudbridge 2008).

Comme dans notre étude précédente, nous avons comparé plusieurs marqueurs polymorphiques dans différents gènes. Par conséquent, une correction de Bonferroni devrait être appliquée afin de corriger pour des tests multiples. Des ajustements pour comparaisons multiples sont recommandés, afin d'éviter de rejeter trop facilement H_0 . Pourtant, la réduction des erreurs de type I augmente le taux d'erreurs de type II et donc, augmente la fréquence des affirmations incorrectes sur les non-relations entre deux facteurs. Ainsi, ceci pourrait amener à passer à côté d'une association, contenue dans les données, qui ne serait pas dû à la chance (Rothman 1990). Donc, en ce qui concerne le rejet d' H_0 , il devrait être vu comme une évidence des données et soutenu par d'autres explications. Par conséquent, dans cette étude-ci, tout comme dans la précédente, nous avons décidé de ne pas corriger nos résultats pour tests multiples afin de ne pas nous pénaliser en passant à côté d'associations possibles.

2.3.3 Résultats

Les distributions génotypiques et alléliques chez les patients et sous-groupes de patients ainsi que chez les contrôles sont à l'équilibre d'Hardy-Weinberg dans tous les cas étudiés.

Cohorte ELT

- **CD74**

Les 2 SNP testés pour *CD74* n'ont montré aucune différence génotypique ni allélique entre les cas et sous-groupes et les témoins (*Table 8*). Par ailleurs, nous avons aussi effectué une analyse haplotypique qui s'est avérée statistiquement non-significative (données non-présentées).

Table 8 Distributions génotypiques et alléliques des SNP de *CD74*

SNP	Position	Témoins	TLE	TLE-HS ⁺	TLE- HS ⁻	TLE- FS ⁺	TLE-FS ⁻	<i>p</i> _{non-corrige}				
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	TLE vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs TLE-HS ⁻	TLE-FS ⁺ vs Témoins	TLE-FS ⁺ vs TLE-FS ⁻
rs2569103	5'-UTR	Génotypes 164	110	80	29	50	60	Non- calculable ^{a)}	Non-calculable ^{a)}	Non-calculable ^{a)}	Non-calculable ^{a)}	Non-calculable ^{a)}
	AA	141 (85.98)	85 (77.27)	61 (76.25)	23 (79.31)	39 (78.00)	46 (76.67)					
	AG	23 (14.02)	25 (22.73)	19 (23.75)	6 (20.69)	11 (22.00)	14 (23.33)					
	GG	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)					

SNP	Position	Témoins	TLE	TLE-HS ⁺	TLE- HS ⁻	TLE- FS ⁺	TLE-FS ⁻	<i>p</i> _{non-corrige}				
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	TLE vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs TLE-HS ⁻	TLE-FS ⁺ vs Témoins	TLE-FS ⁺ vs TLE-FS ⁻
	Allèles	328	220	160	58	100	120	0.077	0.072	0.754	0.197	0.877
	A	305 (92.99)	195 (88.64)	141 (88.13)	52 (89.66)	89 (89.00)	106 (88.33)					
	G	23 (7.01)	25 (11.36)	19 (11.88)	6 (10.34)	11 (11.00)	14 (11.67)					
rs3797618	Intron 1											
	Génotypes	187	116	83	32	55	61	0.989	0.784	0.397	0.819	0.608
	GG	6 (3.21)	4 (3.45)	4 (4.82)	0 (0.0)	1 (1.82)	3 (4.92)					
	GT	51 (27.27)	31 (26.72)	21 (25.30)	10 (31.25)	14 (25.45)	17 (27.87)					
	TT	130 (69.52)	81 (69.83)	58 (69.88)	22 (68.75)	10 (72.73)	41 (67.21)					
	Allèles	374	232	166	64	110	122	0.991	0.859	0.738	0.566	0.381
	G	63 (16.84)	39 (16.81)	29 (17.47)	10 (15.63)	16 (14.55)	23 (18.85)					
	T	311 (83.16)	193 (83.19)	137 (82.53)	54 (84.38)	94 (85.45)	99 (81.15)					

^{a)} Le *p* n'est pas calculable, car aucun génotype GG n'a été trouvé.

▪ ***NPY1R***

Le SNP rs9764 en 3'UTR de *NPY1R* n'a montré aucune différence génotypique ni allélique entre les cas et sous-groupes et les témoins. Par contre, le SNP rs4057797 flanquant le gène montre une différence génotypique significative entre les sous-groupes TLE-FS⁺ et TLE-FS⁻ avec une surreprésentation des hétérozygotes AT chez les TLE-FS⁺ (*Table 9*). Par ailleurs, nous avons aussi effectué une analyse haplotypique qui s'est avérée statistiquement non-significative (données non-présentées).

Table 9 Distributions génotypiques et alléliques des SNP de *NPY1R*

SNP	Position	Témoins n (%)	TLE n (%)	TLE-HS ⁺ n (%)	TLE- HS ⁻ n (%)	TLE-FS ⁺ n (%)	TLE-FS ⁻ n (%)	<i>p</i> _{non-corrige}						
								TLE vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs TLE-HS ⁻	TLE-FS ⁺ vs Témoins	TLE-FS ⁺ vs TLE-FS ⁻		
rs9764	3'UTR													
	Génotypes	195	107	75	31	51	56	0.577	0.853	0.334	0.357	0.442		
	CC	14 (7.18)	5 (4.67)	5 (6.67)	0 (0.0)	1 (1.96)	4 (7.14)							
	CT	74 (37.95)	38 (35.51)	26 (34.67)	12 (38.71)	19 (37.25)	19 (33.93)							
	TT	107 (54.87)	64 (59.81)	44 (58.67)	19 (61.29)	31 (60.78)	33 (58.93)							
	Allèles	390	214	150	62	102	112	0.311	0.607	0.462	0.248	0.538		
	C	102 (26.15)	48 (22.43)	36 (24.00)	12 (19.35)	21 (20.59)	27 (24.11)							
	T	288 (73.85)	166 (77.57)	114 (76.00)	50 (80.65)	81 (79.41)	85 (75.89)							

rs4057797 Flanquant

SNP	Position	Témoins n (%)	TLE n (%)	TLE-HS ⁺ n (%)	TLE- HS ⁻ n (%)	TLE-FS ⁺ n (%)	TLE-FS ⁻ n (%)	<i>P</i> _{non-corrige}				
								TLE vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs TLE-HS ⁻	TLE-FS ⁺ vs Témoins	TLE-FS ⁺ vs TLE-FS ⁻
NPY1R												
	Génotypes	185	116	84	31	55	61	0.566	0.381	0.136	0.094	0.016
	AA	32 (17.30)	15 (12.93)	11 (13.10)	4 (12.90)	4 (7.27)	11 (18.03)					
	AT	85 (45.95)	54 (46.55)	35 (41.67)	19 (61.29)	33 (60.00)	21 (34.43)					
	TT	68 (36.76)	47 (40.52)	38 (45.24)	8 (25.81)	18 (32.73)	29 (47.54)					
	Allèles	370	232	168	62	110	122	0.319	0.161	0.179	0.572	0.748
	A	149 (40.27)	84 (36.21)	57 (33.93)	27 (43.55)	41 (37.27)	43 (35.25)					
	T	221 (59.73)	148 (63.79)	111 (66.07)	35 (56.45)	69 (62.73)	79 (64.75)					

▪ **HTR2A**

Le SNP testé pour *HTR2A* n'a montré aucune différence génotypique ni allélique significative entre les cas et sous-groupes et les témoins (Table 10).

Table 10 Distributions génotypiques et alléliques des SNP de *HT2A*

SNP	Position	Témoins	TLE	TLE- HS ⁺	TLE-HS ⁻	TLE-FS ⁺	TLE-FS ⁻	<i>p</i> _{non-corrigé}						
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	TLE vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs TLE-HS ⁻	TLE-FS ⁺ vs Témoins	TLE-FS ⁺ vs TLE-FS ⁻		
rs6311	5'UTR													
	Génotypes	236	103	72	30	49	54	0.718	0.497	0.651	0.818	0.971		
	AA	46 (19.49)	20 (19.42)	13 (18.06)	6 (20.00)	10 (20.41)	10 (18.52)							
	AG	122 (51.69)	49 (47.57)	33 (45.83)	16 (53.33)	23 (46.94)	26 (48.15)							
	GG	68 (28.81)	34 (33.01)	26 (36.11)	8 (26.67)	16 (32.65)	18 (33.33)							
	Allèles	472	206	144	60	98	108	0.607	0.356	0.454	0.791	0.852		
	A	214 (45.34)	89 (43.20)	59 (40.97)	28 (46.67)	43 (43.88)	46 (42.59)							
	G	89 (43.20)	117 (56.80)	85 (59.03)	32 (53.33)	55 (56.12)	62 (57.41)							

▪ **C3**

Les SNP rs339392 (5'-UTR), rs2230199 (exon 3), rs428453 (exon 19), rs344550 (exon 34) et rs379527 (3'UTR) de *C3* n'ont montré aucune différence génotypique ni allélique entre les cas et sous-groupes et les témoins. Par contre, le CA-Repeat en 5'UTR dans le promoteur du gène montre une différence allélique significative entre le sous-groupe TLE-FS⁺ et les témoins avec une diminution des fréquences des allèles 132 et 138 et une augmentation de celles des allèles 140 et 146 chez les TLE-FS⁺ (*Table 11*).

Table 11 Distributions génotypiques et alléliques des SNP de *C3*

SNP	Position	Témoins n (%)	TLE n (%)	TLE- HS ⁺ n (%)	TLE- HS ⁻ n (%)	TLE- FS ⁺ n (%)	TLE-FS ⁻ n (%)	<i>p</i> _{non-corrige}					
								TLE vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs TLE-HS ⁻	TLE-FS ⁺ vs Témoins	TLE-FS ⁺ vs TLE-FS ⁻	
CA-repeat	5'UTR												
	Génotypes	196	122	87	34	57	65	0.57	0.177	0.141	0.128	0.14	
	132/132	28 (14.3)	14 (11.5)	11 (12.6)	3 (8.8)	5 (8.7)	9 (13.8)						
	132/136	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)						
	132/138	50 (25.5)	25 (20.5)	14 (16.1)	11 (32.3)	7 (12.3)	18 (27.7)						
	132/140	31 (15.8)	21 (17.2)	12 (13.8)	8 (23.5)	11 (19.3)	10 (15.4)						
	132/146	15 (7.6)	12 (9.8)	11 (12.6)	1 (2.9)	7 (12.3)	5 (7.7)						
	134/138	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)						
	136/136	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)						
	138/138	20 (10.2)	8 (6.6)	4 (4.6)	4 (11.8)	4 (7)	4 (6.1)						
	138/140	15 (7.6)	14 (11.5)	12 (13.8)	2 (5.9)	6 (10.5)	8 (12.3)						

SNP	Position	Témoins n (%)	TLE n (%)	TLE- HS ⁺ n (%)	TLE- HS ⁻ n (%)	TLE- FS ⁺ n (%)	TLE-FS ⁻ n (%)	<i>p</i> _{non-corrigé}					
								TLE vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs TLE-HS ⁻	TLE-FS ⁺ vs Témoins	TLE-FS ⁺ vs TLE-FS ⁻	
	138/142	0 (0)	1 (0.8)	1 (1.1)	0 (0)	1 (1.7)	0 (0)						
	138/146	13 (6.6)	12 (9.8)	9 (10.3)	3 (8.8)	7 (12.3)	5 (7.7)						
	140/140	9 (4.6)	7 (5.7)	6 (6.9)	1 (2.9)	4 (7)	3 (4.6)						
	140/146	9 (4.6)	4 (3.3)	3 (3.4)	1 (2.9)	1 (1.7)	3 (4.6)						
	146/146	3 (1.5)	4 (3.3)	4 (4.6)	0 (0)	4 (7)	0 (0)						
	Allèles	392	244	174	68	114	130	0.17	0.057	0.14	0.036	0.11	
	132	153 (39)	86 (35.3)	59 (33.9)	26 (38.2)	35 (30.7)	51 (39.2)						
	134	1 (0.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)						
	136	3 (0.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)						
	138	119 (30.4)	68 (27.9)	44 (25.3)	24 (35.3)	29 (25.4)	39 (30)						
	140	73 (18.6)	53 (21.7)	39 (22.4)	13 (19.1)	26 (22.8)	27 (20.8)						
	142	0 (0)	1 (0.4)	1 (0.6)	0 (0)	1 (0.9)	0 (0)						
	146	43 (15)	36 (14.8)	31 (17.8)	5 (7.3)	23 (20.2)	13 (10)						
rs339392	5'-UTR												
	Génotypes	184	117	85	31	55	62	0.599	0.546	0.427	0.856	0.455	
	GG	6 (3.26)	3 (2.56)	3 (3.53)	0 (0.0)	1 (1.82)	2 (3.23)						
	GT	53 (28.80)	40 (34.19)	30 (35.29)	9 (29.03)	16 (29.09)	24 (38.71)						

SNP	Position	Témoins n (%)	TLE n (%)	TLE- HS ⁺ n (%)	TLE- HS ⁻ n (%)	TLE- FS ⁺ n (%)	TLE-FS ⁻ n (%)	<i>p</i> _{non-corrigé}									
								TLE vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs TLE-HS ⁻	TLE-FS ⁺ vs Témoins	TLE-FS ⁺ vs TLE-FS ⁻					
rs2230199	Exon 3	TT	125 (67.93)	74 (63.25)	52 (61.18)	22 (70.97)	38 (69.09)	36 (58.06)	0.538	0.332	0.256	0.752	0.232				
		Allèles	368	234	170	62	110	124									
	G	65 (17.66)	46 (19.66)	36 (21.18)	9 (14.52)	18 (16.36)	28 (22.58)										
	T	303 (82.34)	188 (80.34)	134 (78.82)	53 (85.48)	92 (83.64)	96 (77.42)										
	Génotypes	189	122	89	32	58	64	0.89						0.928	0.256	0.916	0.256
	CC	128 (67.72)	82 (67.21)	62 (69.66)	20 (62.50)	40 (38.98)	42 (65.63)										
	CG	53 (28.04)	36 (29.51)	23 (25.84)	12 (37.50)	15 (17.11)	21 (32.81)										
	GG	8 (4.23)	4 (3.28)	4 (4.49)	0 (0.0)	3 (5.17)	1 (1.56)										
	Allèles	378	244	178	64	116	128	0.944						0.81	0.811	0.971	0.811
	C	309 (81.75)	200 (81.97)	147 (82.58)	52 (81.25)	95 (81.90)	105 (82.03)										
G	69 (18.25)	44 (18.03)	31 (17.42)	12 (18.75)	21 (18.10)	23 (17.97)											
rs428453	Exon 19	Génotypes	186	119	86	32	56	63	0.642	0.608	0.917	0.722	0.695				
		CC	27	13	9 (10.47)	3 (9.38)	6	7 (11.11)									

SNP	Position	Témoins	TLE	TLE- HS ⁺	TLE- HS ⁻	TLE- FS ⁺	TLE-FS ⁻	<i>p</i> _{non-corrigé}					
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	TLE vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs TLE-HS ⁻	TLE-FS ⁺ vs Témoins	TLE-FS ⁺ vs TLE-FS ⁻	
rs344550	Intron 34	(14.52)	(10.92)				(10.71)						
		CG	91 (48.92)	59 (49.58)	42 (48.84)	17 (53.13)	30 (27.76)	29 (46.03)					
		GG	68 (36.56)	47 (39.50)	35 (40.70)	12 (37.50)	20 (35.71)	27 (42.86)					
		Allèles	372	238	172	64	112	126	0.417	0.359	0.88	0.778	0.588
		C	145 (38.98)	85 (35.71)	60 (34.88)	23 (22.51)	42 (37.50)	43 (34.13)					
		G	227 (61.02)	153 (64.29)	112 (65.12)	41 (64.06)	70 (62.50)	83 (65.87)					
		Génotypes	190	116	84	31	56	60	0.736	0.74	0.515	0.582	0.648
		CC	91 (47.89)	52 (44.83)	36 (42.86)	15 (48.39)	26 (46.43)	26 (43.33)					
		CG	81 (42.63)	50 (43.10)	39 (46.43)	11 (35.48)	22 (39.29)	28 (46.67)					
		GG	18 (9.47)	14 (12.07)	9 (10.71)	5 (16.13)	8 (14.29)	6 (10.00)					
		Allèles	380	232	168	62	112	120	0.466	0.467	0.993	0.53	0.924
		C	263 (69.21)	154 (66.38)	111 (66.07)	41 (66.13)	74 (66.07)	80 (66.67)					

SNP	Position	Témoins n (%)	TLE n (%)	TLE- HS ⁺ n (%)	TLE- HS ⁻ n (%)	TLE- FS ⁺ n (%)	TLE-FS ⁻ n (%)	<i>p</i> _{non-corrigé}					
								TLE vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs TLE-HS ⁻	TLE-FS ⁺ vs Témoins	TLE-FS ⁺ vs TLE-FS ⁻	
rs379527	3'-UTR	117 (30.79)	78 (33.62)	57 (33.93)	21 (33.87)	38 (33.93)	40 (33.33)						
	Génotypes	180	117	85	31	56	61	0.133	0.22	0.216	0.126	0.822	
	TT	9 (5.00)	13 (11.11)	9 (10.59)	4 (12.90)	7 (12.50)	6 (9.84)						
	GT	85 (47.22)	49 (41.88)	40 (47.06)	9 (29.03)	22 (39.29)	27 (44.26)						
	GG	86 (47.78)	55 (47.01)	36 (42.35)	18 (58.06)	27 (48.21)	28 (45.90)						
	Allèles	360	234	170	62	112	122	0.371	0.198	0.334	0.474	0.977	
	G	103 (28.61)	75 (32.05)	58 (34.12)	17 (27.42)	36 (32.14)	39 (31.97)						
T	257 (71.39)	159 (67.95)	112 (65.88)	45 (72.58)	76 (67.86)	83 (68.03)							

Par ailleurs, nous avons aussi effectué une analyse haplotypique (*Tables 12 et 13*). Dans l'analyse haplotypique complète qui compare les ELT aux contrôles, l'haplotype (138-4-2-2-3-3) contenant l'allèle 138 du CA-repeat est plus rare chez les cas, alors que l'haplotype avec l'allèle 146 (146-4-2-3-2-4) est plus fréquent chez les cas. Dans l'analyse qui compare le sous-groupe TLE-HS⁺ avec les témoins, les haplotypes 132-4-2-3-2-4, 138-4-2-2-3-3 et 140-4-2-2-2-4 sont rares, alors que les haplotypes 140-4-3-3-3-3 et 146-4-2-3-2-4 sont plus fréquents chez les TLE-HS⁺. Dans l'analyse TLE-FS⁺ comparés aux témoins, les haplotypes 132-4-2-3-3-3, 138-4-2-2-3-3 et 140-4-2-2-2-4 sont rares, alors que l'haplotype 146-4-2-3-2-4 est fréquent chez les TLE-FS⁺ (*Table 12*).

Table 12 Analyse haplotypique complète de C3

Haplotype	Témoins	TLE	TLE- HS ⁺	TLE- HS ⁻	TLE-FS ⁺	TLE-FS ⁻	<i>p</i> _{non-corrigé}				
							TLE vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs TLE-HS ⁻	TLE-FS ⁺ vs Témoins	TLE-FS ⁺ vs TLE-FS ⁻
global							NS	0.0094	0.029	0.0058	0.01
132-3-2-2-2-4	0.03826	0.03614	0.0345	0	0.03699	0.05277	0.9758	0.7143	0.000094		
132-3-2-2-3-3	0.02718	0.03376	0.03026	0.03571	0.01651	0.03541	0.7498	0.803	0.9347		
132-3-2-3-2-4	0.07522	0.08117	0.08871	0.05731	0.05936	0.06801	0.5125	0.83	0.9231		
132-4-2-2-2-4	0	0.04924	0.04606	0.05305	0.07253	0.0359	0.4801	0.6681	0.3647		
132-4-2-3-2-4	0.1269	0.06233	0.03468	0.1434	0.05298	0.06663	0.5675	0.03712	0.01275		
132-4-2-3-3-3	0.06623	0.06295	0.03535	0.08929	0	0.09922	0.9327	0.5082	0.134	0.02417	0.000035
138-4-2-2-2-4	0.1639	0.1069	0.1171	0.1129	0.123	0.07549	0.1649	0.1302	0.9886		
138-4-2-2-3-3	0.07137	0.01428	0.0102	-	0.02078	-	0.01281	0.005686	-	0.01319	
138-4-2-3-2-4	0.08318	0.09992	0.08282	0.146	0.09053	0.1476	0.7534	0.9824	0.2525		
140-4-2-2-2-4	0.03159	0	0	0.03571	0	-	0.08365	0.000000000029	0.0000002	0.0000774	

Haplotype	Témoins	TLE	TLE- HS ⁺	TLE- HS ⁻	TLE-FS ⁺	TLE-FS ⁻	<i>p</i> _{non-corrige}				
							TLE vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs TLE-HS ⁻	TLE-FS ⁺ vs Témoins	TLE-FS ⁺ vs TLE-FS ⁻
Configuration CA-repeat-5'UTR- Exon3-Exon19-Intron34-3'UTR ¹⁾	Fréquence	Fréquence	Fréquence	Fréquence	Fréquence	Fréquence					
140-4-2-3-2-4	0.01162	0.04101	0.04285	0	0.03061	0.05263	0.3732	0.2974	0.141		
140-4-3-3-2-4	0.05451	0.05652	0.05307	0.1123	0.01158	0.09299	0.3886	0.7287	0.3227		0.002074
140-4-3-3-3-3	0	0.05547	0.08579	0.0231	0.1043	0.0456	0.1141	0.0242	0.1134		
146-4-2-2-2-4	0.01429	0.03151	0.03401	0.01786	0.04055	0.03281	0.3176	0.2625	0.2923		
146-4-2-3-2-3	0.01393	0.03435	0.04098	0.01786	0.05965	0.0186	0.6198	0.3828	0.2852		
146-4-2-3-2-4	0.02413	0.04141	0.05958	0	0.05161	0	0.03669	0.006421	0.001177	0.0004062	
146-4-2-3-3-3	0.03836	0.03881	0.04025	0.03571	0.02344	0.05385	0.7942	0.4839	0.3584		
146-4-2-3-3-4	0	-	-		0.03904	0	-	-	-		0.00000016

¹⁾ Avec A = 1, C = 2, G = 3, T = 4

Finalement, l'analyse haplotypique peut se réduire à 3 SNP : le CA-repeat, rs2230199 (exon 3) et rs428453 (exon 19). Les résultats montrent que l'haplotype 146-2-3 est plus fréquent chez les sous-groupes TLE-HS⁺ et TLE-FS⁺ comparés aux témoins, alors que l'haplotype 140-2-2 est plus rare chez les TLE-HS⁺ et l'haplotype 132-2-3 plus rare chez les TLE-FS⁺ (*Table 13*).

Table 13 Analyse haplotypique réduite de C3

Haplotype	Témoins Fréquence	TLE Fréquence	TLE-HS ⁺ Fréquence	TLE-HS ⁻ Fréquence	TLE-FS ⁺ Fréquence	TLE-FS ⁻ Fréquence	<i>p</i> _{non-corrigé}				
							TLE vs Témoins	TLE-HS vs Témoins	TLE-HS ⁺ vs TLE-HS ⁻	TLE-FS ⁺ vs Témoins	TLE-FS ⁺ vs TLE-FS ⁻
Configuration CA-repeat-Exon3-Exon19 ¹⁾											
146-2-3	0.08199		0.1571	0.04177	0.1754	0.07984	0.03314	0.0035	0.02633	0.02857	
140-2-2	0.04679		0.006992	0.03259	0.01223	0	0.007236	NS	NS	NS	
132-2-3	0.2738		0.1719	0.3442	0.121	0.269	NS	NS	0.01402	0.007391	

¹⁾ Avec A = 1, C = 2, G = 3, T = 4

Cohorte CF

Etant donné les résultats significatifs dans le sous-groupe TLE-FS⁺ (ELT avec antécédents de CF), nous avons décidé d'effectuer les mêmes analyses génotypiques et haplotypiques dans notre cohorte de CF (FS). Seules les données génotypiques et alléliques pour le CA-repeat sont montrées, car elles seules présentent un résultat statistiquement significatif (*Table 14*). L'analyse génotypique statistiquement significative montre que le 132/138 est rare chez les CF. Quant aux génotypes 132/132, 132/134, 132/146 et 138/140, ils sont plus fréquents chez les cas que chez les témoins. En ce qui concerne les allèles, le 138 est moins fréquent chez les CF que chez les témoins. Les allèles 140 et 146, sont, quant à eux, plus présents chez les malades.

Table 14 Distributions génotypiques et alléliques de CA-repeat de C3

	Témoins		FS		<i>p</i> _{non-corrige}
	n	%	n	%	
Génotypes	196		97		0.02
132/132	28	14.29	18	18.56	
132/136	1	0.51	0	0	
132/138	50	25.51	12	12.37	
132/140	31	15.82	17	17.53	
132/142	0	0	1	1.03	
132/146	15	7.65	10	10.31	
134/138	1	0.51	0	0	
136/136	1	0.51	0	0	
138/138	20	10.2	9	9.28	
138/140	15	7.65	10	10.31	
138/146	13	6.63	4	4.12	
140/140	9	4.59	5	5.15	
140/142	0	0	1	1.03	
140/146	9	4.59	5	5.15	
142/146	0	0	1	1.03	
146/146	3	1.53	3	3.09	
146/148	0	0	1	1.03	
Allèles	392		194		
132	153	39.03	76	39.18	
134	1	0.26	0	0	
136	3	0.77	0	0	
138	119	30.36	44	22.68	
140	73	18.62	43	22.16	

	Témoins		FS		$p_{\text{non-corrigé}}$
	n	%	n	%	
142	0	0	3	1.553	
146	43	10.97	27	13.92	
148	0	0	1	0.52	

L'analyse haplotypique (*Tables 15 et 16*) de notre cohorte de CF montre une diminution significative des fréquences des haplotypes suivants : 138-4-2-2-3-3, 140-4-2-2-2-4 et 146-4-2-3-3-3 (*Table 15*).

Table 15 Analyse haplotypique complète de C3

Haplotype	Témoins	FS	$p_{\text{non-corrigé}}$
Configuration CA-repeat-5'UTR- Exon3-Exon19-Intron34-3'UTR ¹⁾	Fréquence	Fréquence	
global			0.00672
132-3-2-2-2-4	0.03826	0.01376	0.6088
132-3-2-3-2-4	0.07522	0.1305	0.2797
132-4-2-3-2-4	0.1269	0.08083	0.3368
132-4-2-3-3-3	0.06623	0.06977	0.9033
138-4-2-2-2-4	0.1639	0.1433	0.3139
138-4-2-2-3-3	0.07137	0	0.0003984
138-4-2-3-2-4	0.08318	0.04992	0.4256
138-4-2-3-3-3	0	0.04472	0.1804
140-4-2-2-2-4	0.03159	0	0.000000000000139
140-4-3-2-3-3	0.0256	0.04545	0.4345
140-4-3-3-2-4	0.05451	0.1012	0.09318
146-4-2-3-2-4	0.02413	0.0636	0.1782
146-4-2-3-3-3	0.03836	0	0.000000000000139

¹⁾ Avec A = 1, C = 2, G = 3, T = 4

Finalement, l'analyse haplotypique peut se réduire au CA-repeat couplé à un SNP particulier. Dans les 3 cas de figure, les haplotypes ci-dessus sont moins fréquents chez les CF que chez les témoins (*Table 16*).

Table 16 Analyse haplotypique réduite de C3

Haplotype	Témoins	FS	$p_{\text{non-corrigé}}$
Configuration	Fréquence	Fréquence	
CA-repeat-Intron34			
146-3	0.04334	0	0.0005312
CA-repeat-Exon19			
138-2	0.2241	0.1172	0.0328
CA-repeat-Exon3			
140-2	0.07048	0.01969	0.01773

2.3.4 Discussion

Les études cas-témoins sont faites pour identifier les petits effets des gènes sur le génotype des maladies communes et complexes, telles que les ELT et les CF. Lors de la sélection des SNP candidats, deux approches sont possibles. La première consiste à utiliser des SNP qui possèdent une fonction biologique possible. La seconde alternative, qui est plus efficace et plus utilisée aujourd'hui, consiste à sélectionner des SNP « étiquettes » (tagSNP) se trouvant dans des blocs de DL différents et de construire les haplotypes qui en résultent. Ainsi, la majeure partie de la variation génétique de la région génomique en question est examinée.

Dans un premier temps, nous avons analysé des SNP se situant dans ou flaquant les gènes candidats les uns après les autres, malgré qu'ils n'aient pas tous une fonction biologique probable. Les trois seules associations significatives étaient : rs4057797 (*NPY1R*) dans la comparaison des sous-groupes TLE-FS⁺ et TLE-FS⁻ et CA-Repeat (C3) dans les comparaisons des TLE-FS⁺ et témoins, ainsi que CF et témoins. Tout comme dans l'étude précédente, ces résultats ne sont pas corrigés pour tests multiples, afin de ne pas passer à côté d'une association, contenue dans les données, qui ne serait pas dû à la chance (Rothman 1990). Il en va de même pour l'analyse haplotypique qui suit.

N'ayant aucune fonction biologique connue, puisqu'il est en position flanquant le gène, le résultat positif pour rs4057797 doit être interprété avec prudence et ne nous permet pas de conclure à la réelle influence du gène *NPY1R* sur le phénotype de la maladie. Cela demande réplification dans des cohortes indépendantes. De plus, n'ayant trouvé aucun résultat significatif pour l'haplotype du *NPY1R*, comportant les SNP rs9764 et rs4057797, la recommandation serait de l'étendre à plus de marqueurs appartenant chacun à des blocs de DL différents.

Nos résultats significatifs pour le CA-Repeat du gène *C3* nous ont révélé une diminution de la fréquence de l'allèle 138 chez les TLE-FS⁺, ainsi que chez les CF, alors que les allèles 140 et 146 sont plus fréquents dans ces deux mêmes cohortes. Ces résultats suggèrent que l'allèle 138 serait protecteur face à la survenue de convulsions fébriles, alors que les allèles 140 et 146 favoriseraient leur survenue.

Dans une seconde approche, nous avons réalisé une analyse haplotypique pour les gènes dans lesquels nous avons testé au moins 2 SNP. Hormis les résultats significatifs pour le gène *C3*, les résultats pour les autres gènes se sont avérés négatifs. Ceci peut s'expliquer par le fait que la région candidate n'était pas assez couverte en SNP. Il est évident que 2 SNP ne sont pas toujours suffisants pour capturer la totalité de la variabilité d'un gène et qu'ils ne reflètent pas toute la diversité génique de cette région. Par conséquent, il faudrait génotyper plus de SNP dans et flanquant ces gènes, afin de définitivement les exclure ou de les associer à un phénotype particulier. Pour le gène *C3*, nous avons génotypé 6 marqueurs, dont un microsatellite situé en 5'UTR du gène. Ceci nous a permis de révéler toute la diversité de la région génomique étudiée et de mettre en évidence des haplotypes particuliers statistiquement significatifs et associés au phénotype étudié.

Tout comme pour l'étude du *C3* CA-Repeat, deux haplotypes sont moins fréquents chez les CF ainsi que dans le sous-groupe TLE-FS⁺ : 138-4-2-2-3-3 et 140-4-2-2-2-4. Ces deux haplotypes seraient donc protecteurs face à des épisodes de convulsions fébriles. Ils seraient le reflet de la variété génotypique à un locus donné de variants communs. Ces derniers ont un effet moindre si ils sont pris un à un, mais leur combinaison peut donner lieu à un haplotype rare associée à une maladie commune. Nous avons trouvé d'autres haplotypes associés au phénotype TLE-HS⁺ : les haplotypes 132-4-2-3-2-4, 138-4-2-2-3-3 et 140-4-2-2-2-4 sont rares et seraient protecteurs face à la survenue d'une ELT, lorsque le patient présente des antécédents de sclérose hippocampique. A l'inverse, les haplotypes 140-4-3-3-3-3 et 146-4-2-3-2-4 sont plus fréquents et donc favoriseraient la survenue d'une ELT chez un patient avec sclérose hippocampique.

Nous sommes conscients qu'il faudrait étudier l'effet de tous ces haplotypes dans des cohortes indépendantes et plus grandes, ce qui augmenterait le pouvoir statistique de l'analyse. Ainsi, nous pourrions valider ou exclure l'effet de *C3* sur la maladie. De plus, il serait intéressant de tester la fonctionnalité de ces haplotypes *in vitro* dans un système cellulaire approprié.

En ce qui concerne les autres gènes à résultat statistiquement négatif, il faudrait les tester dans des cohortes comportant plus d'individus, ce qui faciliterait l'investigation de plus de tag SNP, qui seraient plus représentatifs des variations communes de toute la région génomique candidate. De plus, nous ne pouvons pas exclure un changement structural génomique dans ces

gènes candidates, comme par exemple une variation du nombre de copies (CNV en anglais pour *copy number variation*) (Feuk et al. 2006). Ce phénomène est impossible à mettre en évidence avec une étude d'association cas-témoins.

En résumé, cette étude montre pour la première fois une association entre ELT, CF et des variants génétiques du gène *C3*, qui a été montré comme surexprimé par l'équipe de Jamali et al. dans leur étude d'expression génique par microarray dans une cohorte de patients avec ELT mésiale (Jamali et al. 2006). Nous mettons aussi en évidence une association positive pour le SNP rs4057797 du gène *NPY1R*, dont la fonction reste inconnue. Finalement, nous n'observons aucune différence pour les fréquences alléliques, génotypiques et haplotypiques des gènes *CD74* et *HTR2A* et ELT.

3 Etude de liaison génétique : analyse génétique d'une famille marocaine consanguine avec le syndrome *Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus* (GEFS⁺)

3.1 Introduction

Les CF sont l'événement convulsif humain le plus commun avec une prévalence de 2–5% (Hauser 1994). Ce syndrome apparaît entre 3 mois et 5 ans. Il est associé à un épisode de fièvre, mais ne présente aucune évidence d'infection intracrânienne (Consensus Development Panel, 1980). Les CF typiques disparaissent avant l'âge de 5 ans. L'existence d'une composante génétique pour les CF a été démontrée grâce aux études familiales et de jumeaux. Rich et al. ont montré que dans certaines familles, le phénotype est compatible avec une transmission autosomale dominante et une pénétrance incomplète de la maladie (Rich et al. 1987). Neuf loci ont été impliqués dans l'étiologie des CF familiales. Parmi tous ces loci, seuls 3 gènes liés à la maladie ont été identifiés par clonage positionnel. Ces études ont été menées dans des familles de différentes origines ethniques avec un mode de transmission autosomal dominant de la maladie (*Table 17*)

Table 17 Loci candidats pour les CF

Locus	Région chromosomique	Gène identifié	Références
FEB1	8q13-q21	–	Wallace et al., 1996
FEB2	19p13.3	–	Johson et al., 1998
FEB3	2q23-q24	–	Pfeiffer et al., 1999
FEB4	5q14-q15	<i>MASS1</i> (Monogenic Audiogenic Seizure Susceptibility 1)	Nakayama et al., 2002
FEB5	6q22-q24	–	Nabbout et al., 2002
FEB6	18p11.2	<i>IMPA2</i> (Myo-Inositol Monophosphatase 2)	Nakayama <i>et al.</i> , 2004
FEB7	21q22	–	Hedera et al., 2006 Wallace et al., 2001
FEB8	5q31.1-33.1	<i>GABRG2</i> (GABA-A receptor subunit gamma-2)	Marini et al., 2003 Audenaert et al., 2006
FEB9	3p24.2-23 et 18p (modifieur possible)	–	Nabbout et al., 2007

Le syndrome GEFS⁺, déjà décrit dans le chapitre *La génétique des épilepsies*, est le lien entre les CF et d'autres types d'épilepsies. Ils forment un continuum de phénotypes, qui inclut des CF typiques ou atypiques, où les CF persistent au-delà de 5 ans, des crises afébriles, qui regroupe des crises généralisées tonico-cloniques, des absences, des crises myoclonique ou atonique, des épilepsies myoclonic-astatique et des épilepsies sévères du nourrissons (Scheffer and Berkovic 1997). Cinq loci et 4 gènes ont déjà été rapportés comme liés au syndrome GEFS⁺ (Table 18).

Table 18 Loci candidats pour les GEFS⁺

Locus	Région chromosomique	Gène identifié	Références
GEFS ⁺¹	19q13.1	<i>SCN1B</i> (Sodium voltage-gated ion channel beta subunit)	Wallace et al., 1998
GEFS ⁺²	2q21-q33	<i>SCN1A</i> (Sodium voltage-gated ion channel alpha subunit)	Escayg et al., 2000
GEFS ⁺³	5q34	<i>GABRG2</i> (GABA-A receptor subunit gamma-2)	Baulac et al., 2001
GEFS ⁺⁴	2p24	–	Audenaert et al., 2005
GEFS ⁺⁵	1q36.6	<i>GABRD</i> (GABA-A receptor subunit delta)	Dibbens et al., 2004

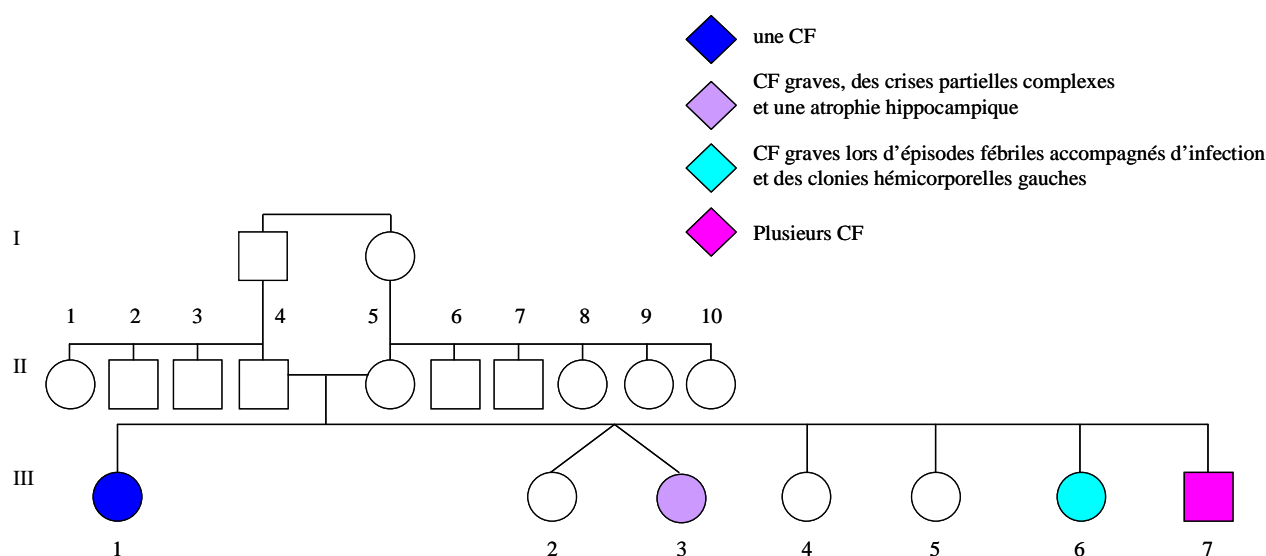
3.2 Matériel & Méthodes

3.2.1 Analyse de la famille

Une famille présentant un syndrome GEFS⁺ a été identifiée par le Dr. D. Chaigne, neuropédiatre, attaché des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Originaire du Maroc, cette famille, dont les parents sont consanguins, présente quatre malades avec des phénotypes différents :

- L'individu III-1 a fait une seule CF à l'âge de 3 ans.
- L'individu III-3 a une fausse jumelle (III-2). Elle a fait plusieurs CF graves, des crises partielles complexes et présente une atrophie hippocampique.
- L'individu III-6 : a fait des CF graves à l'âge de 3 ans lors d'épisodes fébriles accompagnés d'infections. Elle a présenté des clonies hémicorporelles gauches. Elle a été traitée d'emblée avec de la Dépakine (acide valproïc) et les crises ne sont plus revenues.
- L'individu III-7 a présenté à la naissance une hydrocéphalie post-hémiplégique sur phlébite accompagnée de crises. Puis intervalle libre. A 11 mois, il a fait plusieurs CF. A noter que ce patient est sous Gardenal depuis sa naissance.

Figure 27 Famille marocaine consanguine de trois générations avec syndrome GEFS⁺



3.2.2 Extraction d'ADN

Des échantillons sanguins ont été prélevés chez les 4 individus affectés ainsi que chez les 5 individus sains de la deuxième et troisième génération (II-2–III-7). L'ADN génomique a été extrait du sang veineux, à partir des leucocytes. Pour cela, le kit d'extraction d'ADN, *Nucleon BACC 2 kit* (Amersham), à base de phénol-chloroforme a été utilisé.

3.2.3 Analyse des loci candidats FEB et GEFS⁺

Une cartographie d'exclusion a été effectuée en utilisant des marqueurs (microsatellites et répétitions introniques) se situant dans ou flanquant les loci FEB et GEFS⁺ (*Table 19*)

Table 19 Marqueurs utilisés pour la cartographie primaire d'exclusion

Locus	Marqueur	Position génétique (cM)	Position physique (Mb)
GEFS ⁺ 1	D19S414	53.20	36.60
	D19S868	55.90	38.15
	D19S425	58.70	40.19
	SCN1BInt1 (GCC-repeat in intron 1)	59.00	40.21
	D19S893	61.40	40.26
	GEFS ⁺ 2/FEB3	D2S382	174.90
D2S124		175.40	165.85
D2S111		175.00	165.97
D2S2330		175.50	166.41
D2S2345		177.20	168.43
D2S326		184.10	172.81
D2S2314		188.90	176.57
GEFS ⁺ 3		D5S1465	162.00
	GABRG2Int1 (CA-repeat in intron 1)	162.50	161.44
	GABRG2Int5 (CA-repeat in intron 5)	162.60	161.48
	D5S2576	162.63	161.51
	D17S2131	162.75	161.88
	D5S422	163.90	162.09
	GEFS ⁺ 4	D2S1360	38.33
D2S305		38.87	19.28
D2S2342		40.47	20.19
FEB1	D8S553	81.50	67.10

Locus	Marqueur	Position génétique (cM)	Position physique (Mb)
FEB2	D8S533	81.50	67.16
	D8S1058	90.10	73.09
	D8S279	90.20	73.15
	D19S424	10.97	3.18
	D19S894	15.55	4.34
	D19S177	20.75	5.47
	D19S1034	20.75	6.06
	D19S406	25.17	7.33
	D19S76	25.17	7.56
FEB4	MASS1Int85 (CA-repeat in intron 85)	99.30	90.20
	D5S644	104.76	95.84
	D5S2079	108.07	98.23
FEB5	D6S1620	129.10	129.99
	D6S1572	129.80	131.38
	D6S472	132.70	132.58
FEB6	D18S1153	34.70	10.12
	D18S1158	38.10	10.73
	IMPA2Int5 (CA-repeat in intron 5)	42.00	12.01
	D18S71	42.80	12.59

De par sa consanguinité, cette famille marocaine a été analysée selon l'hypothèse suivante : le trait est déterminé par l'homozygotie pour une même mutation responsable, et donc un même haplotype flanquant, héritée par descendance. Les lod scores ont été calculés en *single-point* ou *two-point* par le programme MERLIN (ver. 1.1.2.), selon un modèle autosomal récessif.

3.2.4 Analyse de liaison pangénomique

Dans un deuxième temps, une analyse de liaison pangénomique a été réalisée en utilisant les puces à ADN *Affymetrix GeneChip Mapping 500K array NspI chip*[®], selon les instructions du fabricant (<http://www.affymetrix.com/support/index.affx>). Ces puces ont permis de génotyper ~260,000 SNP par individu. Elles ont été scannées par le scanner *GeneChip Scanner 3000 7G*[®], données ont été traitées avec le programme GeneChip Operating Software (GCOS, ver. 1.4), puis le programme GeneChip Genotyping Analysis Software (GYTPE, ver. 4.1) a permis de calculer les *call rates*, mais aussi de transformer les données, afin de les rendre compatibles avec le programme MERLIN. Grâce à lui, nous avons effectué une analyse paramétrique de liaison *single*

point en utilisant un modèle autosomal récessif, avec une pénétrance complète et une fréquence allélique à 0.001. Afin de confirmer la région identique par descendance présente à l'état homozygote chez uniquement tous les malades, nous avons utilisé le programme AutoSNPa (Carr et al. 2006).

Afin d'affiner l'analyse de la région homozygote et identique par descendance mise en évidence chez tous les affectés de la famille, des microsatellites, choisis grâce à UCSC (<http://genome.ucsc.edu>), ont été génotypés chez tous les individus de la famille (*Table 20*).

Table 20 Microsatellites utilisés pour affiner l'analyse de liaison

Markers	Position génétique (cM)	Position physique (Mb)
D8S1828	70.60	56.96
D8S1816	70.60	57.52
D8S507	75.00	59.30
D8S1763	78.30	60.27
D8S1812	78.30	60.85
D8S260	78.80	61.98
D8S1843	78.80	62.42
D8S1696	79.40	64.00
D8S544	81.00	65.75
D8S1841	81.50	66.22
D8S1785	82.00	67.74
D8S1775	85.80	68.99

3.2.5 Analyse du nombre de copies d'ADN

Afin de tester l'existence d'une délétion ou d'une duplication chromosomique ségrégeant avec le phénotype, nous avons vérifié le nombre de copies d'ADN (en anglais, *copy-number variations* – CNVs) chez un des quatre affectés (III-1). L'expérience a été réalisée grâce au kit *Agilent Human Genome CGH Microarray Kit 244K* (Santa Clara, CA). La puce a été scannée par un scanner *Agilent DNA microarray scanner*. Les données ont été obtenues par le programme *Agilent Feature extraction software 9* et ont été analysées par le programme *Agilent CGH analytics 3.4 software*. Puis, ces données de cartographie ont été analysées sur la base des séquences du génome humain, en utilisant la base de données *NCBI Build 35, Hg17* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Puis, les variations du nombre de copies ont été vérifiées grâce à

la base de données Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>, Human genome (May 2004 Assembly)(hg17)).

3.2.6 Séquençage des gènes candidats de la région d'intérêt

Tous les gènes connus et prédits de la région identique par descendance et homozygotes chez les membres affectés de la famille ont été séquencés. Des PCR pour tous les exons et les jonctions d'épissage ont été réalisées. Pour cela, les amorces PCR ont été élaborées grâce aux séquences publiées dans les bases données *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) et UCSC (<http://genome.ucsc.edu>), avec le programme Primer3 (ver. 0.4.0) (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

Les produits PCR ont été purifiés avec le kit *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Germantown, MD, USA) et séquencés, en utilisant le kit *ABI PRISM BigDye Terminators v1.1 / v3.1 Sequencing Kit*, par un *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'analyse des séquences a été réalisée par les programmes ApE - A Plasmid Editor (ver. 1.12) et Sequencher (ver. 4.8).

3.2.7 Analyse de deux mutations dans le promoteur du gène *CRH*

Combi et al., ont identifié deux variations nucléotidiques, -1470C>A et -1166G>C, dans la région promotrice de *CRH* qui code pour la corticotropin releasing hormone, chez des patients souffrant d'épilepsie nocturne du lobe frontal (Combi et al. 2005). Etant donné que *CRH* est un gène candidat potentiel situé dans la région identique par descendance et homozygote chez les malades, une PCR avec des amorces flanquant les deux mutations a été réalisée dans la famille marocaine.

3.2.8 Analyse des mutations *CPA6* (C1025T) Ala270Val et *C8orf45* (A290G) Tyr70Cys par pyroséquençage

Les mutations *CPA6* (C1025T) et *C8orf45* (A290G) ont été génotypées dans les cohortes de témoins caucasiens et de CF décrites plus haut, dans un échantillon de malades maghrébins de l'hôpital de Tunis (Tunisie) hospitalisés pour infarctus du myocarde, ainsi que dans deux familles consanguines originaires de Sousse, en Tunisie, et souffrant d'EMJ. Le génotypage a été réalisé par pyroséquençage en utilisant le système *Pyrosequencing System* (Biotage, Uppsala, Sweden) et les instructions du fabricant (<http://www.biotage.com>).

3.2.9 CPA6 et C8orf45 séquencés dans la famille FEB1 (Wallace et al. 1996)

Tous les exons des gènes *CPA6* et *C8orf45* ont été séquencés chez certains individus de la famille FEB1 : II-1, II-4, II-6 and II-8 (*Figure 18*) (Wallace et al. 1996). Les amorces PCR sont les mêmes que celles utilisées pour le séquençage des gènes candidats.

3.2.10 Analyse de l'expression des gènes CPA6 et C8orf45 par RT-PCR

L'ARN a été extrait d'hippocampes, de noyaux du raphé et de cortex, car ces régions sont potentiellement impliquées dans l'épilepsie (voir l'introduction). Ce matériel provient de 2 témoins caucasiens sans antécédent connu d'épilepsie. L'extraction a été effectuée avec le kit *Rneasy LT mini kit and Rnase free Dnase set* (Qiagen, Germantown, MD, USA). La qualité de l'extraction des échantillons ARN a été contrôlée par un bioanalyseur *2100 Bioanalyzer* (Agilent, Santa Clara, CA, USA). La synthèse d'ADNc a été effectuée par le kit *SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Des RT-PCR ont été réalisées avec l'ADNc pour les deux gènes mutés *CPA6* et *C8orf45*, ainsi que pour un gène de ménage qui code pour la β -actine, dont les amorces sont livrées avec le kit *SuperScript III*. Les amorces pour les RT-PCR des gènes d'intérêt se situent en 3'UTR. Elles ont été élaborées de la même manière que les amorces utilisées pour le séquençage.

3.2.11 Analyse comparative des séquences protéiques de CPA6 et C8orf45

Les programmes ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) et BOXSHADE 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) ont été utilisés pour faire des alignements de séquences multiples, afin de déterminer le degré de conservation de la séquence protéique de CPA6 et de C8orf45 au travers de l'évolution des vertébrés. De plus, pour CPA6, un alignement avec les autres membres de la sous-famille A/B des carboxypeptidases a été réalisé (Lyons et al. 2008).

3.2.12 Analyse de la structure protéique de CPA6 et C8orf45

Le programme Deep View (ver 3.7) (<http://spdbv.vital-it.ch/>), autrefois nommé Swiss-PDB Viewer, a été utilisé afin de modéliser les protéines CPA6 & C8orf45 ainsi que leur mutation et leur localisation dans la structure protéique.

Une recherche pour la protéine CPA6 a été effectuée sur le site ExPASy (<http://www.expasy.ch/>), pour savoir si la mutation joue un rôle dans la fonction protéique. Afin

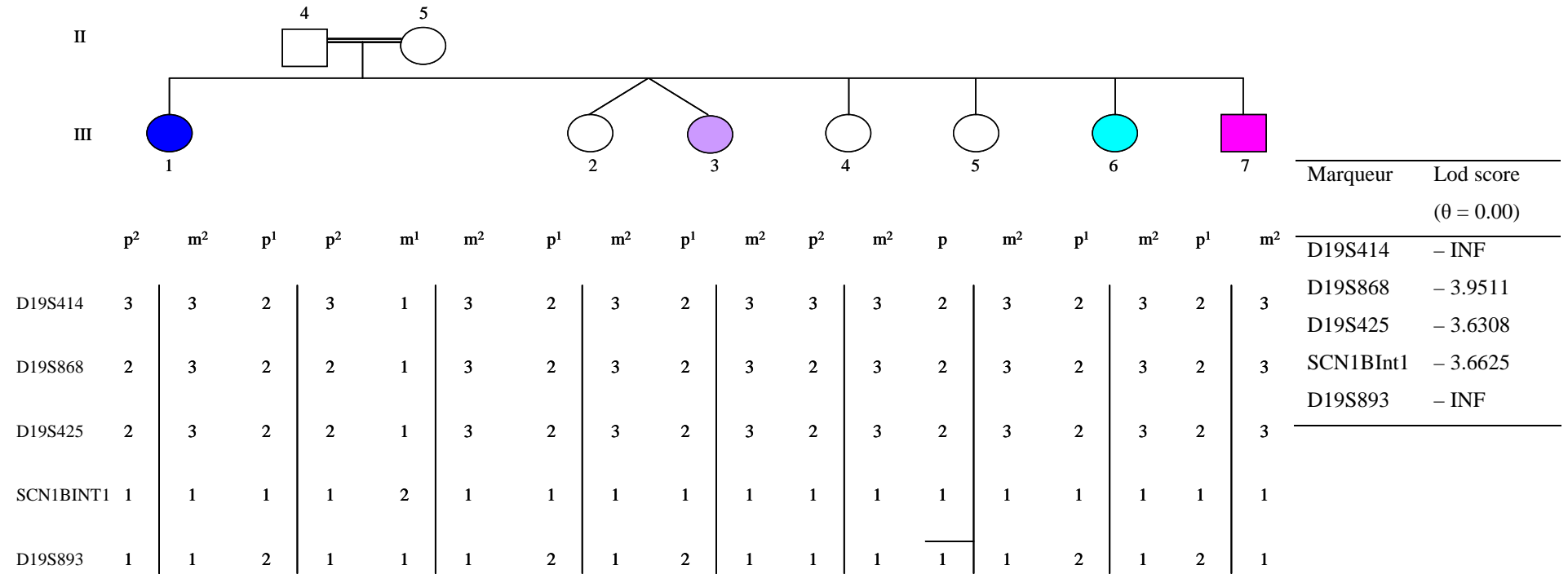
de connaître sa fonction probable, la séquence protéique de C8orf45 a été analysée par Mode Base (<http://modbase.compbio.ucsf.edu>) disponible sur le site ExPASy et Specialized BLAST, *Find conserved domains in your sequence (cdfs)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.3 Résultats

3.3.1 Cartographie primaire d'exclusion des loci candidats FEB et GEFS⁺

Aucune des régions contenant un gène de vulnérabilité aux CF ou GEFS⁺ déjà publié n'a été trouvée homozygotes chez les malades seulement (*Figures 28–36*). Ces résultats excluent l'implication de ces régions dans l'épilepsie présente dans cette famille, selon un modèle récessif avec homozygotie par descendance.

Figure 28 Haplotypes et two-point lod scores au locus GEFS⁺1



◆ une CF ; ◆ CF sévères, crises partielles sévères et atrophie hippocampique ; ◆ CF sévère ; ◆ Plusieurs CF

Figure 29 Haplotypes et *single-point* lod scores au locus GEFS⁺2/FEB3

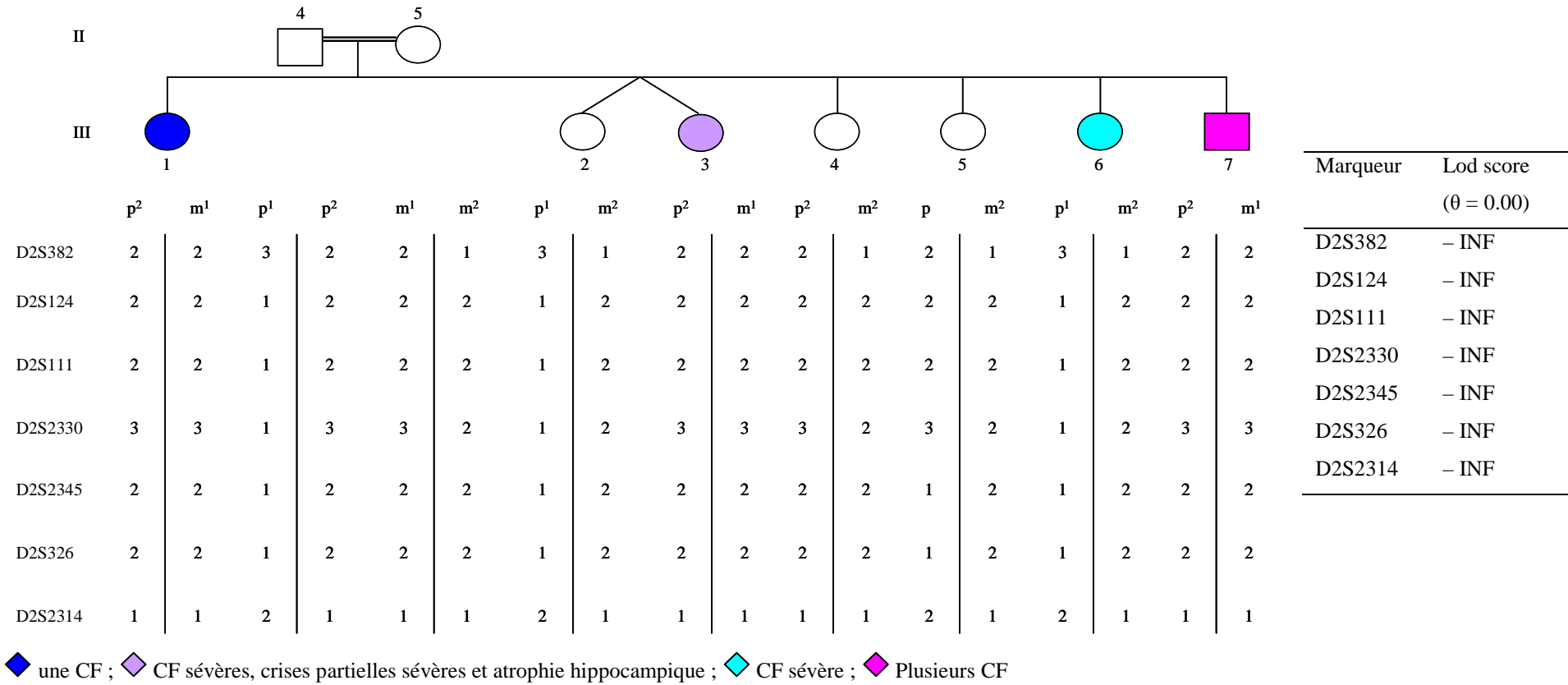


Figure 30 Haplotypes et *single-point* lod scores au locus GEFS+3

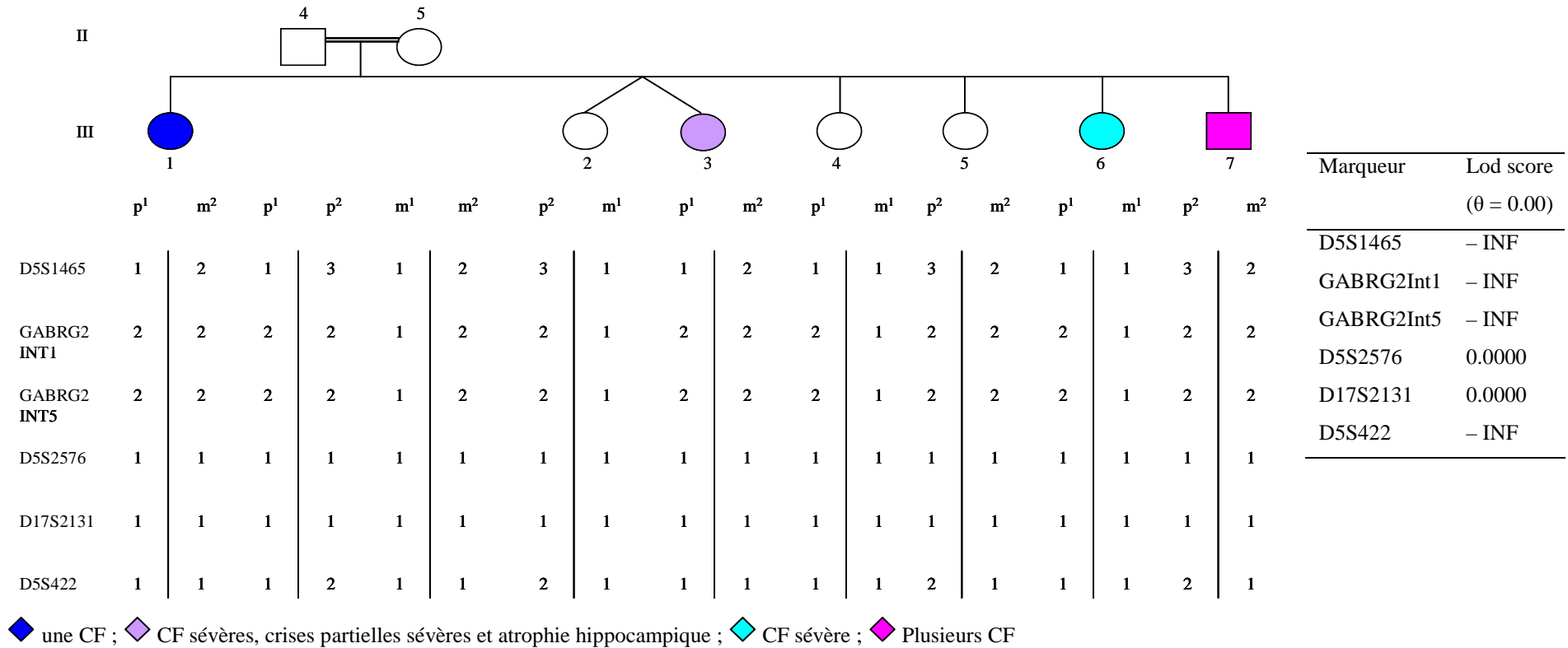


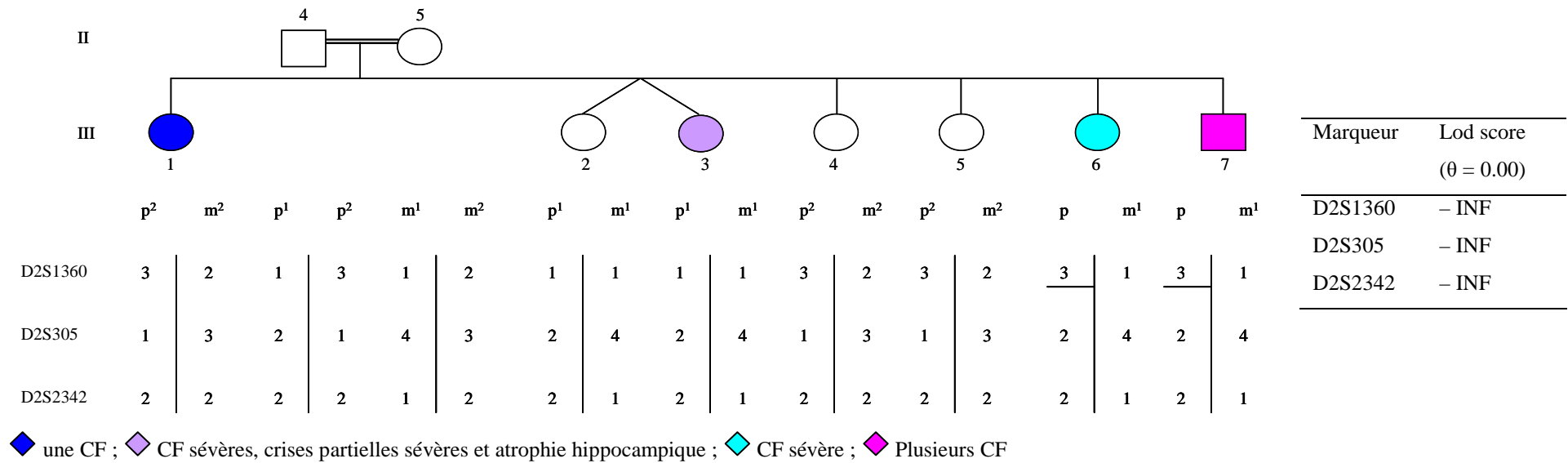
Figure 31 Haplotypes et *single-point* lod scores au locus GEFS⁺4

Figure 32 Haplotypes et single-point lod scores au locus FEB1

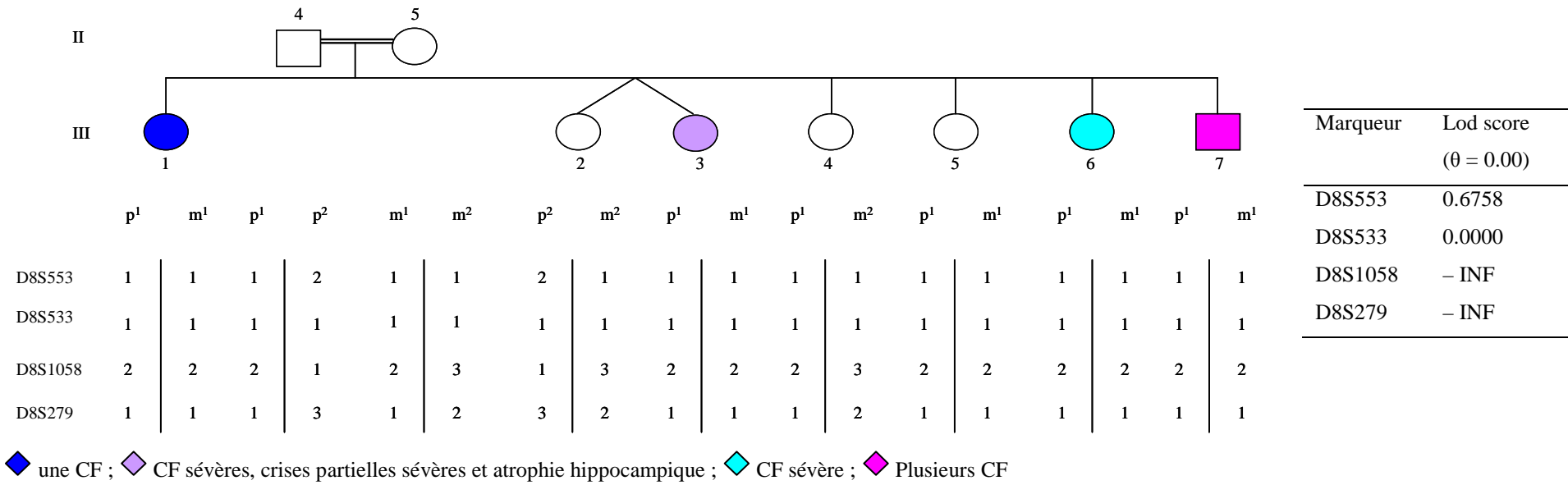


Figure 33 Haplotypes et *single-point* lod scores au locus FEB2

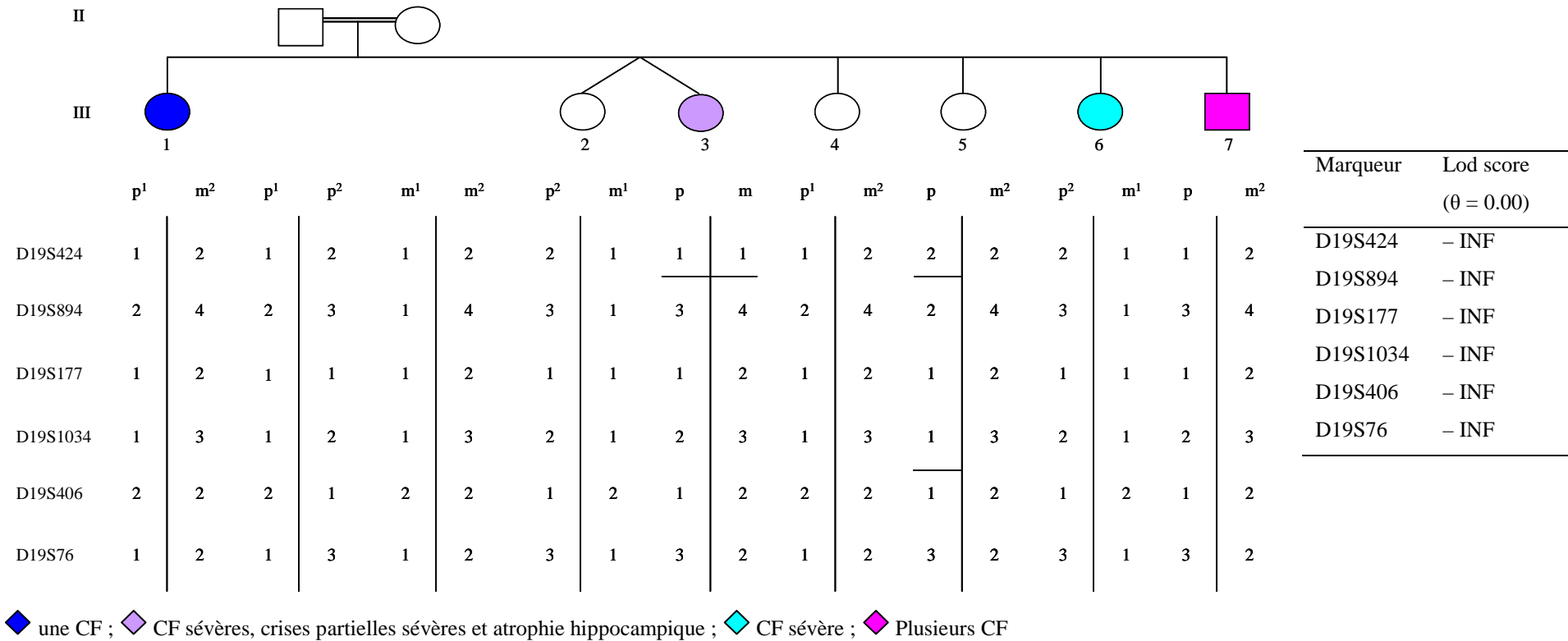


Figure 34 Haplotypes et *single-point* lod scores au locus FEB4

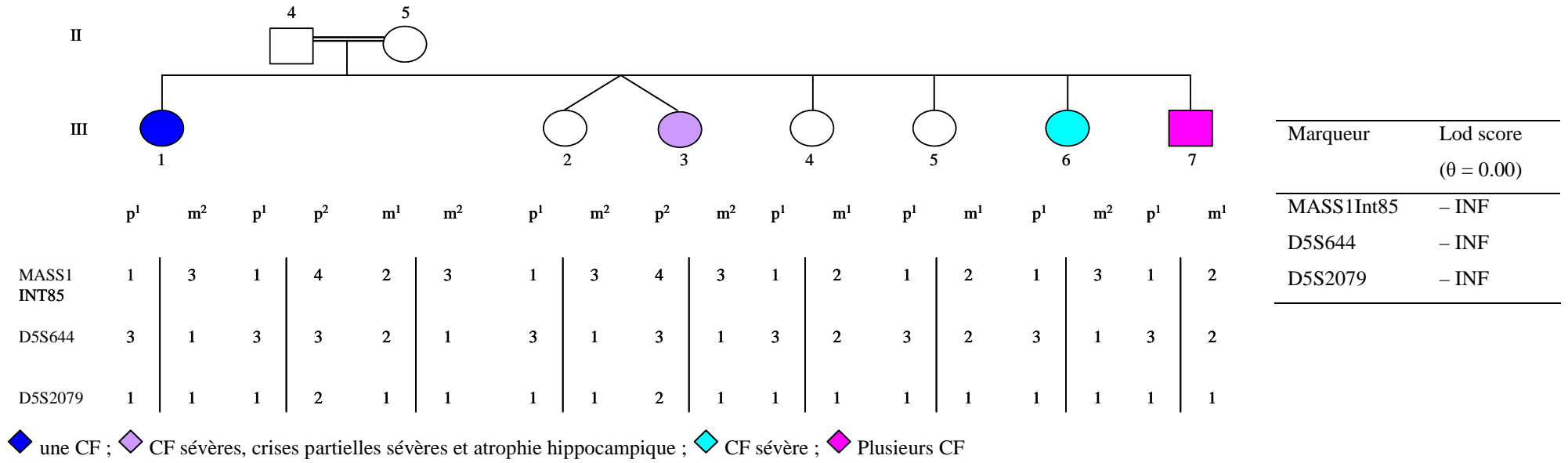
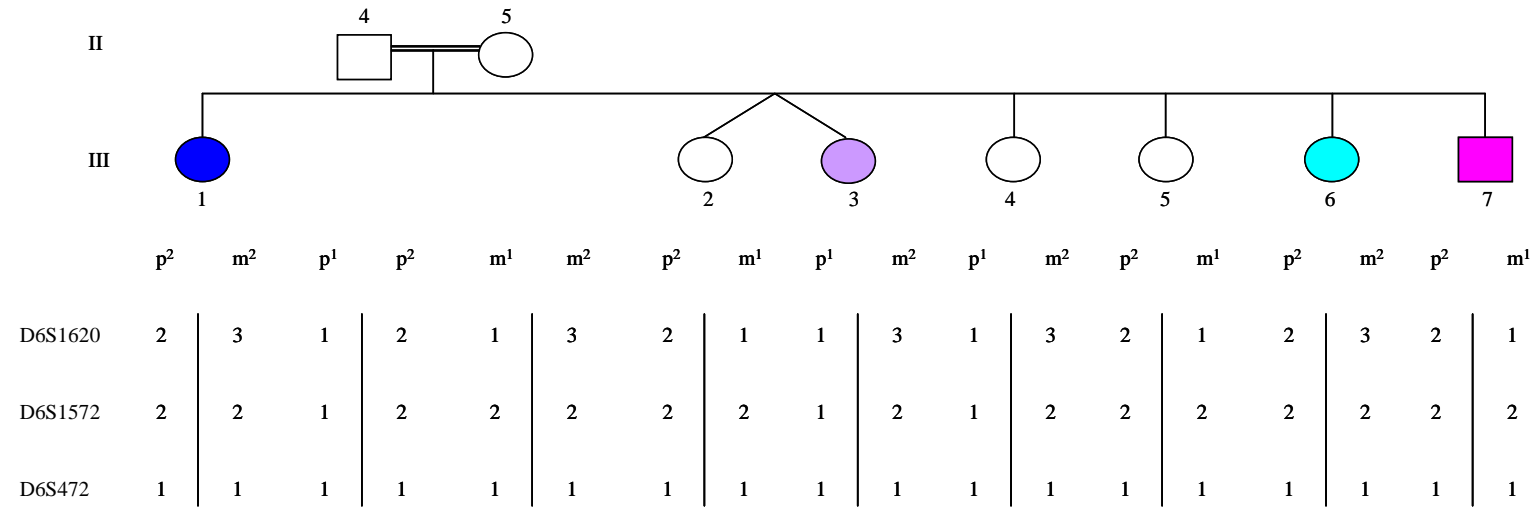


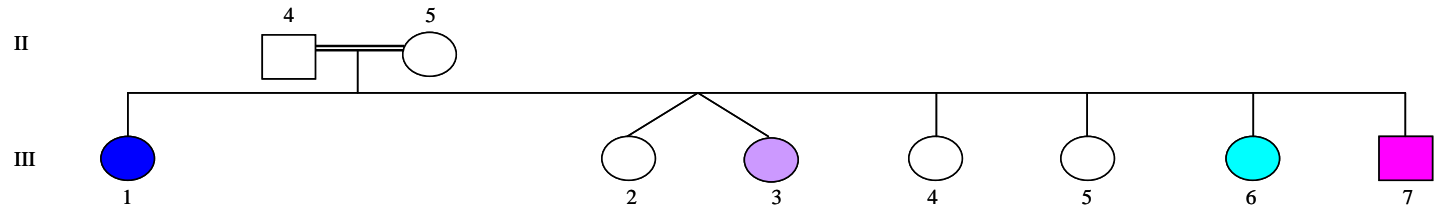
Figure 35 Haplotypes et *single-point* lod scores au locus FEB5



Marqueur	Lod score ($\theta = 0.00$)
D6S1620	- INF
D6S1572	- INF
D6S472	0.0000

◆ une CF ; ◆ CF sévères, crises partielles sévères et atrophie hippocampique ; ◆ CF sévère ; ◆ Plusieurs CF

Figure 36 Haplotypes et *two-point* lod scores au locus FEB5



Marqueur	Lod score ($\theta = 0.00$)
D18S1153	- INF
D18S1158	- INF
IMPA2Int5	- INF
D18S71	- INF

	p ²	m ¹	p ¹	p ²	m ¹	m ²	p ²	m ¹	p ²	m ²	p ²	m ¹	p ²	m ²	p ²	m ¹	p ²	m ¹
D18S1153	2	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1
D18S1158	1	1	3	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1
IMPA2INT5	4	1	3	4	1	2	4	1	4	2	4	1	4	2	4	1	4	1
D18S71	2	3	1	2	3	2	2	3	2	2	2	3	2	2	2	3	2	3

◆ une CF ; ◆ CF sévères, crises partielles sévères et atrophie hippocampique ; ◆ CF sévère ; ◆ Plusieurs CF

3.3.2 Etude de liaison *génomique*

L'étude de liaison paramétrique réalisée par MERLIN en *single-point* a révélé deux régions, avec pour toutes les deux, un maximum de lod score = 2.18 ($\theta = 0.0$) et donc probablement liées au phénotype de la maladie dans la famille marocaine sur les chromosomes 8q12-13 et 21q22 (Figures 37 et 38).

Figure 37 Liaison paramétrique génome entier

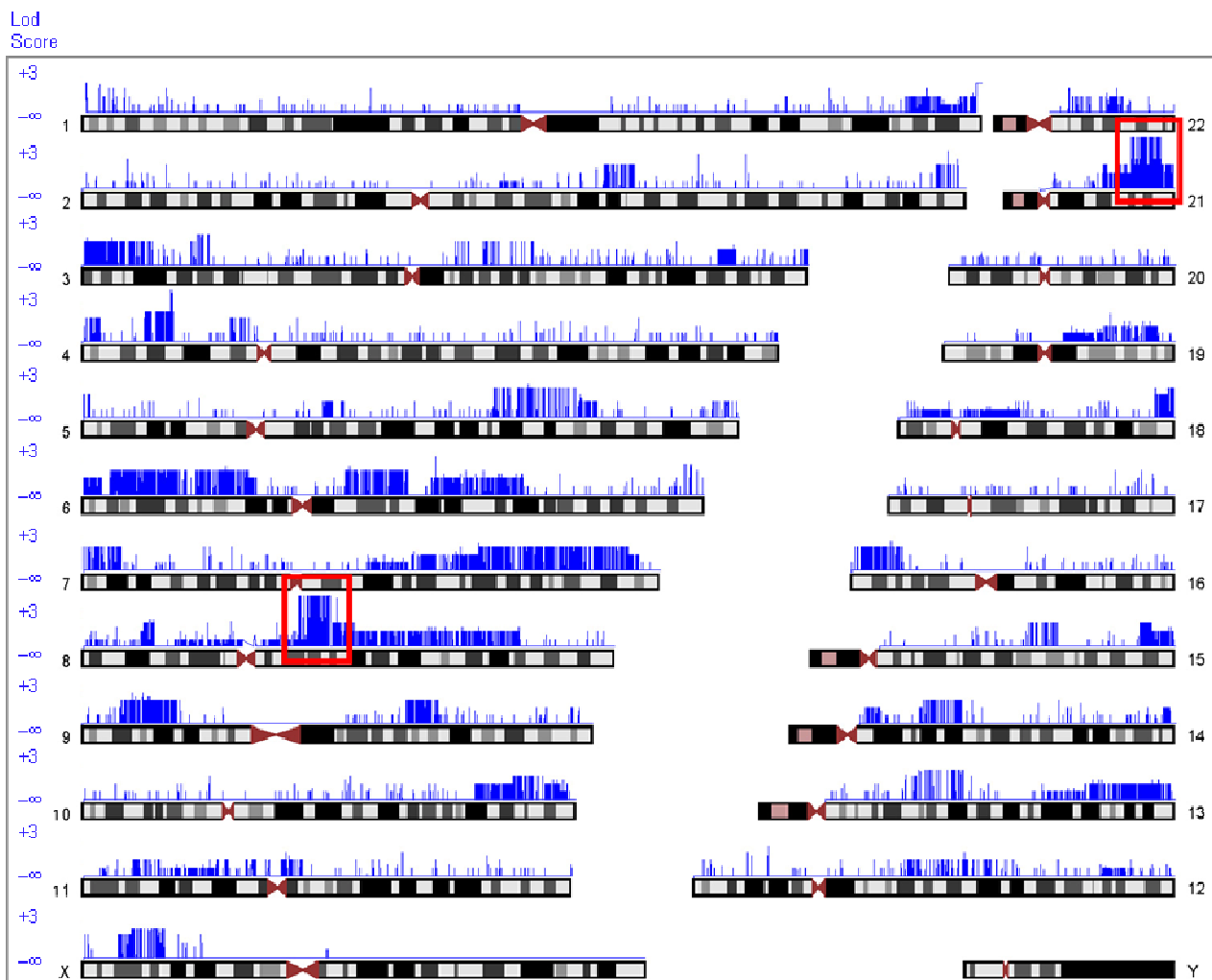
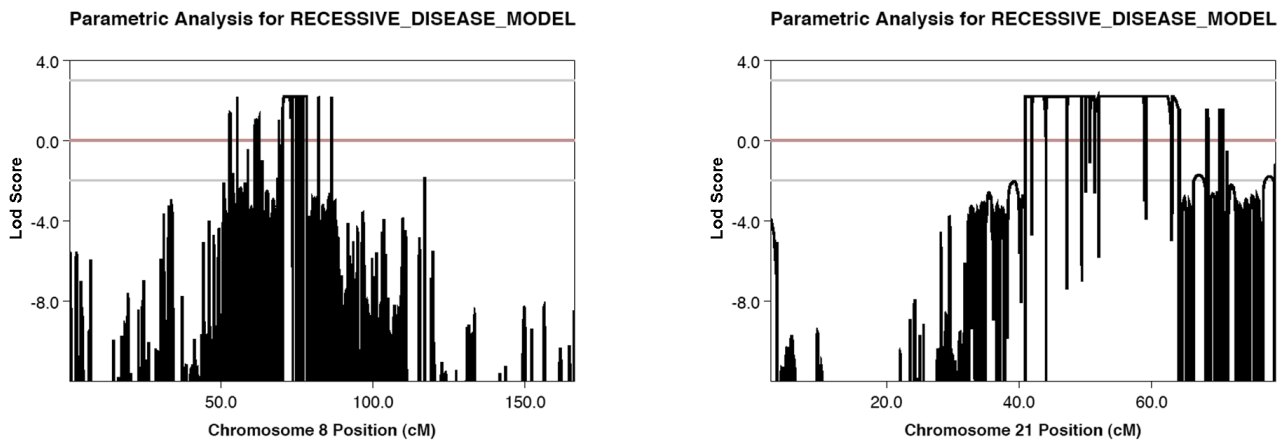
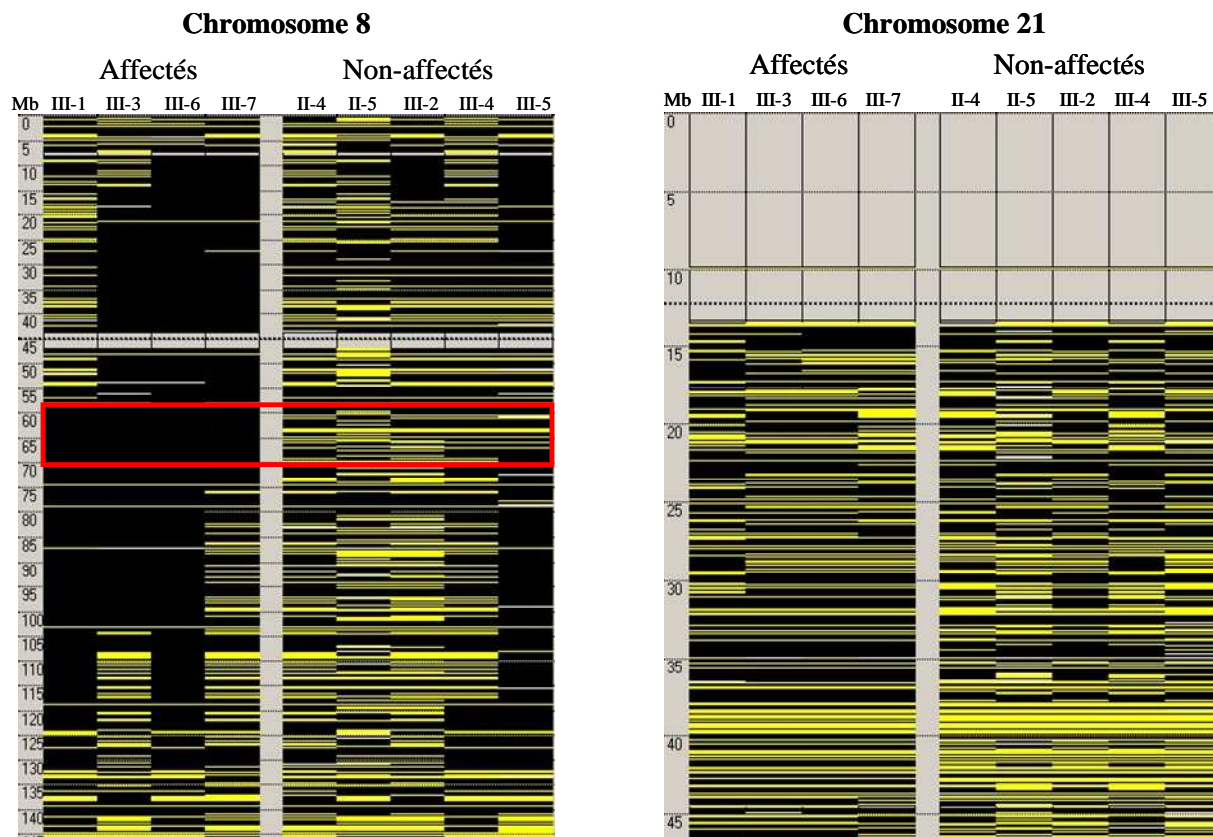


Figure 38 Liaison paramétrique chromosomes 8q12-13 et 21q22



Afin de déterminer si ces deux loci étaient liés au syndrome GEFS⁺, les haplotypes de ces régions chromosomiques ont été reconstruit grâce à MERLIN (données non-montrées). Sur le chromosome 21q22, il est apparu qu'un haplotype particulier maternel et un haplotype particulier paternel étaient transmis uniquement aux affectés, mais jamais aux enfants sains. Mais ce locus a pu être exclu, car ces haplotypes maternel et paternel n'étaient pas identiques par descendance. Par contre, la reconstruction des haplotype pour le locus 8q12-13 a révélé un haplotype identique par descendance présent à l'état hétérozygote chez le père et la mère et à l'état homozygote uniquement chez tous les affectés de la famille. Ces résultats ont été confirmés par AutoSNPa (Figure 39).

Figure 39 Régions identiques par descendance schématisées par AutoSNPa pour les chromosomes 8q12-13 et 21q22



Les bandes noires représentent les génotypes *homozygotes communs*, alors que les bandes jaunes représentent les génotypes *hétérozygotes* et les génotypes *homozygotes rares*.

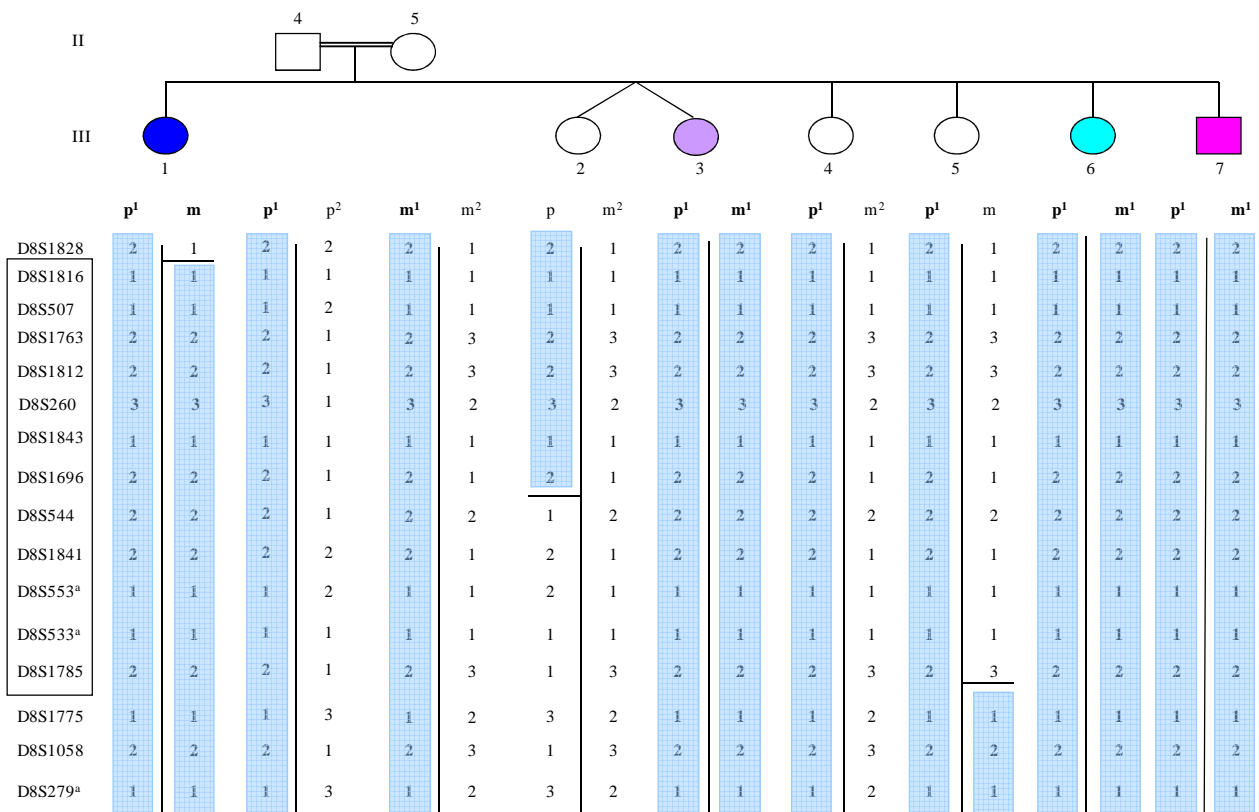
Les résultats de *single-point* lod scores calculés par MERLIN au locus 8q12-13 révèlent une région de ~ 9.6 Mb avec des bornes situées aux marqueurs rs17176439 et rs13249327 (respectivement 59.20 et 68.89 Mb du côté centromérique q) (Table 21).

Table 21 *single-point* lod scores au locus 8q12-13

Marqueur	Position [Mb]	Lod score ($\theta = 0.00$)
rs17176439	59.20	– INF
rs10957032	59.22	0.4276
rs17210787	59.84	2.1810
rs4631456	61.27	2.1810
rs7003213	62.80	2.1810
rs2084799	63.55	2.1810
rs4382471	64.02	2.1810
rs10093096	65.07	2.1810
rs7842924	66.28	2.1810
rs2555575	67.54	2.1810
rs2623828	68.86	2.0304
rs13249327	68.90	– INF

Afin d'effectuer une analyse approfondie de la région candidate identique par descendance et homozygote chez tous les affectés, des microsatellites ont été génotypés chez tous les individus de la famille (*Figure 40*). La borne centromérique de la région est définie par l'événement de recombinaison de l'individu affecté III-1 entre les marqueurs D8S1828 et D8S1816. La borne télomérique est déterminée par l'événement de recombinaison de l'individu sain III-5 entre les marqueurs D8S1785 et D8S1775.

Figure 40 Haplotypes de la région candidate au locus 8q12-13



^aMicrosatellites de Wallace *et al.*, 1996

Ces résultats montrent que cette région candidate se superpose au locus FEB1 (67.10–73.15 Mb sur le chromosome 8) (Wallace et al. 1996) sur ~1.8 Mb.

3.3.3 Nombre de copies d'ADN

Le résultat de l'analyse du nombre de copie chez l'individu affecté III-1 n'a montré aucun gain, ni aucune perte significative de région chromosomique : Arr cgh 1-22(#oligo)x2,X(#oligo)x2,Y(#oligo)x0; femme normale.

3.3.4 Gènes candidats de la région d'intérêt

La région candidate critique de 9.6 Mb contient 38 gènes connus et prédits (Ensembl and UCSC 2007), mais aucun gène codant pour un canal ionique (Figure 41) (Table 22). Ces 38 gènes ont tous été séquencés.

Figure 41 Trente-huit gènes de la région candidate de 9.6 Mb sur le chromosome 8q12-13

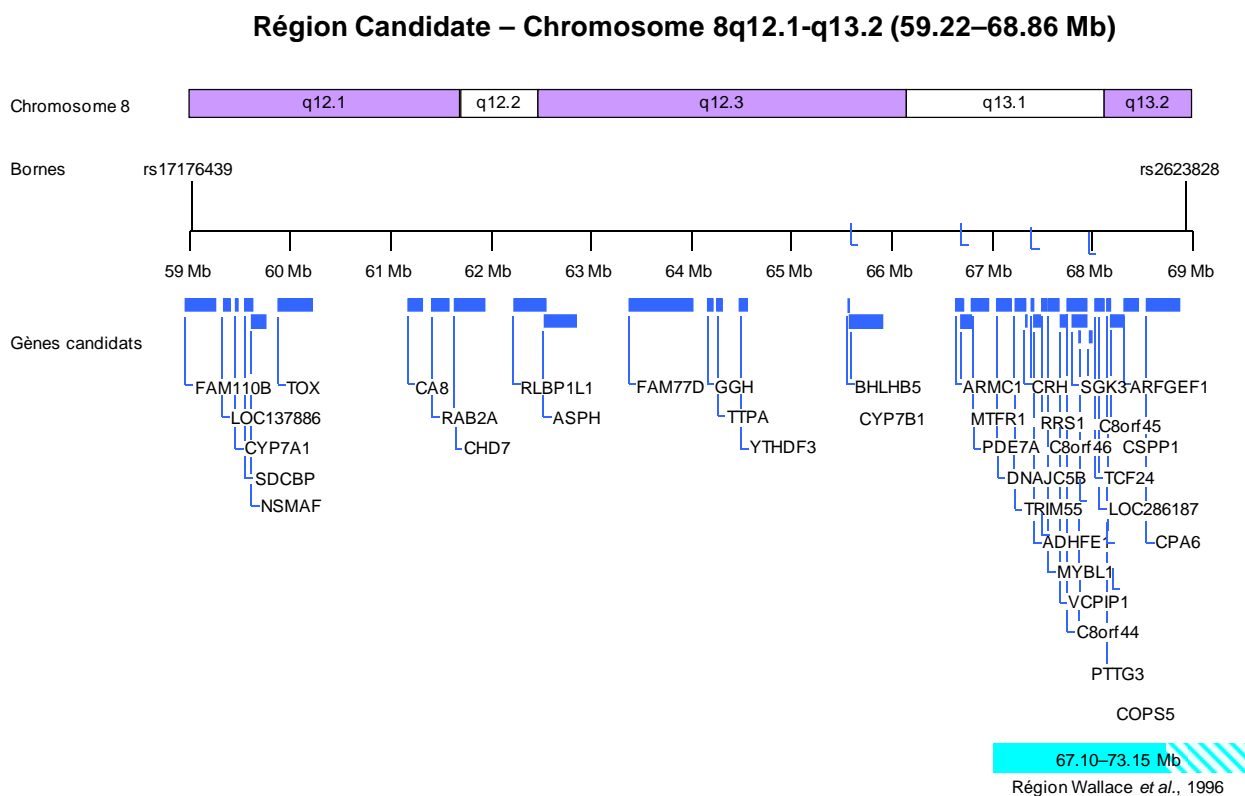


Table 22 Description des gènes et gènes prédits de la région candidate sur le chromosome 8q12-13

Gène et gène prédit	Description (www.ensembl.org)	Position [pb] (www.ensembl.org)	Exons	Exons codants	OMIM	Fonction (www.ensembl.org)
FAM110B	Family with sequence similarity 110, member B	59'069'667– 59'222'812	5	1	611394	FAM110B localized to centrosomes and accumulated at the spindle poles during mitosis, colocalized with CSPP1 at the microtubule-organizing center at interphase and at aberrant mitotic spindles, induced by CSPP1 expression, in mitosis. Expression of FAM110B also impaired cell cycle progression through G1.
LOC137886 (NP_001071087.1)	Pas de description	59'486'377– 59'526'613	8	8	–	
CYP7A1	Cytochrome P450 7A1	59'565'292– 59'575'275	6	6	118455	Microsomal cytochrome P450 that catalyzes the first step in bile acid synthesis.
SDCBP	Syntenin-1	59'628'282– 59'657'972	9	8	602217	Syntenin may function as an adaptor that couples syndecans to cytoskeletal proteins or cytosolic downstream signal-effectors.
NSMAF	Protein FAN/Neutral sphingomyelinase activation-associated factor	59'658'624– 59'734'940	31	31	603043	FAN may regulate 1 of the pathways by which TNF-alpha induces apoptosis.
TOX	Thymus high mobility group box protein	59'880'531– 60'194'321	9	9	606863	All HMG box proteins are able to induce a sharp bend in DNA
CA8	Carbonic anhydrase-related protein	61'263'977– 61'356'508	9	8	114815	Carbonic anhydrases form a large family of genes encoding zinc metalloenzymes of great physiologic importance, because they catalyse the reversible hydration of carbon dioxide. CA8 is expressed in the Purkinje cells of the cerebellum.
RAB2A	Ras-related protein Rab-2A	61'592'316– 61'696'850	8	8	179509	RAB2 protein is a resident of pre-Golgi intermediates and is required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex.

Gène et gène prédit	Description (www.ensembl.org)	Position [pb] (www.ensembl.org)	Exons	Exons codants	OMIM	Fonction (www.ensembl.org)
CHD7	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7	61'753'893– 61'942'017	38	37	608892	CHD7 is widely expressed in undifferentiated neuroepithelium and in mesenchyme of neural crest origin. Towards the end of the first trimester it is expressed in dorsal root ganglia, cranial nerves and ganglia, and auditory, pituitary, and nasal tissues as well as in the neural retina.
RLBP1L1	Retinaldehyde binding protein 1-like 1	62'363'104– 62'576'756	6	5	611292	RLBP1L1 is exclusively express in brain and contains a conserved CRAL-TRIO domain, that is present in members of the lipid-binding SEC14-like proteins
ASPH	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	62'578'374– 62'789'681	25	25	600582	ASPH contains a C-terminal catalytic domain, which catalyzes the posttranslational hydroxylation of aspartic acid or asparagine residues within epidermal growth factor-like domains of numerous proteins
FAM77D	Protein FAM77D/NKAIN3 (Na+/K+ transporting ATPase interacting 3)	63'654'652– 63'993'625	6	6	–	
GGH	Gamma-glutamyl hydrolase precursor	64'090'197– 64'113'965	9	9	601509	Gamma-glutamyl hydrolase catalyzes the hydrolysis of folylpoly-gamma-glutamates and antifolylpoly-gamma-glutamates by the removal of gamma-linked polyglutamates and glutamate.
TTPA	Alpha-tocopherol transfer protein	64'134'926– 64'161'152	5	5	600415	Role in vitamin E homeostasis
YTHDF3	YTH domain family protein 3.	64'243'991– 64'262'863	6	6	–	
BHLHB5	Class B basic helix-loop-helix protein 5	65'655'368– 65'658'735	1	1	–	

Gène et gène prédit	Description (www.ensembl.org)	Position [pb] (www.ensembl.org)	Exons	Exons codants	OMIM	Fonction (www.ensembl.org)
CYP7B1	Cytochrome P450 7B1	65'671'246– 65'873'902	6	6	603711	The synthesis of primary bile acids from cholesterol occurs via 2 pathways: the classic neutral pathway involving cholesterol 7-alpha-hydroxylase (CYP7A1), and the acidic pathway involving a distinct microsomal oxysterol 7-alpha-hydroxylase (CYP7B1). CYP7B catalyzes oxysterol 7-alpha-hydroxylation within the human prostate epithelium.
ARMC1	Armadillo repeat-containing protein 1.	66'677'630– 66'708'986	7	6	–	
MTFR1	Mitochondrial fission regulator 1	66'719'528– 66'785'339	8	7	–	
PDE7A	High-affinity cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 7A	66'793'867– 66'863'886	13	13	171885	Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) play a role in signal transduction by regulating the cellular concentrations of cyclic nucleotides. endogenous PDE7A variants A1 and A2 are expressed in human umbilical vein endothelial cells.
DNAJC5B	DnaJ homolog subfamily C member 5B	67'096'349– 67'174'920	6	4	–	
TRIM55	Tripartite motif-containing protein 55	67'201'685– 67'250'270	11	11	–	
CRH	Corticoliberin precursor (Corticotropin-releasing hormone)	67'251'166– 67'253'380	2	1	122560	Response to stress in mammals requires an intact hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The proximal part of the response is mediated by secretion of corticotropin-releasing hormone (CRH) by the paraventricular nucleus of the hypothalamus.
RRS1	Ribosome biogenesis regulatory protein homolog	67'503'817– 67'505'520	1	1	–	

Gène et gène prédit	Description (www.ensembl.org)	Position [pb] (www.ensembl.org)	Exons	Exons codants	OMIM	Fonction (www.ensembl.org)
ADHFE1	Alcohol dehydrogenase, iron containing, 1	67'507'287– 67'543'596	13	11	611083	ADHFE1 is responsible for the oxidation of 4-hydroxybutyrate in mammalian tissues
C8orf46	Uncharacterized protein C8orf46	67'568'321– 67'593'293	6	6	–	
MYBL1	Myb-related protein A	67'639'486– 67'687'729	16	16	159405	MYBL1 mRNA is expressed mainly in testis and peripheral blood leukocytes and acts as a transcriptional activator.
VCPIP1	Deubiquitinating protein VCIP135	67'705'044– 67'742'006	3	3	610686	VCPIP1 is required, but its deubiquitinating activity is unnecessary for p97/p37-mediated activities.
C8orf44 (CH044)	Putative uncharacterized protein C8orf44.	67'752'498– 67'754'743	4	2	–	
SGK3	Serine/threonine-protein kinase Sgk3	67'787'445– 67'936'800	17	16	607591	Expression of SGK3 in human embryonic kidney cells and Xenopus oocytes significantly stimulated voltage-gated K(+) channels. Direct interaction between human SGK3 and glycogen synthase kinase-3-beta (GSK3B). SGK3 phosphorylated GSK3B on ser9.
PPTG3	Pituitary tumor-transforming 3	67'842'186– 67'842'794	1	1	–	
C8orf45	Uncharacterized protein C8orf45	67'945'538– 67'976'212	13	12	–	
TCF24	Transcription factor 24	68'036'084– 68'036'515	1	1	–	
LOC286187 (NP_001013648.1)	Pas de description	68'062'925– 68'103'340	6	5		

Gène et gène prédit	Description (www.ensembl.org)	Position [pb] (www.ensembl.org)	Exons	Exons codants	OMIM	Fonction (www.ensembl.org)
COPS5	COP9 signalosome complex subunit 5	68'117'871– 68'136'785	8	8	604850	COPS5 interacts with the cytoplasmic domain of the beta-2 subunit of the alpha-L/beta-2 integrin LFA1 and is present both in the nucleus and in the cytoplasm of cells and that a fraction of COPS5 colocalizes with LFA1 at the cell membrane.
CSPP1	Centrosome spindle pole associated protein 1 isoform a	68'139'157– 68'271'048	32	32	611654	CSPP1 interacts with centrosomes and microtubules and plays a role in cell-cycle progression and spindle organization
ARFGEF1	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1	68'272'451– 68'418'466	39	39	604141	PKA regulates vesicular traffic via its effects on the phosphorylation status of BIG1 and BIG2.
CPA6	Carboxypeptidase A6 precursor	68'496'914– 68'821'134	11	11	609562	Carboxypeptidases have functions ranging from digestion of food to selective biosynthesis of neuroendocrine peptides. Members of the A/B subfamily of carboxypeptidases, such as CPA6, contain a pro region that assists in the folding of the active carboxypeptidase domain. PCR analysis detected CPA6 expression in brain.

Le séquençage a révélé deux mutations homozygotes chez tous les malades dans les gènes *CPA6*, qui code pour la carboxypeptidase A6 et *C8orf45*, qui est un cadre de lecture ouvert (ou *orf* pour *open reading frame*, en anglais) sans fonction connue. Un *orf* est une région identifiée par séquençage et qui contient des codons d'initiation et de terminaison et dès lors représente probablement un gène. La mutation faux-sens C1025T de l'exon 8 de *CPA6* provoque un changement d'acide aminé Ala270Val (*Figure 42*). La mutation faux-sens A290G de l'exon 3 de *C8orf45* provoque un changement d'acide amine Tyr40Cys (*Figure 43*). Ces deux mutations homozygotes ségrègent avec le trait.

Figure 42 Chromatogrammes de la mutation C1025T de *CPA6*

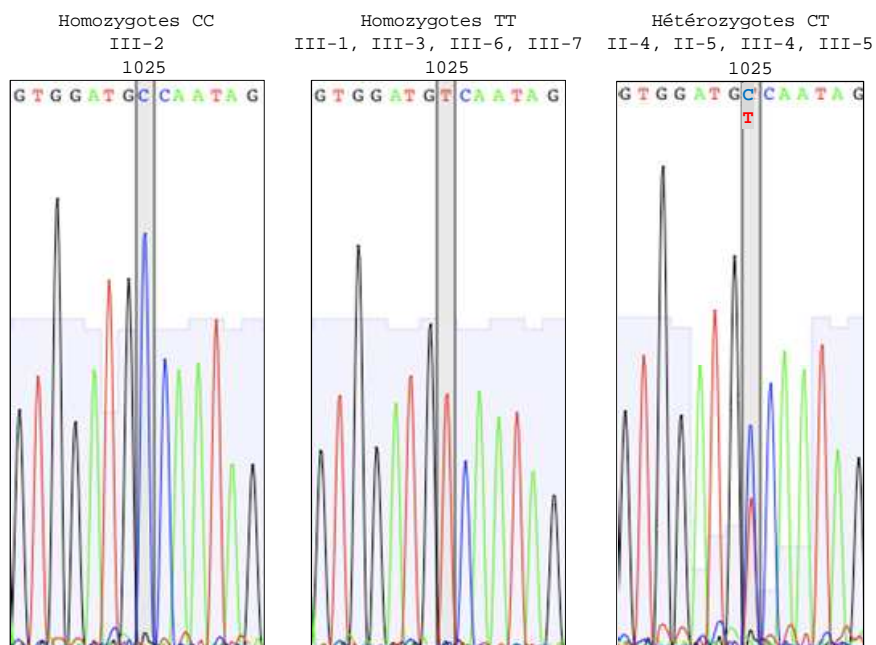
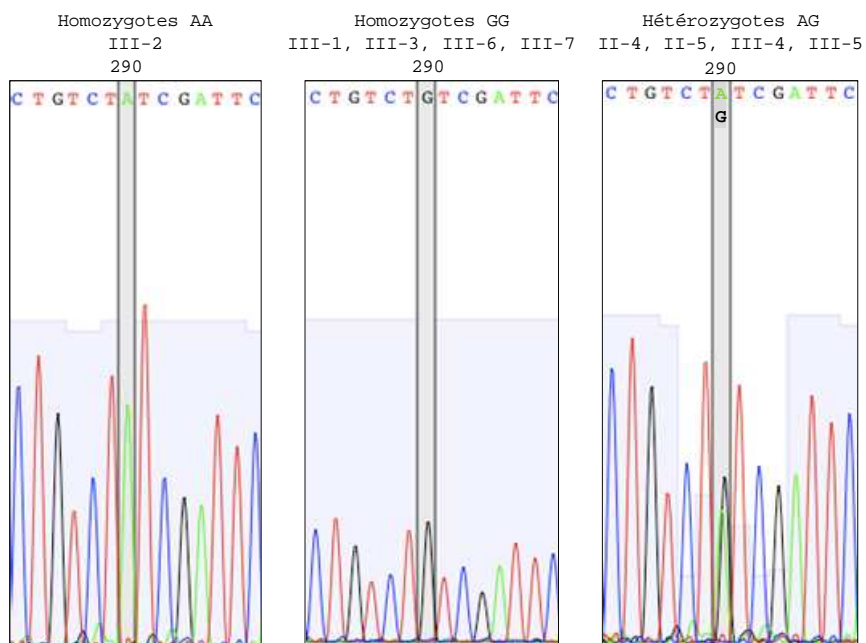


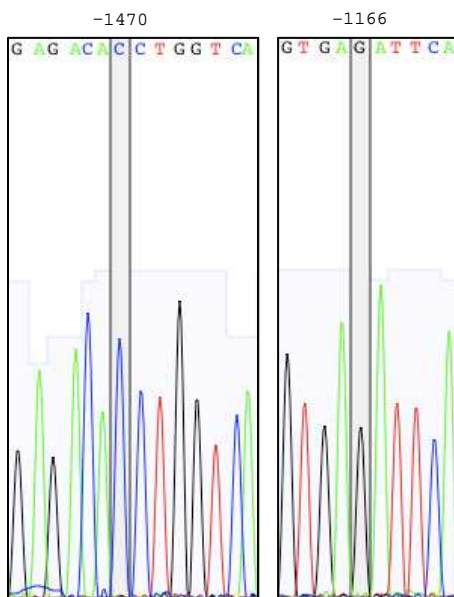
Figure 43 Chromatogrammes de la mutation A290G de *C8orf45*



3.3.5 Mutations dans le promoteur du gène *CRH*

Le séquençage des exons, des jonctions d'épissage ainsi que du promoteur de *CRH* n'a révélé aucune mutation liée au phénotype. Ainsi, les deux variations du promoteur de *CRH*, liées à l'épilepsie nocturne du lobe frontal (Combi et al. 2005), ont été exclues dans la famille marocaine (Figure 44).

Figure 44 Chromatogrammes des positions -1470 et -1166 du promoteur de *CRH*



3.3.6 Génotypage des mutations *CPA6* (C1025T) Ala270Val et *C8orf45* (A290G) Tyr70Cys par pyroséquençage

Pour la mutation C1025T du gène *CPA6*, 167 témoins et 107 patients souffrant de CF d'origine caucasienne ont été génotypés, mais l'allèle T n'a pas été retrouvé dans ces deux cohortes. De plus, 33 contrôles maghrébins ont été génotypés. L'allèle T est présent une fois à l'état hétérozygote chez un seul individu (*Table 23*). Par conséquent, l'allèle T a une fréquence de 1,5% dans cette cohorte et son homozygote de 0%. Dans les deux familles consanguines épileptiques originaires de Sousse, l'allèle T n'a pas été retrouvé.

Table 23 Distribution allélique et génotypique de C1025T du gène *CPA6*

C1025T	Contrôles maghrébins
Allèle	66
C	65 (98.5%)
T	1 (1.5%)
Génotype	33
CC	32 (97.0%)
CT	1 (3.3%)
TT	0 (0%)

Pour la mutation A290G du gène *C8orf45*, 160 témoins et 107 patients souffrant de CF d'origine caucasienne ont été génotypés, mais l'allèle G n'a pas été retrouvé dans ces deux cohortes. De plus, 32 contrôles maghrébins ont été génotypés. L'allèle G est présent une fois à l'état hétérozygote chez le même individu qui porte l'allèle T1025 de *CPA6* à l'état hétérozygote (*Table 24*). L'allèle G a été retrouvé à l'état hétérozygote dans une des deux familles consanguines épileptiques originaires de Sousse. De plus, cet allèle ne semble pas être lié à la maladie (données non-montrées).

Table 24 Distribution allélique et génotypique de A290G du gène *C8orf45*

A290G	Contrôles maghrébins
Allèle	64
A	63 (98.5%)
G	1 (1.5%)
Génotype	32
AA	31 (97.0%)
AG	1 (3.3%)
GG	0 (0%)

En analyse complémentaire, l'individu porteur des 2 mutations à l'état hétérozygote a été génotypé pour les microsatellites, cités au-dessus, de la région candidate. Les résultats ont révélé qu'il est porteur d'une partie de l'haplotype identique par descendance lié au phénotype de la maladie dans la famille marocaine. Cette partie de l'haplotype comprend les deux gènes mutés (*Figure supplémentaire*).

Figure supplémentaire Haplotype au locus 8q12-13 de l'individu porteur (5M) comparé aux individus III-1 malade et III-4 sain

	III-1		III-4		5M	
	p ¹	m	p ¹	m ²		
D8S1828	2	1	2	1	2	3
D8S1816	1	1	1	1	1	1
D8S507	1	1	1	1	1	1
D8S1763	2	2	2	3	2	3
D8S1812	2	2	2	3	2	2
D8S260	3	3	3	2	3	4
D8S1843	1	1	1	1	1	2
D8S1696	2	2	2	1	1	1
D8S544	2	2	2	2	2	1
D8S1841	2	2	2	1	2	3
D8S553 ^a	1	1	1	1	3	4
D8S533 ^a	1	1	1	1	1	0
D8S1785	2	2	2	3	2	4
C8orf45	G	G	G	A	G	A
CPA6	T	T	T	C	T	C
D8S1775	1	1	1	2	3	2
D8S1058	2	2	2	3	?	?
D8S279 ^a	1	1	1	2	4	5

^a Microsatellites de Wallace *et al.*, 1996

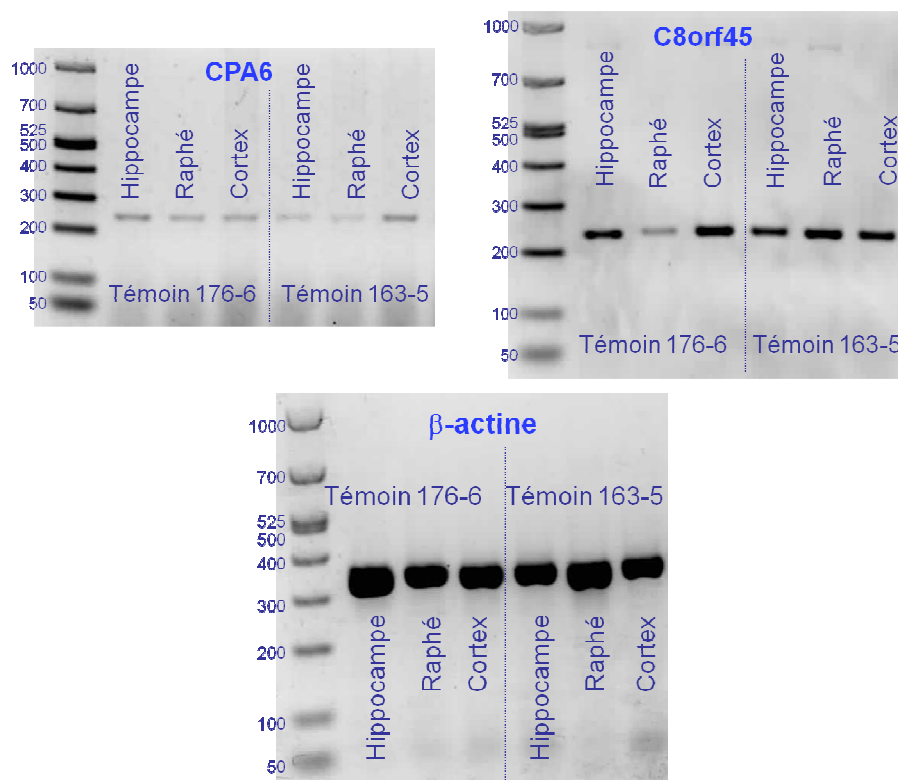
3.3.7 Séquençage de *CPA6* et *C8orf45* dans la famille FEB1

Le séquençage des gènes *CPA6* et *C8orf45* chez certains individus (II-1, II-4, II-6 et II-8) de la famille liée au locus FEB1 (Wallace et al. 1996) n'a révélé aucune mutation dans ces 2 gènes (données non-montrées).

3.3.8 Expression de *CPA6* et *C8orf45* par RT-PCR

L'analyse qualitative par RT-PCR de l'expression des gènes *CPA6* et *C8orf45* a révélé que ces deux gènes sont exprimés dans l'hippocampe, les noyaux du raphé, ainsi que dans le cortex de deux contrôles sains caucasiens. Pour comparaison, la RT-PCR d'un gène de ménage, ici la β -actine, a été effectuée dans les mêmes échantillons (*Figure 45*).

Figure 45 RT-PCR dans l'hippocampe, les noyaux du raphé et le cortex de témoins caucasiens pour les gènes *CPA6*, *C8orf45* et β -actine



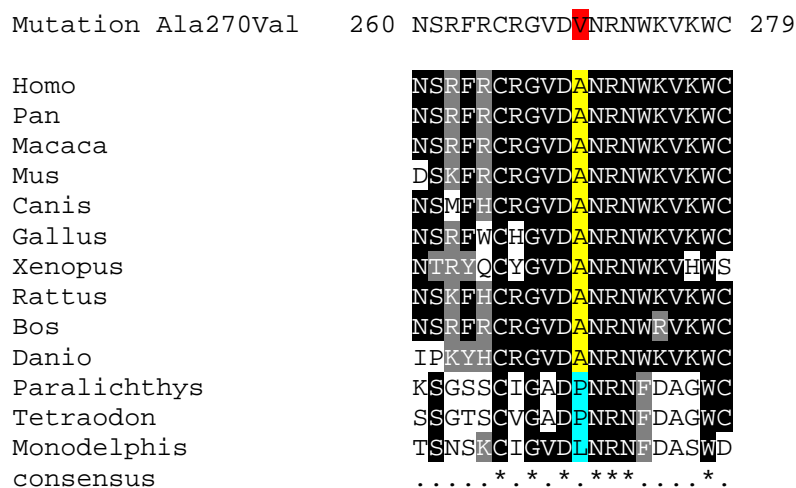
3.3.9 Analyse comparative des séquences protéiques de *CPA6* & *C8orf45*

L'alignement de séquences protéiques de différentes espèces animales autour des mutations de *CPA6* et *C8orf45* ont montré que Tyr40 de *C8orf45* était complètement conservé

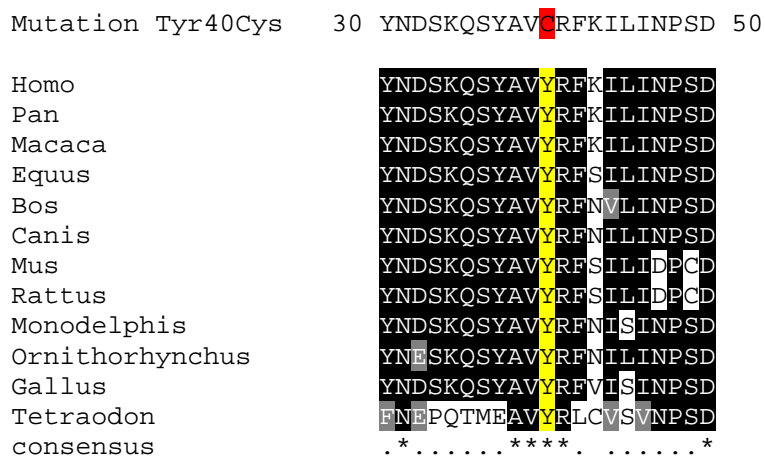
parmi 12 espèces alors qu'Ala270 de CPA6 est moins bien conservée parmi 13 espèces (*Figure 46*).

Figure 46 Alignements des séquences protéiques CPA6 et C8orf45 parmi différentes espèces animales

A : CPA6



B : C8orf45



Un alignement de séquences protéiques des 8 autres carboxypeptidases faisant partie de la sous-famille A/B a montré qu'Ala270 de CPA6 n'est pas complètement conservé dans cette sous-famille (*Figure 47*).

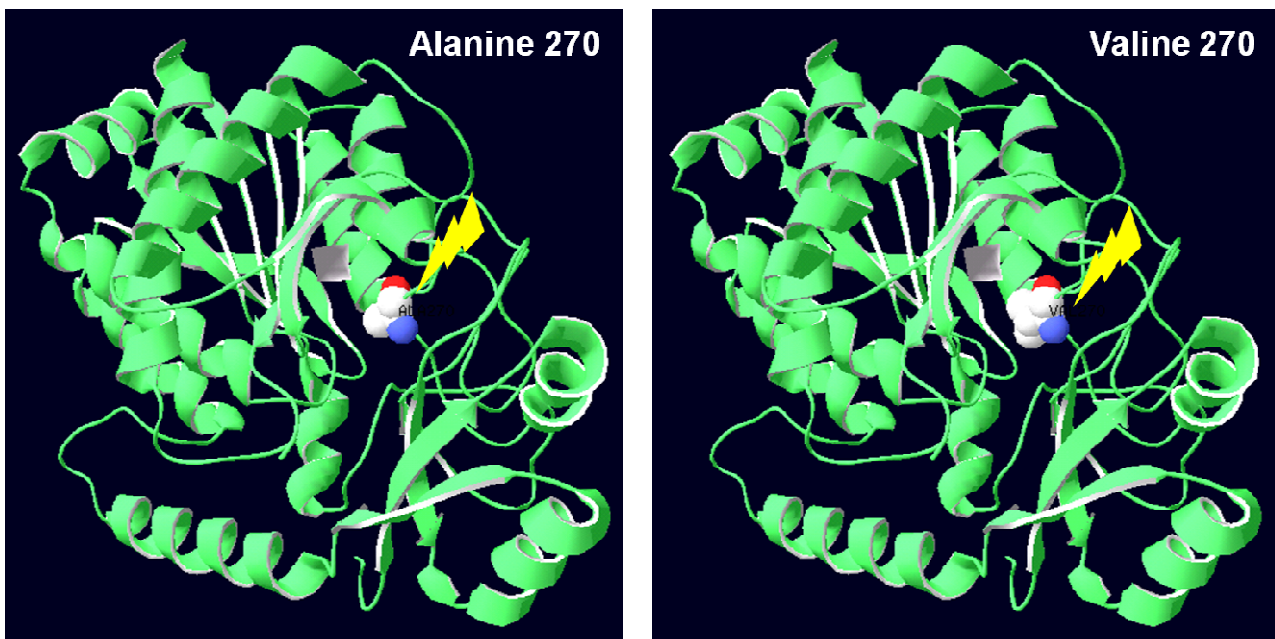
Figure 47 Alignements des séquences protéiques de la sous-famille A/B des carboxypéptidases

Mutation Ala270Val	260	NSRFRCRGVD	V	NRNWK-VKWC	279
CPB2		YANNHCIGTDLNRNFASKHWC			
CPO		HNNGTCTFGTDLNRNFN-ASWC			
CPA3		NQNSKCI GTDLNRNFN-ASWN			
CPB1		HTGSSCIGTDPNRNFD-AGWC			
CPA6		NSRFRCRGVD	A	NRNWK-VKWC	
CPA1		TAGSLCIGVDPNRNWD-AGFG			
CPA5		RPGIFCIGVDLNRNWK-SGFG			
CPA2		VSGSLCVGVDPNRNWD-AGFG			
CPA4		NPGSSCIGADPNRNWN-ASFA			
consensus		.. * . * * **** . . .			

3.3.10 Structure protéique de CPA6 & C8orf45

La modélisation des protéines par le programme Deep View a montré que l'acide aminé Ala270 se trouve dans la cavité de CPA6, une position avant les acides aminés, Asn271 et Arg272, qui lient le substrat (ExpAsy) (*Figure 48*). La mutation provoque l'échange d'une alanine, acide amine neutre avec un groupe méthyle, en valine, un acide aminé neutre avec un groupe isopropyle.

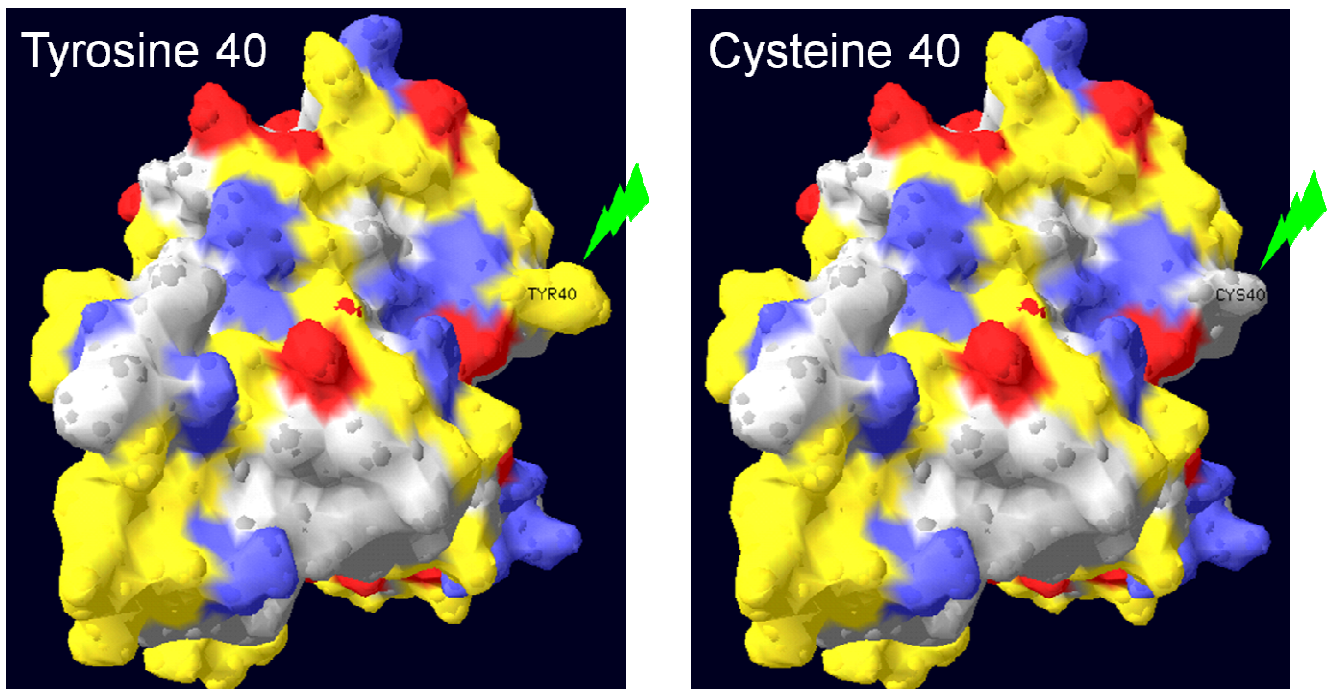
Figure 48 Modélisation protéique de CPA6 et localisation de la mutation Ala270Val



Vert = structure secondaire (hélices α et brins β) ; rouge = oxygène ; bleu = azote ; blanc = carbone

La modélisation de C8orf45 a montré que l'acide aminé Tyr40 se trouve sur la surface protéique de la molécule (*Figure 49*). La mutation provoque l'échange d'une tyrosine, acide amine aromatique (résidu polaire), en cytosine, acide aminé avec un groupe sulfure (résidu apolaire).

Figure 49 Modélisation protéique de C8orf45 et localisation de la mutation Tyr40Cys



Rouge = aa acide ; bleu = aa basique ; jaune = aa polaire ; gris = aa non-polaire

Le site Mode Base prédit que la protéine C8orf45 possède un site, qui comprend les acides aminés aux positions 1 à 267, impliqué présent dans l'initiation de la réplication ADN. Le site Specialized BLAST, quand à lui prédit que la protéine C8orf45 possède un domaine MCM2 (acides aminés 25 à 376) qui est présent dans une famille de protéines avec fonction ATPase et impliquées dans le contrôle de la réplication.

3.4 Discussion

Depuis le début des études de liaison et jusqu'à aujourd'hui, les formes familiales de CF, tout comme le syndrome familial GEFS⁺ ont été considérés comme des maladies avec transmission autosomale dominante. Cette première famille marocaine que nous avons étudiée présente un mode de transmission probable de nature autosomale récessive avec homozygotie pour la mutation responsable.

Une cartographie d'exclusion des loci FEB et GEFS⁺ connus a permis, de les écarter comme candidats à la susceptibilité du syndrome GEFS⁺ dans cette famille marocaine. Dans un deuxième temps nous avons identifié deux régions liées à la maladie sur les chromosomes 21q22 et 8q12.1-q13.2, mais l'analyse haplotypique n'a retenue que le locus 8q12.1-q13.2.

La région candidate présente une borne bien établie du côté centromérique, puisque un événement de recombinaison est présent chez un malade. En ce qui concerne la borne télomérique, sa localisation n'est pas aussi clairement établie, car un événement de recombinaison est présent chez un individu présumé sain (III-5). D'après l'enquête familiale, il est peu probable qu'une crise d'épilepsie soit passée inaperçue chez cet individu, car il est le cinquième enfant de la famille et qu'avant lui, deux de ses sœurs avaient déjà souffert de crises épileptiques. Toutefois, il ne peut être exclu que cet individu ait fait une crise nocturne. Par contre, il peut être exclu une anomalie électrique, car tous les sujets génotypés ont subi des examens EEG, qui n'ont rien révélé d'anormal chez l'individu III-5. L'autre alternative à propos de cet individu III-5 présumé sain, serait une pénétrance incomplète de la maladie, mais ce scénario est peu probable dans le cas d'une transmission autosomale récessive de la maladie.

Le locus candidat sur le chromosome 8q12.1-q13.2 montre un chevauchement avec le locus FEB1 (Wallace et al. 1996) sur ~1.8 Mb. Pourtant, lors de la cartographie primaire d'exclusion, FEB1 avait été exclu, car les microsatellites D8S1058 et D8S279 avaient des lod scores négatifs. De plus, même si le microsatellite D8S553 avait un lod score positif qui ne permettait pas de l'exclure totalement, son génotypage dans la famille marocaine n'était pas assez informatif pour révéler une région identique par descendance. Par conséquent, les investigations ne sont pas allées plus loin pour ce locus FEB1.

Jusqu'à maintenant, tous les gènes liés au syndrome GEFS⁺ sont des gènes codant pour des canaux ioniques : *SCN1B* (Wallace et al. 1998), *SCN1A* (Escayg et al. 2000), *GABRG2* (Baulac et al. 2001a) et *GABRD* (Audenaert et al. 2006 ; Dibbens et al. 2004). Mais, le locus candidat de 9.6 Mb sur le chromosome 8q12.1-q13.2 qui compte 38 gènes connus et prédits, ne contient aucun gène codant pour un canal ionique. Le séquençage de ces 38 gènes a révélé deux mutations faux-sens, Ala270Val et Tyr40Cys, homozygotes chez tous les affectés dans les gènes *CPA6* et *C8orf45*, respectivement. Ces deux mutations ont été génotypées dans des cohortes caucasiennes de témoins et de patients souffrants de CF. Aucune d'entre elles n'a été retrouvée, même sous forme hétérozygote. Par contre, lors du génotypage dans une petite cohorte de témoins maghrébins incluse à l'hôpital de Tunis pour infarctus du myocarde, il a été retrouvé, chez un même individu, les deux mutations sous forme hétérozygote. Ces dernières sembleraient donc être en DL. De plus, après génotypage des microsatellites de la région candidate chez cet individu, il

s'est avéré qu'il était porteur d'une partie de l'haplotype identique par descendance et homozygotes chez tous les affectés de la famille marocaine, comprenant les deux mutations hétérozygotes. Malheureusement, de plus amples informations sur ce sujet ne sont pas disponibles.

Dans la petite cohorte de contrôles maghrébins, la fréquence des hétérozygotes pour les deux mutations est de 3,3% et la fréquence des allèles T1025 de *CPA6* et G290 *C8orf45* est de 0,015 pour chaque allèle. Par conséquent, la probabilité d'être homozygote pour l'une des deux mutations est de $(0.015)^2 = 2.25 * 10^{-4}$, si les deux mutations sont en DL. Ce résultat représente 1 personne sur 4'444 individus. Par contre, si les deux mutations homozygotes ne sont pas en DL et qu'elles sont, toutes les deux sous forme homozygote, nécessaires au développement de la maladie, alors, la probabilité d'être homozygote TT1025 et GG290 est de $(0.015)^2 * (0.015)^2 = 5.0625 * 10^{-8}$. Ces deux résultats sont beaucoup plus bas que la prévalence de 2–5% des CF en population générale (Hauser 1994). Par conséquent, ces deux mutations homozygotes ne sont probablement pas associées aux cas de CF sporadiques et devraient être considérées comme des variants rares en population générale. Cet argument est en faveur de leur implication réelle en tant que mutations responsables, dans la famille maghrébine, du syndrome GEFS⁺ rare en population générale. Par conséquent, ce cas de figure suivrait le modèle *variants rares liés à une maladie rare*. Le cas de la mucoviscidose est un bon exemple de maladie génétique autosomale récessive rare avec un enfant atteint sur 2500 (Corey and Farewell 1996) et une fréquence des hétérozygotes (porteurs sains de mutations se situant dans le gène CFTR ou cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, qui code pour un canal ionique perméable au Cl⁻) de 3% (Steinberg and Brown 1960) dans la population caucasienne.

En parallèle au génotypage de différentes cohortes par pyroséquençage, certains individus de la famille australienne liée au locus FEB1 ont été séquencés pour les gènes *CPA6* et *C8orf45* avec des amorces flanquant les exons ainsi que les jonctions d'épissage. Aucune mutation n'a été mise en évidence. Il est probable que le gène causal de cette famille se trouve ailleurs sur le locus FEB1. Dans cette publication, les auteurs mettent en évidence le fait que le modèle le plus probable pour la transmission de la maladie dans la famille, ainsi que le locus qui lui est lié, est celui qui présente le plus haut lod score (= 3.40). Ce modèle suit une transmission autosomale dominante avec taux de pénétrance incomplète à 60% et un taux de phénotypie à 3%. Mais, en pourcentage de probabilité, les chromosomes 2, 12 et 14 montraient aussi un résultat élevé pour être de bons candidats aux CF. Puis, grâce au génotypage de marqueurs supplémentaires, ils ont été écartés, car ils étaient moins significatifs que FEB1 (Wallace et al. 1996). Par conséquent, il

n'est pas si surprenant de ne pas trouver de mutations dans les gènes *CPA6* et *C8orf45* pour cette famille, car le locus FEB1 pourrait avoir une autre localisation génomique.

Comme évoqué dans l'introduction, certains patients avec syndrome SMEI, phénotype le plus extrême des GEFS⁺, peuvent présenter des microdélétions du gène *SCN1A*. Ainsi, lors du génotypage de certains microsatellites de cette région, ils semblent être homozygotes, alors qu'en réalité, ils sont hémizygotés (Suls et al. 2006), (Madia et al. 2006). Par conséquent, afin d'exclure un tel événement dans la famille marocaine, une analyse de variations du nombre de copies d'ADN a été effectuée. Cette dernière n'a révélé aucune anomalie de CNV.

Afin de vérifier si les gènes *CPA6* et *C8orf45* sont exprimés dans le cerveau, des RT-PCR ont été effectuées sur des extraits d'ARN de territoires potentiellement impliqués dans l'épilepsie : hippocampe, noyaux du raphé et cortex. En comparant ces résultats à la RT-PCR de la β -actine sur les mêmes échantillons, il s'est avéré que les gènes *CPA6* et *C8orf45* étaient tous deux exprimés dans les trois territoires testés. Par conséquent, ce test a confirmé leur potentielle implication dans le syndrome GEFS⁺.

Les analyses comparatives d'alignements séquences protéiques pour CPA6 et C8orf45 ont montré que les deux acides aminés mutés étaient complètement conservés pour Tyr40 de C8orf45 alors qu'Ala270 de CPA6 est moins bien conservée. Mais dans les deux cas, Cys40 et Val270 n'étaient jamais présents. De plus, Val270 n'est jamais retrouvé dans la sous-famille des carboxypeptidases A/B. Ainsi, ces deux mutations pourraient être liées au phénotype de la maladie.

La modélisation de la protéine C8orf45 a révélé que Tyr40 se trouve à la surface de la molécule. Par conséquent, la mutation Cys40, qui provoque l'échange d'un acide aminé aromatique en un acide aminé contenant un groupe sulfure, serait capable de créer des ponts disulfures intra et/ou inter-protéiques. Afin de le vérifier, il faudrait le tester dans un système *in vitro* adapté. D'autre part, certaines bases de données prédisent à la protéine C8orf45 une fonction dans la réplication de l'ADN (*Mode Base* (<http://modbase.compbio.ucsf.edu>) et *Specialized BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)). Là encore, il faudrait le vérifier dans un système *in vitro* adapté.

Le gène *CPA6* code pour la carboxypeptidase A6, qui est un membre de la famille des metalocarboxypeptidases M14, avec un pro-domaine clivé au niveau de l'acide aminé Ser130 (Wei et al. 2002). Il a été rapporté que l'ARNm du gène homologue à *CPA6* chez la souris est principalement exprimé dans le bulbe olfactif adulte, mais aussi dans beaucoup de tissus nerveux embryonnaires. C'est ainsi que les auteurs ont proposé que *CPA6* devrait fonctionner dans l'activation ou la terminaison d'un facteur de guidance neuronale (Fontenele-Neto et al. 2005). Un

article récent a mené une investigation sur le rôle biologique de CPA6 (Lyons et al. 2008). Cette équipe a montré que cette protéine est sécrétée sous sa forme active sans pro-domaine. Cette forme extracellulaire active est capable de cliver le C-terminal d'un certain nombre de peptides biologiquement actifs. De plus, Lyons et coll. ont montré que CPA6 inactive la neurotensin en clivant le C-terminal de cette protéine (Lyons et al. 2008). Cette dernière joue un rôle dans la régulation thermique (Geisler et al. 2006). Cette équipe a aussi montré que CPA6, en clivant l'angiotensin I, l'active en angiotensin II (Lyons et al. 2008), qui peut jouer un rôle dans le développement du cerveau et la migration neuronale (Saavedra 2005).

Certaines bases de données, ainsi que la modélisation de la protéine CPA6, ont montré qu'Ala270 se trouve dans la cavité qui lie le substrat. De plus, Ala270 se situe à la position juste avant les acides aminés, Asn271 et Arg272, qui lient le substrat. Afin de déterminer si la mutation Val270 dans la protéine CPA6 a une influence sur la liaison au substrat, il faudrait utiliser le même système qu'ont utilisé Lyons et son équipe lors de son analyse de clivage de neurotensin et angiotensin I, à savoir la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Lyons et al. 2008). Pour ce faire, il faudrait incuber une série de peptides, de la matrice extracellulaire provenant de cellules exprimant CPA6 normale et CPA6 mutante contenant Val270 et voir où se trouve le plus haut taux de peptides clivés.

Finalement, toutes ces expériences complémentaires ont été effectuées afin de déterminer si les mutations Val270 (CPA6) et Cys40 (C8orf45), sous forme homozygotes, étaient toutes les deux obligatoires pour l'apparition du syndrome GEFS⁺ dans la famille marocaine ou alors que l'une des deux était la véritable mutation et que l'autre se trouvait en DL par rapport à la première. Mais les analyses ci-dessus n'ont pas réussi à réellement déterminer quelle hypothèse était la plus probable. De plus, comme évoqué dans l'introduction, Tan et son équipe estiment qu'il est difficile d'identifier le véritable variant causant la maladie parmi les SNP composant un bloc de DL (Tan et al. 2004). Toutefois, même si un individu contrôlé maghrébin présente les deux mutations et le même haplotype identique par descendance sous forme hétérozygote, nous nous sommes demandés si ces deux mutations sont réellement en DL, puisque le génotype AG à la position 290 de *C8orf45* est présent chez certains individus de l'une des deux familles tunisiennes, mais pas l'allèle T de *CPA6*.

Néanmoins, un fait permettrait de confirmer l'implication du gène *CPA6* dans le syndrome GEFS⁺, car ce gène est lié au syndrome de Duane (Pizzuti et al. 2002), qui est une maladie congénitale des mouvements oculaires avec une transmission autosomale dominante. Cette dernière est causée par l'absence d'innervation par le nerf crânien VI du muscle latéral rectus et l'innervation aberrante de ce muscle par le nerf crânien III (Gutowski 2000). Certains patients,

présentent des insertions/délétions ou des translocations de la région génique de *CPA6*. De plus Chung et coll. ont rapporté l'existence de crises épileptiques chez certains patients dans une famille avec syndrome de Duane (Chung et al. 2000). Un autre fait soutient l'implication de *CPA6* dans le syndrome GEFS⁺. L'équipe d'Hala a rapporté un cas d'association entre épilepsie et une carboxypeptidase décrit chez un garçon de 14 ans avec retard mental et un anneau du chromosome 20. Le gène codant pour la carboxypeptidase-L est localisé sur le chromosome 20. Une culture de fibroblastes de ce patient a montré une baisse d'activité de cette protéine (Halal et al. 1992).

En conclusion, nous n'arrivons pas réellement à discriminer entre les deux mutations. C'est pourquoi, il faudrait recruter des cohortes de témoins marocains, ainsi que des patients marocains avec CF. De plus, il faudrait découvrir d'autres familles GEFS⁺ de la même région que la famille marocaine étudiée ici et ainsi peut-être mettre en évidence des mutations dans les gènes *CPA6* et/ou *C8orf45*, afin de complètement valider l'un ou l'autre ou les deux.

4 Nouvelle méthode de recherche de mutation-expansion pour le diagnostic médical de la maladie d'Unverricht-Lundborg

4.1 Introduction

La maladie d'Unverricht-Lundborg (ULD, en anglais, *Unverricht-Lundborg disease*) est l'épilepsie myoclonique progressive la plus commune (Berkovic et al. 1986). De transmission autosomale récessive, cette maladie est retrouvée principalement en Finlande, avec une prévalence de 1/20'000 (Norio and Koskiniemi 1979), et dans les pays d'Afrique du Nord, mais est moins commune en Europe de l'Ouest (Moulard et al. 2002). Les symptômes cliniques, ainsi que l'historique de la génétique de cette maladie ayant déjà été évoqués dans l'introduction, ils ne seront pas répétés ici. Néanmoins, il faut rappeler qu'en 1997, l'équipe de Lalioti a mis en évidence diverses mutations dans le gène *CSTB*, qui code pour la cystatine B, inhibiteur de protéase cystéine chez des patients atteints d'ULD (Lalioti et al. 1997a). La majorité de ces patients présentent une large répétition d'un dodecamer (CCCCGCCCGCG) dans la région 5' UTR non-transcrite du gène. Les allèles normaux contiennent 2 à 3 copies, les allèles pré-mutés présentent 12 à 17 copies et finalement, les allèles mutés possèdent entre 30 et 75 copies (Lalioti et al. 1997b). Cette expansion altère la distance entre les différents éléments du promoteur, ce qui amène à l'interruption des fonctions du promoteur et par conséquent détériore la transcription du gène. Cette déficience en *CSTB* pourrait provoquer l'échec de l'inactivation de certaines protéases intracellulaires et mener à une dégénérescence neuronale (Pennacchio et al. 1996).

4.2 Southern blot et PCR radioactive

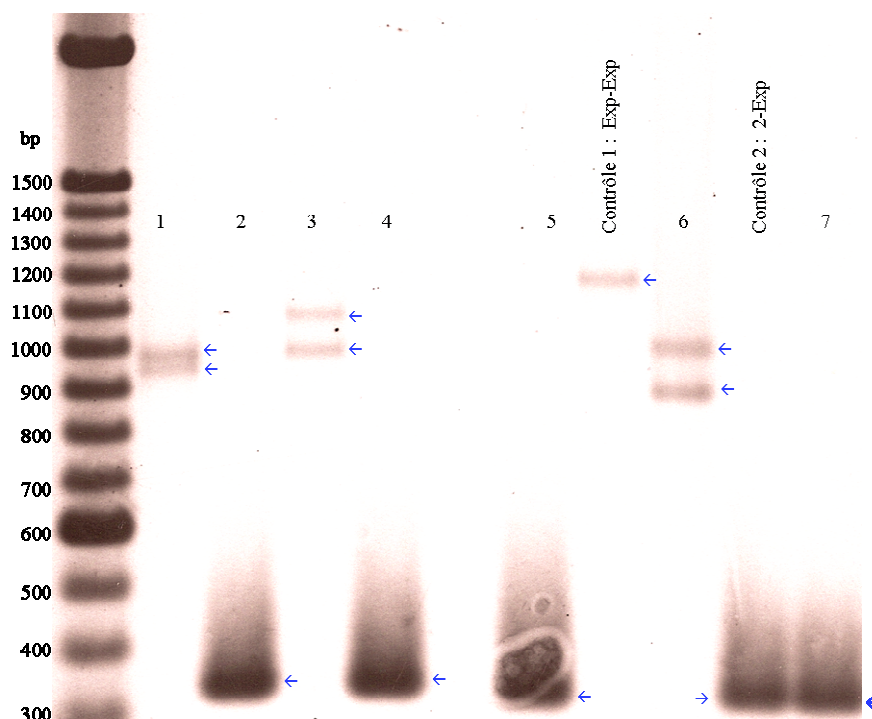
La taille des allèles mutés, ainsi que la fréquence élevée des nucléotides GC dans la répétition dodecamérique rend l'amplification directe avec la PCR conventionnelle extrêmement difficile. C'est pourquoi, la première technique utilisée pour visualiser l'expansion du dodecamer a été le *Southern blot* (Lalioti et al. 1997b) qui nécessitait entre 3 et 10 µg d'ADN. Mais la résolution de cette technique était limitée, car elle ne permettait pas d'évaluer avec précision la taille de la répétition allélique. C'est pourquoi, il a été mis au point une technique différente qui

permettait de mettre en évidence la taille des allèles par amplification directe par PCR et qui utilisait des amorces flanquant directement la répétition. Cette méthode, utilisant la radioactivité, était pratiquée au laboratoire afin de faire une recherche de mutation-expansion pour le diagnostic médical des patients ULD. Malheureusement, cette procédure était longue et peu sûre de par l'utilisation du γ -[³³P]dATP.

La première étape de cette méthode consiste au marquage de l'une des deux amorces ainsi que du marqueur de taille 100 pb (Invitrogen) au γ -[³³P]dATP, à l'aide de l'enzyme Kinase (Biolabs). Cette réaction se fait à 37°C pendant 1 heure. La PCR, utilisant l'amorce marquée radioactivement par le γ -[³³P]dATP, est la seconde étape de la procédure et elle nécessite seulement 100 ng d'ADN, qui est une quantité bien inférieure à celle du Southern blot. Afin de s'assurer une bonne amplification de cette région riche en GC, des produits spécifiques sont utilisés pour cette PCR : du diméthyle sulfoxide (DMSO) ainsi que du 7deaza-2'-dGTP qui est substitué à tous les dGTP. De plus, le programme PCR est différent d'une PCR classique, car il consiste en un programme « *touchdown* », où les températures d'hybridation varient de 64°C à 60°C durant les cinq premiers cycles et sont suivis de 25 autres cycles avec une température fixe d'hybridation à 59°C. Puis, les produits PCR sont chargés sur un gel agarose et la migration dure toute la nuit à 40 [V]. Après cette étape, le gel est séché à 80°C jusqu'à atteindre une épaisseur de 1 mm. Ensuite, ce dernier est mis à exposer avec un film kodak pour autoradiographie. (*Figure 50*).

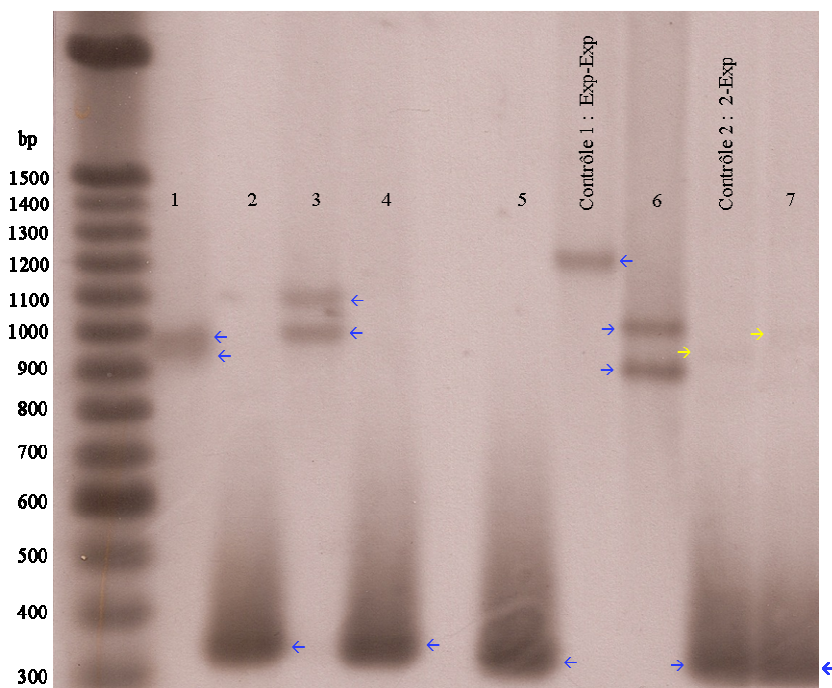
Figure 50 Visualisation des mutation-expansion par PCR radioactive et autoradiographie sur film

A : Temps d'autoradiographie : 5 jours



La bande de l'allèle le plus long du contrôle 2 (2-expansion) n'apparaît pas encore

B : Temps d'autoradiographie : 24 jours



La bande de l'allèle le plus long du contrôle 2 (2-expansion) est apparue (flèche jaune)

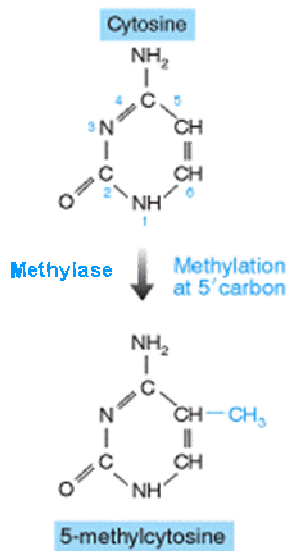
Ce résultat montre une mauvaise révélation des allèles mutants chez les porteurs hétérozygotes (*Figure 50*, contrôle 2 et individu 7) pour l'expansion du dodecamer, car le petit fragment de 2 ou 3 répétitions est toujours suramplifié par rapport au grand fragment contenant un grand nombre de répétitions. Par conséquent, l'allèle muté n'apparaît qu'après un très long temps d'autoradiographie (24 jours). De plus, le nombre des répétitions du dodecamer en fonction de la taille du produit PCR, ne se détermine pas facilement à l'œil nu. Par exemple, il est difficile de voir que l'échantillon 1 possède deux allèles mutés de longueur proche. D'ailleurs, dans la *Figure 50B*, ces deux allèles ne sont presque plus distincts l'un de l'autre et ne forment plus qu'une grosse bande. Par conséquent, l'évaluation des allèles devient difficile.

4.3 Déamination de l'ADN et PCR directe

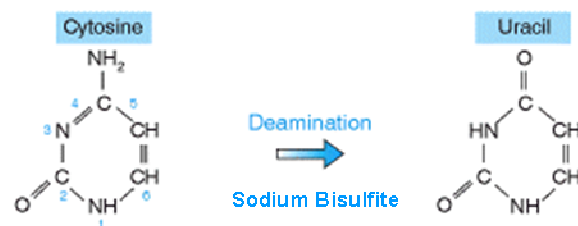
De part l'utilisation de la radioactivité, la difficulté à mettre en évidence ainsi que la durée relativement longue nécessaire à révéler l'expansion du dodecamer chez les porteurs hétérozygotes, il est apparu judicieux de mettre au point une nouvelle technique, plus sûre, plus résolutive et plus rapide en s'inspirant d'une méthode de déamination d'échantillons ADN, puis d'une PCR directe sur ces échantillons qui permet de visualiser l'expansion du dodecamer dans le promoteur de *CSTB* (Weinhausel et al. 2003). Le procédé de déamination est basé sur le statut de méthylation du promoteur. Les gènes inactifs pour la transcription contiennent des résidus 5-méthylcytosine, en général dans des séquences appelées îlots CpG : p5-méthyl-CpG, tandis que les gènes actifs en sont dépourvus. Ces groupements méthyles sont ajoutés aux cytosines après la réplication de l'ADN (*Figure 51A*). La déamination des cytosines consiste à incuber l'ADN avec du sodium bisulfite. Alors, les résidus cytosine non-méthylées seront convertis en uracile, alors que les cytosines méthylées resteront inchangées (*Figure 51B*).

Figure 51 Mécanismes de méthylation et déamination de l'ADN (adaptation de (Strachan and Read 2003))

A : Méthylation des cystéines



B : Déamination des cystéines non-méthylées



Le groupe de Weinhaeusel a d'abord utilisé ce système de déamination de l'ADN et de PCR directe afin d'évaluer le statut de méthylation du promoteur et de la région répétée du dodecamer dans le gène *CSTB* chez des contrôles sains, ainsi que chez des patients avec ULD. Ils se sont aperçus que cette méthode permettait aussi de déterminer simplement la taille des répétitions du dodecamer par PCR directe sur l'ADN modifié par déamination (Weinhaeusel et al. 2003). Ceci est possible, car un haut contenu en GC empêche une bonne amplification PCR. Mais ici, les cytosines non-méthylées ont été converties en uracile, donc le contenu en GC est plus bas. Par conséquent, l'amplification PCR se fait plus facilement.

4.4 Matériel et méthode

Comme évoqué plus haut, nous avons apporté quelques modifications au protocole décrit par le groupe de Weinhaeusel, en utilisant le kit *EpiTect Bisulfite* (Qiagen, Germantown, MD, USA) qui a été élaboré pour la conversion des cytosines non-méthylées en uracile grâce au bisulfite. Ainsi, le rendement est meilleur. De plus, dans ce kit, il n'y a pas d'utilisation d'huile minérale pour éviter l'évaporation de l'échantillon lors de la réaction au sodium bisulfite, où la température atteint jusqu'à 95°C, car la combinaison de ces différents éléments amène à la

dégradation de l'ADN. Par conséquent, la PCR, qui suit cette étape, ne fonctionne pas, car les amorces ne peuvent pas s'hybrider à la matrice ADN dégradé.

4.4.1 Amorces PCR

Les séquences des amorces PCR sont celles élaborées par Weinhaeusel selon la méthode suivante (Weinhaeusel et al. 2003) : le promoteur du gène *CSTB* contient des cystéines potentiellement méthylées et d'autres non-méthylées. Par conséquent, l'élaboration de ces amorces est basée sur la supposition que, dans une séquence cible complètement méthylée, toutes les cystéines des îlots CpG sont méthylées et donc résistantes à la déamination, alors que dans une séquence complètement non-méthylée, toutes les cystéines (incluant celles des îlots CpG) sont déaminées et converties en uracil et par la suite en thymidine. Sachant que la région du dodecamer est certainement un mélange entre cystéines non-méthylées et méthylées, les amorces seront, elles aussi, un mélange entre cystéine et thymidine pour le côté *forward*, alors que pour le côté *reverse*, ce sera un mélange d'adénine et de guanine :

CYSRD F : 5' – (CT)GG(CT)GAGTGGTGGTTAGGT – 3'

CYSRD R : 5' – AAAACACTTTAACTTC(AG)AAATCCCCTA – 3'

4.4.2 Déamination de l'ADN – Kit *EpiTect Bisulfite* (Qiagen)

Cette réaction nécessite 500 ng d'ADN. Tous les produits utilisés ici sont issus du kit *EpiTect Bisulfite*. De plus, la procédure suivie correspond à celle du protocole fourni avec le kit.

Conversion de l'ADN au Bisulfite

Les échantillons sont équilibrés à température ambiante, puis sont traités grâce au Mix Bisulfite, qui contient du sodium bisulfite et un pH optimum pour la conversion complète des cytosines en uraciles. De plus, du *DNA Protect Buffer* est ajouté, afin de prévenir la fragmentation de l'ADN, qui est souvent associée au traitement au bisulfite à haute température et bas pH. Voici les composés, ainsi que leur quantité, à ajouter dans l'ordre de la *Table 25* :

Table 25 Composés de la réaction au bisulfite

ADN (500 ng → conc. 100 ng/μl)	5 μl	20 μl
RNase-free water	15 μl	
Bisulfite Mix	85 μl	
DNA Protect Buffer	35 μl	
Vol _{tot}	140 μl	

Une fois le mélange effectué, la conversion de l'ADN au bisulfite se fait grâce à une machine Hybaid selon le programme suivant (*Table 26*) :

Table 26 Conditions thermales pour la conversion au Bisulfite

Étape	Temps	Température
Dénaturation	5 min	99°C
Incubation	25 min	60°C
Dénaturation	5 min	99°C
Incubation	85 min	60°C
Dénaturation	5 min	99°C
Incubation	175 min	60°C
Hold	Indéfini	20°C

Lavage de l'ADN contenant du Bisulfite

L'ADN déaminé est mélangé à 560 μl d'un mix de *Carrier RNA* et *Buffer BL*. Cette solution est transférée sur une colonne *Epitect Spin* et centrifugée. Puis, la membrane est lavée une première fois avec 500 μl de *Buffer BW*. Ensuite, il y a incubation de 15 min avec 500 μl de *Buffer BD* et un deuxième lavage avec 500 μl de *Buffer BW*. Finalement, l'ADN déaminé et lavé est élué dans 20 μl de *Buffer EB*. Il peut être stocké entre 2–8°C jusqu'à 24 h, mais doit être mis à –20°C au-delà de 24 h (12 semaines au max.).

4.4.3 Amplification par PCR

Un μl d'ADN déaminé est utilisé lors de l'amplification PCR dans un volume total de 25 μl, selon le mix suivant (*Table 27*) :

Table 27 Mix PCR pour 1 échantillon

Produits	Mix Vol _{tot} = 24 µl
Tampon (Qiagen) (10x)	2.5 µl
dNTP (2 mM chacun)	2.5 µl
Albumine (1 µg/µl)	1.25 µl
DMSO (50 ng/µl)	0.625 µl
CYSRD F (20 pmoles/µl)	0.5 µl
CYSRD R (20 pmoles/µl)	0.5 µl
Taq Hot Start [®] (Qiagen) (5 U/µl)	0.2 µl
H ₂ O (24–8.075)	15.925 µl

L'amplification s'effectue grâce à une machine Hybaid avec la Taq polymérase *Hot start* selon le programme ci-dessous (*Table 28*) :

Table 28 Programme PCR

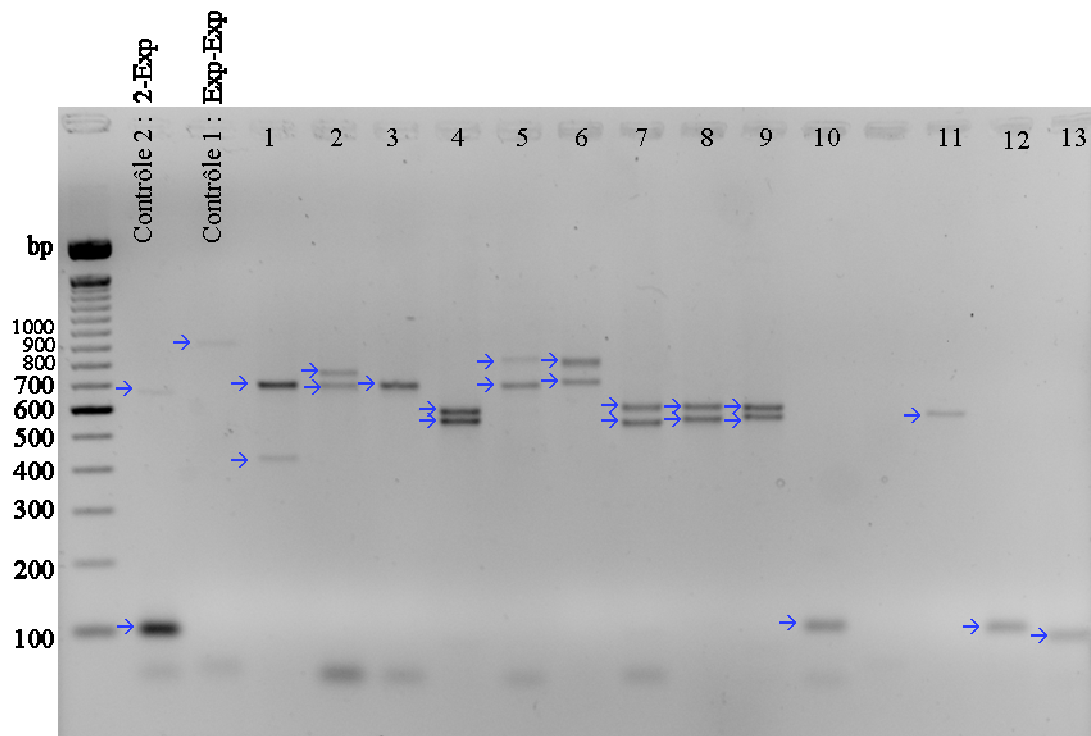
Température	Temps	Stage
95°C	15 min	Stage 1 : 1x
95°C	45 sec	Stage 2 : 40x
61°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	Stage 3 : 1x
20°C	Hold	

Les 25 µl de PCR sont chargés sur un gel agarose 2% et visualisés grâce à l'éthidium bromide (BET). Le temps de migration est de 2 h à 120 [V].

4.5 Résultats

La visualisation des bandes d'intérêt grâce au BET montre un bon résultat aussi bien pour les porteurs hétérozygotes (contrôle 2, qui est le même individu que dans la *Figure 50*) de l'expansion que la discrimination entre deux allèles de longueur proche (par exemple, l'individu 4). Ainsi, ces résultats démontrent que cette nouvelle méthode est plus sûre, plus résolutive et plus rapide (*Figure 52*).

Figure 52 Visualisation des résultats sur gel agarose 2%



Il est à noter que chez certains hétérozygotes porteurs de deux allèles mutés, les bandes n'ont pas la même intensité (*Figure 52*, individus 1 et 5). Ce résultat peut s'expliquer par l'instabilité mitotique des longs allèles (Weinhausel et al. 2003). Par conséquent, lors d'événements mitotiques, certains allèles seraient plus multipliés que d'autres.

4.6 Discussion

Grâce à l'élaboration de cette nouvelle méthode de diagnostic médical pour les expansions du dodecamer dans le promoteur du gène *CSTB*, dorénavant, il sera plus facile et plus rapide de donner un résultat aux cliniciens. La confirmation du diagnostic de maladie d'Unverricht-Lundborg impose la recherche de l'expansion et, en l'absence d'homozygotie de mutation du gène *CSTB*, même si la littérature rapporte que la mutation la plus fréquente pour les patients ULD est l'expansion du dodecamer (Lalioi et al. 1997a; Lalioi et al. 1997b). Ainsi, grâce à cette méthode plus rapide et moins coûteuse, il sera plus facile d'analyser des patients souffrant d'une forme non typique ULD. A l'image des GEFS⁺, il serait en effet possible qu'existe un continuum de formes peu graves à des formes beaucoup plus sévères et invalidantes qui conduiraient au décès du patient.

Conclusion et perspectives

Lors de ces deux dernières décennies, les avancées en génétique humaine des épilepsies ont été considérables. Les connaissances dans le domaine des bases génétiques des épilepsies ont augmenté de façon exponentielle. Les nouveaux phénotypes décrits ainsi que les nouveaux gènes associés à différents types d'épilepsies ont permis de mieux comprendre les effets fonctionnels qui causent la maladie. Cet accroissement rapide de ces acquis concerne essentiellement les épilepsies à transmission mendélienne. En revanche, dans le domaine des épilepsies à hérédité complexe, les progrès ne sont pas aussi spectaculaires.

Les épilepsies monogéniques rares ou à hérédité mendélienne, sont principalement liées à un variant rare (ou mutation) à effet majeur sur le phénotype de la maladie. De telles épilepsies ont généralement un caractère familial, par conséquent, la plupart des gènes identifiés ont été découverts grâce au recrutement de familles. Mais il existe tout de même deux difficultés majeures dans ce domaine. La première est *l'hétérogénéité clinique*, où tous les patients porteurs d'une même mutation ne présentent pas le même tableau clinique au sein d'une même famille, comme c'est le cas pour les familles GEFS⁺. La deuxième difficulté est *l'hétérogénéité génétique*. Une épilepsie relativement homogène du point de vue clinique peut être due à des mutations différentes d'un même gène, comme c'est le cas pour la maladie d'Unverricht-Lundborg et l'épilepsie sévère du nourrisson. On parle alors d'hétérogénéité allélique. Lorsque des mutations sont présentes dans des gènes différents, on parle d'hétérogénéité non allélique. D'après des données récentes, cette complexité génétique pourrait en fait correspondre à une plus grande simplicité fonctionnelle. En effet, par exemple, dans la plus part des cas d'hétérogénéité non allélique d'épilepsies idiopathiques à hérédité mendélienne, les mutations identifiées concernent des gènes codant pour des canaux ioniques. Ainsi, cela confirmerait l'appartenance de ces épilepsies au vaste groupe des canalopathies. A l'heure actuelle, la plupart des familles à large effectif ont déjà été identifiées, par conséquent, les familles de malades recrutées sont de petite taille, ce qui rend la localisation du gène responsable de la maladie plus difficile. Quelques soient les difficultés rencontrées dans la caractérisation moléculaire des bases génétiques des épilepsies à hérédité mendélienne, il reste que les efforts menés ces dernières années ont eu le grand avantage de permettre la reconnaissance de nouvelles formes cliniques. Ceci aura pour conséquence d'entraîner de profondes modifications dans la classification internationale à venir.

Les épilepsies communes à hérédité complexe possèdent une composante génétique mais aussi une composante environnementale. Ainsi, leur effet additif joue un rôle dans la détermination du phénotype de la maladie. En ce qui concerne les avancées dans ce domaine, elles ne sont pas substantielles. Il est vraisemblable que cette situation est due à la « conception génétique mendélienne » de ce type d'épilepsies qui a prédominé jusqu'à présent. Cette hypothèse

suggère que les épilepsies à hérédité complexe sont constituées de nombreux sous-types génétiques correspondant chacun à un mode de transmission mendélien particulier. Par conséquent, la complexité serait simplement due à cette hétérogénéité. Mais pour l'instant, aucune donnée disponible sur ces épilepsies communes ne soutient cette hypothèse. Une seconde hypothèse suggère que ce serait l'addition de variants communs particuliers qui causeraient un type particulier d'épilepsie commune. Ainsi, les épilepsies à hérédité complexes devraient être considérées comme des traits quantitatifs et de nouvelles stratégies plus performantes permettant d'identifier ces variants communs de susceptibilité. Comme nous l'avons vu précédemment, actuellement, la méthode de choix est l'étude cas-témoins. Mais cette dernière fait encore débat, car aucune d'entre elles n'a réellement apporté des résultats concluants. Ainsi, il est probable que le principal problème de ces études soit la faible probabilité *a priori* que les polymorphismes, analysés jusqu'à présent, soient réellement impliqués dans la susceptibilité à développer une épilepsie commune. A l'heure actuelle, il nous est impossible de déterminer si cette absence de résultats est due à cet effet minime des gènes étudiés, au nombre insuffisant de cas et/ou à l'hétérogénéité clinique des populations. En conséquence, l'approche à privilégier aujourd'hui dans les études cas-témoins est de réunir un très grand nombre de cas, puis de faire une analyse *génomique-entière*, grâce au développement des puces à ADN. Ainsi, l'effet additif de variants communs sur le phénotype pourra peut-être être mis en évidence dans les épilepsies communes à hérédité complexe. Avec des perfectionnements dans la méthodologie des études d'associations et une meilleure compréhension de la structure et du génome humain, nous avons maintenant l'opportunité d'améliorer notre aptitude à disséquer les bases génétiques de l'épilepsie.

L'accroissement de la compréhension des mécanismes moléculaires des épilepsies pourrait permettre de développer de meilleurs traitements antiépileptiques. Les médicaments traditionnels possèdent de multiples sites d'action incluant les canaux ioniques. Bien que mettre au point des substances ayant une action plus ciblée pour les épilepsies est complexe, des modèles intéressants pour le développement de thérapies allèles-spécifiques existent déjà pour d'autres maladies, telles que les maladies cardiaques. Aujourd'hui, notre challenge est de comprendre comment chaque variation génique contribue au phénotype épileptique à bases polygéniques chez un individu donné, mais aussi de déchiffrer l'architecture génétique des épilepsies, particulièrement les relations complexes entre le phénotype et le génotype. Ainsi, il y aura une meilleure compréhension de la pathogenèse des épilepsies ce qui est important pour aider à un meilleur diagnostic de la maladie, au développement de tests prénataux, à un conseil génétique approprié et par conséquent, amener à de nouveaux traitements. L'espoir actuel réside dans la meilleure

compréhension des bases fondamentales des épilepsies, entre autre pharmaco-résistantes, pour qu'ainsi des thérapies de plus en plus efficaces voient le jour.

Références

- (1980) Consensus statement. Febrile seizures: long-term management of children with fever-associated seizures. *Pediatrics* 66: 1009-12
- (1981) Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 22: 489-501
- (1989) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 30: 389-99
- (1993) Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 75: 1305-15
- Annegers JF (1996) *The epidemiology of epilepsy*, Williams and Wilkins edn, Baltimore
- Aronica E, Boer K, van Vliet EA, Redeker S, Baayen JC, Spliet WG, van Rijen PC, Troost D, da Silva FH, Wadman WJ, Gorter JA (2007) Complement activation in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 26: 497-511
- Audenaert D, Claes L, Ceulemans B, Lofgren A, Van Broeckhoven C, De Jonghe P (2003) A deletion in SCN1B is associated with febrile seizures and early-onset absence epilepsy. *Neurology* 61: 854-6
- Audenaert D, Claes L, Claeys KG, Deprez L, Van Dyck T, Goossens D, Del-Favero J, Van Paesschen W, Van Broeckhoven C, De Jonghe P (2005) A novel susceptibility locus at 2p24 for generalised epilepsy with febrile seizures plus. *J Med Genet* 42: 947-52
- Audenaert D, Schwartz E, Claeys KG, Claes L, Deprez L, Suls A, Van Dyck T, Lagae L, Van Broeckhoven C, Macdonald RL, De Jonghe P (2006) A novel GABRG2 mutation associated with febrile seizures. *Neurology* 67: 687-90
- Ayerdi-Izquierdo A, Stavrides G, Selles-Martinez JJ, Larrea L, Bovo G, Lopez de Munain A, Bisulli F, Marti-Masso JF, Michelucci R, Poza JJ, Tinuper P, Stephani U, Striano P, Striano S, Staub E, Sarafidou T, Hinzmann B, Moschonas N, Siebert R, Deloukas P, Nobile C, Perez-Tur J (2006) Genetic analysis of the LGI/Epitempin gene family in sporadic and familial lateral temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 70: 118-26
- Badly-Moulinier M (1997) *La pathologie épileptique*, John Libbey Eurotexte edn, Paris
- Ban E, Milon G, Prudhomme N, Fillion G, Haour F (1991) Receptors for interleukin-1 (alpha and beta) in mouse brain: mapping and neuronal localization in hippocampus. *Neuroscience* 43: 21-30
- Barker D, Wright E, Nguyen K, Cannon L, Fain P, Goldgar D, Bishop DT, Carey J, Baty B, Kivlin J, et al. (1987) Gene for von Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosome 17. *Science* 236: 1100-2
- Barneveld RA, Keijzer W, Tegelaers FP, Ginns EI, Geurts van Kessel A, Brady RO, Barranger JA, Tager JM, Galjaard H, Westerveld A, Reuser AJ (1983) Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. *Hum Genet* 64: 227-31
- Bate L, Gardiner M (1999) Genetics of inherited epilepsies. *Epileptic Disord* 1: 7-19
- Baulac S, Gourfinkel-An I, Couarch P, Depienne C, Kaminska A, Dulac O, Baulac M, LeGuern E, Nabbout R (2008) A novel locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus in French families. *Arch Neurol* 65: 943-51
- Baulac S, Gourfinkel-An I, Nabbout R, Huberfeld G, Serratosa J, Leguern E, Baulac M (2004) Fever, genes, and epilepsy. *Lancet Neurol* 3: 421-30
- Baulac S, Gourfinkel-An I, Picard F, Rosenberg-Bourgin M, Prud'homme JF, Baulac M, Brice A, LeGuern E (1999) A second locus for familial generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2q21-q33. *Am J Hum Genet* 65: 1078-85

-
- Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'homme JF, Baulac M, Brice A, Bruzzone R, LeGuern E (2001a) First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* 28: 46-8
- Baulac S, Picard F, Herman A, Feingold J, Genin E, Hirsch E, Prud'homme JF, Baulac M, Brice A, LeGuern E (2001b) Evidence for digenic inheritance in a family with both febrile convulsions and temporal lobe epilepsy implicating chromosomes 18qter and 1q25-q31. *Ann Neurol* 49: 786-92
- Bender RA, Dube C, Gonzalez-Vega R, Mina EW, Baram TZ (2003) Mossy fiber plasticity and enhanced hippocampal excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis, in an animal model of prolonged febrile seizures. *Hippocampus* 13: 399-412
- Berkovic SF, Andermann F, Carpenter S, Wolfe LS (1986) Progressive myoclonus epilepsies: specific causes and diagnosis. *N Engl J Med* 315: 296-305
- Berkovic SF, Howell RA, Hay DA, Hopper JL (1990) A twin study of the epilepsies. *Epilepsia* 31: 813
- Berkovic SF, Howell RA, Hay DA, Hopper JL (1998) Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Ann Neurol* 43: 435-45
- Berkovic SF, Izzillo P, McMahon JM, Harkin LA, McIntosh AM, Phillips HA, Briellmann RS, Wallace RH, Mazarib A, Neufeld MY, Korczyn AD, Scheffer IE, Mulley JC (2004) LGI1 mutations in temporal lobe epilepsies. *Neurology* 62: 1115-9
- Berkovic SF, Scheffer IE (2001) Genetics of the epilepsies. *Epilepsia* 42 Suppl 5: 16-23
- 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: 403-6
- Billinton A, Baird VH, Thom M, Duncan JS, Upton N, Bowery NG (2001) GABA(B(1)) mRNA expression in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res* 86: 84-9
- Blumcke I, Brockhaus A, Scheiwe C, Rollbrocker B, Wolf HK, Elger CE, Wiestler OD (1997) The apolipoprotein E epsilon 4 allele is not associated with early onset temporal lobe epilepsy. *Neuroreport* 8: 1235-7
- Bodmer W, Bonilla C (2008) Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat Genet* 40: 695-701
- Bonanni P, Malcarne M, Moro F, Veggiotti P, Buti D, Ferrari AR, Parrini E, Mei D, Volzone A, Zara F, Heron SE, Bordo L, Marini C, Guerrini R (2004) Generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+): clinical spectrum in seven Italian families unrelated to SCN1A, SCN1B, and GABRG2 gene mutations. *Epilepsia* 45: 149-58
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-31
- Brandt CA, Kierkegaard O, Hindkjaer J, Jensen PK, Pedersen S, Therkelsen AJ (1993) Ring chromosome 20 with loss of telomeric sequences detected by multicolour PRINS. *Clin Genet* 44: 26-31
- Bray PF, Wisner WC (1965) Hereditary Characteristics of Familial Temporal-Central Focal Epilepsy. *Pediatrics* 36: 207-11
- Brena RM, Huang TH, Plass C (2006) Toward a human epigenome. *Nat Genet* 38: 1359-60
- Briellmann RS, Jackson GD, Torn-Broers Y, Berkovic SF (2001) Causes of epilepsies: insights from discordant monozygous twins. *Ann Neurol* 49: 45-52
- Briellmann RS, Torn-Broers Y, Busuttil BE, Major BJ, Kalnins RM, Olsen M, Jackson GD, Frauman AG, Berkovic SF (2000) APOE epsilon4 genotype is associated with an earlier onset of chronic temporal lobe epilepsy. *Neurology* 55: 435-7
- Brodtkorb E, Gu W, Nakken KO, Fischer C, Steinlein OK (2002) Familial temporal lobe epilepsy with aphasic seizures and linkage to chromosome 10q22-q24. *Epilepsia* 43: 228-35

-
- Buoni S, Grosso S, Di Cosmo G, Di Bartolo RM, Di Marco V, Fois A (1998) Segregation analysis in typical absence epilepsy. *J Child Neurol* 13: 89-93
- Buono RJ, Ferraro TN, O'Connor MJ, Sperling MR, Ryan SG, Scattergood T, Mulholland N, Gilmore J, Lohoff FW, Berrettini WH (2001) Lack of association between an interleukin 1 beta (IL-1beta) gene variation and refractory temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 42: 782-4
- Callenbach PM, Brouwer OF (1997) Hereditary epilepsy syndromes. *Clin Neurol Neurosurg* 99: 159-71
- Camfield P, Camfield C, Gordon K, Dooley J (1994) What types of epilepsy are preceded by febrile seizures? A population-based study of children. *Dev Med Child Neurol* 36: 887-92
- Carr IM, Flintoff KJ, Taylor GR, Markham AF, Bonthron DT (2006) Interactive visual analysis of SNP data for rapid autozygosity mapping in consanguineous families. *Hum Mutat* 27: 1041-6
- Catalano F (1973) Remarks on the pathogenesis of so-called idiopathic epilepsy. *Acta Neurol (Napoli)* 28: 183-207
- Cavalleri GL, Lynch JM, Depondt C, Burley MW, Wood NW, Sisodiya SM, Goldstein DB (2005) Failure to replicate previously reported genetic associations with sporadic temporal lobe epilepsy: where to from here? *Brain* 128: 1832-40
- Cendes F, Andermann F, Dubeau F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, Olivier A, Andermann E, Robitaille Y, Lopes-Cendes I, et al. (1993) Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology* 43: 1083-7
- Ceulemans BP, Claes LR, Lagae LG (2004) Clinical correlations of mutations in the SCN1A gene: from febrile seizures to severe myoclonic epilepsy in infancy. *Pediatr Neurol* 30: 236-43
- Chabrol E, Gourfinkel-An I, Scheffer IE, Picard F, Couarch P, Berkovic SF, McMahon JM, Bajaj N, Mota-Vieira L, Mota R, Trouillard O, Depienne C, Baulac M, LeGuern E, Baulac S (2007) Absence of mutations in the LGII receptor ADAM22 gene in autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Epilepsy Res* 76: 41-8
- Chan EM, Young EJ, Ianzano L, Munteanu I, Zhao X, Christopoulos CC, Avanzini G, Elia M, Ackerley CA, Jovic NJ, Bohlega S, Andermann E, Rouleau GA, Delgado-Escueta AV, Minassian BA, Scherer SW (2003) Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet* 35: 125-7
- Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, Leppert M (1998) A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 18: 53-5
- Chen Y, Lu J, Pan H, Zhang Y, Wu H, Xu K, Liu X, Jiang Y, Bao X, Yao Z, Ding K, Lo WH, Qiang B, Chan P, Shen Y, Wu X (2003) Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann Neurol* 54: 239-43
- Chou IC, Lee CC, Huang CC, Wu JY, Tsai JJ, Tsai CH, Tsai FJ (2003a) Association of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha4 polymorphisms with febrile convulsions. *Epilepsia* 44: 1089-93
- Chou IC, Peng CT, Huang CC, Tsai JJ, Tsai FJ, Tsai CH (2003b) Association analysis of gamma 2 subunit of gamma-aminobutyric acid type A receptor polymorphisms with febrile seizures. *Pediatr Res* 54: 26-9
- Chou IC, Tsai CH, Hsieh YY, Peng CT, Tsai FJ (2003c) Association between polymorphism of interleukin-1beta-511 promoter and susceptibility to febrile convulsions in Taiwanese children. *Acta Paediatr* 92: 1356
- Chou IC, Tsai CH, Lee CC, Lin SS, Tsai FJ (2004) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphisms in febrile seizures. *Epilepsy Res* 60: 27-9
- Chou IC, Tsai FJ, Huang CC, Lin CC, Tsai CH (2002) The voltage-gated potassium channel KCNQ2 in Taiwanese children with febrile convulsions. *Neuroreport* 13: 1971-3
- Chung M, Stout JT, Borchert MS (2000) Clinical diversity of hereditary Duane's retraction syndrome. *Ophthalmology* 107: 500-3
- Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P (2001) De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet* 68: 1327-32

-
- Combi R, Dalpra L, Ferini-Strambi L, Tenchini ML (2005) Frontal lobe epilepsy and mutations of the corticotropin-releasing hormone gene. *Ann Neurol* 58: 899-904
- Corey LA, Berg K, Pellock JM, Solaas MH, Nance WE, DeLorenzo RJ (1991) The occurrence of epilepsy and febrile seizures in Virginian and Norwegian twins. *Neurology* 41: 1433-6
- Corey M, Farewell V (1996) Determinants of mortality from cystic fibrosis in Canada, 1970-1989. *Am J Epidemiol* 143: 1007-17
- Cossette P, Liu L, Brisebois K, Dong H, Lortie A, Vanasse M, Saint-Hilaire JM, Carmant L, Verner A, Lu WY, Wang YT, Rouleau GA (2002) Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 31: 184-9
- De Simone R, Daquin G, Genton P (2006) Senile myoclonic epilepsy in Down syndrome: a video and EEG presentation of two cases. *Epileptic Disord* 8: 223-7
- Delgado-Escueta AV, Greenberg DA, Treiman L, Liu A, Sparkes RS, Barbetti A, Park MS, Terasaki PI (1989) Mapping the gene for juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia* 30 Suppl 4: S8-18; discussion S24-7
- Depienne C, Arzimanoglou A, Trouillard O, Fedirko E, Baulac S, Saint-Martin C, Ruberg M, Dravet C, Nabbout R, Baulac M, Gourfinkel-An I, LeGuern E (2006) Parental mosaicism can cause recurrent transmission of SCN1A mutations associated with severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum Mutat* 27: 389
- Depondt C, Van Paesschen W, Matthijs G, Legius E, Martens K, Demaerel P, Wilms G (2002) Familial temporal lobe epilepsy with febrile seizures. *Neurology* 58: 1429-33
- Deprez L, Claes LR, Claeys KG, Audenaert D, Van Dyck T, Goossens D, Van Paesschen W, Del-Favero J, Van Broeckhoven C, De Jonghe P (2006) Genome-wide linkage of febrile seizures and epilepsy to the FEB4 locus at 5q14.3-q23.1 and no MASS1 mutation. *Hum Genet* 118: 618-25
- Dibbens LM, Feng HJ, Richards MC, Harkin LA, Hodgson BL, Scott D, Jenkins M, Petrou S, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF, Macdonald RL, Mulley JC (2004) GABRD encoding a protein for extra- or perisynaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet* 13: 1315-9
- Dobyns WB, Reiner O, Carrozzo R, Ledbetter DH (1993) Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *JAMA* 270: 2838-42
- Dominici R, Cattaneo M, Malferrari G, Archi D, Mariani C, Grimaldi LM, Biunno I (2002) Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. *Immunogenetics* 54: 82-6
- Doose H, Gerken H, Horstmann T, Volzke E (1973) Genetic factors in spike-wave absences. *Epilepsia* 14: 57-75
- Dravet C (1978) Les épilepsies graves de l'enfant
- Dudbridge F (2008) Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Hum Hered* 66: 87-98
- Durner M, Keddache MA, Tomasini L, Shinnar S, Resor SR, Cohen J, Harden C, Moshe SL, Rosenbaum D, Kang H, Ballaban-Gil K, Hertz S, Labar DR, Luciano D, Wallace S, Yohai D, Klotz I, Dicker E, Greenberg DA (2001) Genome scan of idiopathic generalized epilepsy: evidence for major susceptibility gene and modifying genes influencing the seizure type. *Ann Neurol* 49: 328-35
- Durner M, Sander T, Greenberg DA, Johnson K, Beck-Mannagetta G, Janz D (1991) Localization of idiopathic generalized epilepsy on chromosome 6p in families of juvenile myoclonic epilepsy patients. *Neurology* 41: 1651-5
- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112: 257-69
- Eisner V, Pauli LL, Livingston S (1959) Hereditary aspects of epilepsy. *Bull Johns Hopkins Hosp* 105: 245-71

- Elmslie FV, Rees M, Williamson MP, Kerr M, Kjeldsen MJ, Pang KA, Sundqvist A, Friis ML, Chadwick D, Richens A, Covanis A, Santos M, Arzimanoglou A, Panayiotopoulos CP, Curtis D, Whitehouse WP, Gardiner RM (1997) Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. *Hum Mol Genet* 6: 1329-34
- Elmslie FV, Williamson MP, Rees M, Kerr M, Kjeldsen MJ, Pang KA, Sundqvist A, Friis ML, Richens A, Chadwick D, Whitehouse WP, Gardiner RM (1996) Linkage analysis of juvenile myoclonic epilepsy and microsatellite loci spanning 61 cM of human chromosome 6p in 19 nuclear pedigrees provides no evidence for a susceptibility locus in this region. *Am J Hum Genet* 59: 653-63
- EPI Csdlé (2008)
- Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, Baulac S, Huberfeld G, An-Gourfinkel I, Brice A, LeGuern E, Moulard B, Chaigne D, Buresi C, Malafosse A (2000) Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet* 24: 343-5
- Everett K, Chioza B, Aicardi J, Aschauer H, Brouwer O, Callenbach P, Covanis A, Dooley J, Dulac O, Durner M, Eeg-Olofsson O, Feucht M, Friis M, Guerrini R, Heils A, Kjeldsen M, Nabbout R, Sander T, Wirrell E, McKeigue P, Robinson R, Taske N, Gardiner M (2007a) Linkage and mutational analysis of CLCN2 in childhood absence epilepsy. *Epilepsy Res* 75: 145-53
- Everett KV, Chioza B, Aicardi J, Aschauer H, Brouwer O, Callenbach P, Covanis A, Dulac O, Eeg-Olofsson O, Feucht M, Friis M, Goutieres F, Guerrini R, Heils A, Kjeldsen M, Lehesjoki AE, Makoff A, Nabbout R, Olsson I, Sander T, Siren A, McKeigue P, Robinson R, Taske N, Rees M, Gardiner M (2007b) Linkage and association analysis of CACNG3 in childhood absence epilepsy. *Eur J Hum Genet* 15: 463-72
- Fahsold R, Rott HD, Lorenz P (1991) A third gene locus for tuberous sclerosis is closely linked to the phenylalanine hydroxylase gene locus. *Hum Genet* 88: 85-90
- Falconer MA, Serafetinides EA, Corsellis JA (1964) Etiology and Pathogenesis of Temporal Lobe Epilepsy. *Arch Neurol* 10: 233-48
- Fang YY, Bain S, Haan EA, Eyre HJ, MacDonald M, Wright TJ, Altherr MR, Riess O, Sutherland G, Callen DF (1997) High resolution characterization of an interstitial deletion of less than 1.9 Mb at 4p16.3 associated with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet* 71: 453-7
- Fernandez G, Effenberger O, Vinz B, Steinlein O, Elger CE, Dohring W, Heinze HJ (1998) Hippocampal malformation as a cause of familial febrile convulsions and subsequent hippocampal sclerosis. *Neurology* 50: 909-17
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW (2006) Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 7: 85-97
- Fong GC, Shah PU, Gee MN, Serratos JM, Castroviejo IP, Khan S, Ravat SH, Mani J, Huang Y, Zhao HZ, Medina MT, Treiman LJ, Pineda G, Delgado-Escueta AV (1998) Childhood absence epilepsy with tonic-clonic seizures and electroencephalogram 3-4-Hz spike and multispikes-slow wave complexes: linkage to chromosome 8q24. *Am J Hum Genet* 63: 1117-29
- Fontenele-Neto JD, Kalinina E, Feng Y, Fricker LD (2005) Identification and distribution of mouse carboxypeptidase A-6. *Brain Res Mol Brain Res* 137: 132-42
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10604-9
- Fryer AE, Chalmers A, Connor JM, Fraser I, Povey S, Yates AD, Yates JR, Osborne JP (1987) Evidence that the gene for tuberous sclerosis is on chromosome 9. *Lancet* 1: 659-61
- Gambardella A, Aguglia U, Chifari R, Labate A, Manna I, Serra P, Romeo N, Sibilgia G, Lepiane E, Russa AL, Ventura P, Cittadella R, Sasanelli F, Colosimo E, Leggio U, Zappia M, Quattrone A (2005) ApoE epsilon4 allele and disease duration affect verbal learning in mild temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 46: 110-7

-
- Gambardella A, Aguglia U, Cittadella R, Romeo N, Sibilia G, LePiane E, Messina D, Manna I, Oliveri RL, Zappia M, Quattrone A (1999) Apolipoprotein E polymorphisms and the risk of nonlesional temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 40: 1804-7
- Gambardella A, Manna I, Labate A, Chifari R, La Russa A, Serra P, Cittadella R, Bonavita S, Andreoli V, LePiane E, Sasanelli F, Di Costanzo A, Zappia M, Tedeschi G, Aguglia U, Quattrone A (2003a) GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 60: 560-3
- Gambardella A, Manna I, Labate A, Chifari R, Serra P, La Russa A, LePiane E, Cittadella R, Andreoli V, Sasanelli F, Zappia M, Aguglia U, Quattrone A (2003b) Prodynorphin gene promoter polymorphism and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 44: 1255-6
- Gambardella A, Messina D, Le Piane E, Oliveri RL, Annesi G, Zappia M, Andermann E, Quattrone A, Aguglia U (2000) Familial temporal lobe epilepsy autosomal dominant inheritance in a large pedigree from southern Italy. *Epilepsy Res* 38: 127-32
- Gardiner RM (1990) Genes and epilepsy. *J Med Genet* 27: 537-44
- Gargus JJ (2003) Unraveling monogenic channelopathies and their implications for complex polygenic disease. *Am J Hum Genet* 72: 785-803
- Gastaut H (1969) Classification of the epilepsies. Proposal for an international classification. *Epilepsia* 10: Suppl:14-21
- Gastaut H, Pinsard N, Raybaud C, Aicardi J, Zifkin B (1987) Lissencephaly (agyria-pachygyria): clinical findings and serial EEG studies. *Dev Med Child Neurol* 29: 167-80
- Geisler S, Berod A, Zahm DS, Rostene W (2006) Brain neurotensin, psychostimulants, and stress--emphasis on neuroanatomical substrates. *Peptides* 27: 2364-84
- Gennaro E, Santorelli FM, Bertini E, Buti D, Gaggero R, Gobbi G, Lini M, Granata T, Freri E, Parmeggiani A, Striano P, Veggiotti P, Cardinali S, Bricarelli FD, Minetti C, Zara F (2006) Somatic and germline mosaicisms in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 489-93
- Genton P, Michelucci R, Tassinari CA, Roger J (1990) The Ramsay Hunt syndrome revisited: Mediterranean myoclonus versus mitochondrial encephalomyopathy with ragged-red fibers and Baltic myoclonus. *Acta Neurol Scand* 81: 8-15
- Gerard F, Pereira S, Robaglia-Schlupp A, Genton P, Szepetowski P (2002) Clinical and genetic analysis of a new multigenerational pedigree with GEFS+ (Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus). *Epilepsia* 43: 581-6
- Gomez-Abad C, Gomez-Garre P, Gutierrez-Delicado E, Saygi S, Michelucci R, Tassinari CA, Rodriguez de Cordoba S, Serratos JM (2005) Lafora disease due to EPM2B mutations: a clinical and genetic study. *Neurology* 64: 982-6
- Gourfinkel-An I, Baulac S, Nabbout R, Ruberg M, Baulac M, Brice A, LeGuern E (2004) Monogenic idiopathic epilepsies. *Lancet Neurol* 3: 209-18
- Greenberg DA, Delgado-Escueta AV, Wideltz H, Sparkes RS, Treiman L, Maldonado HM, Park MS, Terasaki PI (1988) Juvenile myoclonic epilepsy (JME) may be linked to the BF and HLA loci on human chromosome 6. *Am J Med Genet* 31: 185-92
- Greger V, Knoll JH, Woolf E, Glatt K, Tyndale RF, DeLorey TM, Olsen RW, Tobin AJ, Sikela JM, Nakatsu Y, et al. (1995) The gamma-aminobutyric acid receptor gamma 3 subunit gene (GABRG3) is tightly linked to the alpha 5 subunit gene (GABRA5) on human chromosome 15q11-q13 and is transcribed in the same orientation. *Genomics* 26: 258-64
- Gu W, Brodtkorb E, Steinlein OK (2002) LGI1 is mutated in familial temporal lobe epilepsy characterized by aphasic seizures. *Ann Neurol* 52: 364-7
- Gutowski NJ (2000) Duane's syndrome. *Eur J Neurol* 7: 145-9

-
- Halal F, Chitayat D, Parikh H, Rosenblatt B, Tranchemontagne J, Vekemans M, Potier M (1992) Ring chromosome 20 and possible assignment of the structural gene encoding human carboxypeptidase-L to the distal segment of the long arm of chromosome 20. *Am J Med Genet* 43: 576-9
- Harkin LA, Bowser DN, Dibbens LM, Singh R, Phillips F, Wallace RH, Richards MC, Williams DA, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE, Petrou S (2002) Truncation of the GABA(A)-receptor gamma2 subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet* 70: 530-6
- Haspolat S, Baysal Y, Duman O, Coskun M, Tosun O, Yegin O (2005) Interleukin-1alpha, interleukin-1beta, and interleukin-1Ra polymorphisms in febrile seizures. *J Child Neurol* 20: 565-8
- Hauser WA (1994) The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia* 35 Suppl 2: S1-6
- Hauser WA, Anderson VE (1986) *Genetics of epilepsy*, Churchill Livingstone edn, Edinburgh
- Hauser WA, Annegers JF, Anderson VE, Kurland LT (1985) The risk of seizure disorders among relatives of children with febrile convulsions. *Neurology* 35: 1268-73
- Hedera P, Abou-Khalil B, Crunk AE, Taylor KA, Haines JL, Sutcliffe JS (2004) Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: two families with novel mutations in the LGI1 gene. *Epilepsia* 45: 218-22
- Hedera P, Blair MA, Andermann E, Andermann F, D'Agostino D, Taylor KA, Chahine L, Pandolfo M, Bradford Y, Haines JL, Abou-Khalil B (2007) Familial mesial temporal lobe epilepsy maps to chromosome 4q13.2-q21.3. *Neurology* 68: 2107-12
- Hedera P, Ma S, Blair MA, Taylor KA, Hamati A, Bradford Y, Abou-Khalil B, Haines JL (2006) Identification of a novel locus for febrile seizures and epilepsy on chromosome 21q22. *Epilepsia* 47: 1622-8
- Heijbel J, Blom S, Rasmuson M (1975) Benign epilepsy of childhood with centrotemporal EEG foci: a genetic study. *Epilepsia* 16: 285-93
- Heils A, Haug K, Kunz WS, Fernandez G, Horvath S, Rebstock J, Propping P, Elger CE (2000) Interleukin-1beta gene polymorphism and susceptibility to temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Ann Neurol* 48: 948-50
- Hellsten E, Vesa J, Speer MC, Makela TP, Jarvela I, Alitalo K, Ott J, Peltonen L (1993) Refined assignment of the infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (INCL, CLN1) locus at 1p32: incorporation of linkage disequilibrium in multipoint analysis. *Genomics* 16: 720-5
- Herbst R, Nicklin MJ (1997) SEZ-6: promoter selectivity, genomic structure and localized expression in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 44: 309-22
- Heron SE, Scheffer IE, Berkovic SF, Dibbens LM, Mulley JC (2007) Channelopathies in idiopathic epilepsy. *Neurotherapeutics* 4: 295-304
- Hirose S, Mitsudome A, Okada M, Kaneko S (2005) Genetics of idiopathic epilepsies. *Epilepsia* 46 Suppl 1: 38-43
- Hopkins SJ, Rothwell NJ (1995) Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci* 18: 83-8
- Horne BD, Camp NJ (2004) Principal component analysis for selection of optimal SNP-sets that capture intragenic genetic variation. *Genet Epidemiol* 26: 11-21
- Ieshima A, Takeshita K, Yamamoto K (1983) Ring 14 syndrome with decreased bone mineral content in two pubertal girls. *Jinrui Idengaku Zasshi* 28: 35-43
- Jallon P (2002) *Physiopathologie – Le phénomène épileptique – La décharge épileptique*, Presses Universitaires de France edn, Paris
- Jamali S, Bartolomei F, Robaglia-Schlupp A, Massacrier A, Peragut JC, Regis J, Dufour H, Ravid R, Roll P, Pereira S, Royer B, Roeckel-Trevisiol N, Fontaine M, Guye M, Boucraut J, Chauvel P, Cau P, Szepetowski P (2006) Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. *Brain* 129: 625-41

-
- Janz D, Beck-Mannagetta G, Sander T (1992) Do idiopathic generalized epilepsies share a common susceptibility gene? *Neurology* 42: 48-55
- Jin L, Jia Y, Zhang B, Xu Q, Fan Y, Wu L, Shen Y (2003) Association analysis of a polymorphism of interleukin 1 beta (IL-1 beta) gene with temporal lobe epilepsy in a Chinese population. *Epilepsia* 44: 1306-9
- Johnson EW, Dubovsky J, Rich SS, O'Donovan CA, Orr HT, Anderson VE, Gil-Nagel A, Ahmann P, Dokken CG, Schneider DT, Weber JL (1998) Evidence for a novel gene for familial febrile convulsions, FEB2, linked to chromosome 19p in an extended family from the Midwest. *Hum Mol Genet* 7: 63-7
- Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli Boneschi F, Choi C, Morozov P, Das K, Teplitskaya E, Yu A, Cayanis E, Penchaszadeh G, Kottmann AH, Pedley TA, Hauser WA, Ottman R, Gilliam TC (2002) Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 30: 335-41
- Kananura C, Haug K, Sander T, Runge U, Gu W, Hallmann K, Rebstock J, Heils A, Steinlein OK (2002) A splice-site mutation in GABRG2 associated with childhood absence epilepsy and febrile convulsions. *Arch Neurol* 59: 1137-41
- Kandel ER, Schwartz, J.H. , Jessell, T.M . (2000) *Seizures and Epilepsy*, International edn, London and New-York
- Kandt RS, Haines JL, Smith M, Northrup H, Gardner RJ, Short MP, Dumars K, Roach ES, Steingold S, Wall S, et al. (1992) Linkage of an important gene locus for tuberous sclerosis to a chromosome 16 marker for polycystic kidney disease. *Nat Genet* 2: 37-41
- Kaneko S, Okada M, Iwasa H, Yamakawa K, Hirose S (2002) Genetics of epilepsy: current status and perspectives. *Neurosci Res* 44: 11-30
- Kanemoto K, Kawasaki J, Miyamoto T, Obayashi H, Nishimura M (2000) Interleukin (IL)1beta, IL-1alpha, and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 47: 571-4
- Kapoor A, Ratnapriya R, Kuruttukulam G, Anand A (2007) A novel genetic locus for juvenile myoclonic epilepsy at chromosome 5q12-q14. *Hum Genet* 121: 655-62
- Kauffman MA, Levy EM, Consalvo D, Mordoh J, Kochen S (2008) GABABR1 (G1465A) gene variation and temporal lobe epilepsy controversy: New evidence. *Seizure*
- Kira R, Torisu H, Takemoto M, Nomura A, Sakai Y, Sanefuji M, Sakamoto K, Matsumoto S, Gondo K, Hara T (2005) Genetic susceptibility to simple febrile seizures: interleukin-1beta promoter polymorphisms are associated with sporadic cases. *Neurosci Lett* 384: 239-44
- Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J (1997) UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* 15: 70-3
- Kjeldsen MJ, Corey LA, Christensen K, Friis ML (2003) Epileptic seizures and syndromes in twins: the importance of genetic factors. *Epilepsy Res* 55: 137-46
- Kjeldsen MJ, Kyvik KO, Friis ML, Christensen K (2002) Genetic and environmental factors in febrile seizures: a Danish population-based twin study. *Epilepsy Res* 51: 167-77
- Knight-Jones E, Knight S, Heussler H, Regan R, Flint J, Martin K (2000) Neurodevelopmental profile of a new dysmorphic syndrome associated with submicroscopic partial deletion of 1p36.3. *Dev Med Child Neurol* 42: 201-6
- Knoll JH, Sinnott D, Wagstaff J, Glatt K, Wilcox AS, Whiting PM, Wingrove P, Sikela JM, Lalonde M (1993) FISH ordering of reference markers and of the gene for the alpha 5 subunit of the gamma-aminobutyric acid receptor (GABRA5) within the Angelman and Prader-Willi syndrome chromosomal regions. *Hum Mol Genet* 2: 183-9
- Kobayashi E, Li LM, Lopes-Cendes I, Cendes F (2002) Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal sclerosis in asymptomatic, first-degree relatives of patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol* 59: 1891-4
- Kobayashi E, Lopes-Cendes I, Guerreiro CA, Sousa SC, Guerreiro MM, Cendes F (2001) Seizure outcome and hippocampal atrophy in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology* 56: 166-72

-
- Koskiniemi M, Donner M, Majuri H, Haltia M, Norio R (1974) Progressive myoclonus epilepsy. A clinical and histopathological study. *Acta Neurol Scand* 50: 307-32
- Koskiniemi ML (1986) Baltic myoclonus. *Adv Neurol* 43: 57-64
- Krawczun MS, Jenkins EC, Brown WT (1985) Analysis of the fragile-X chromosome: localization and detection of the fragile site in high resolution preparations. *Hum Genet* 69: 209-11
- Kugler SL, Stenroos ES, Mandelbaum DE, Lehner T, McKoy VV, Prossick T, Sasvari J, Swannick K, Katz J, Johnson WG (1998) Hereditary febrile seizures: phenotype and evidence for a chromosome 19p locus. *Am J Med Genet* 79: 354-61
- Kuks JB, Cook MJ, Fish DR, Stevens JM, Shorvon SD (1993) Hippocampal sclerosis in epilepsy and childhood febrile seizures. *Lancet* 342: 1391-4
- Labate A, Manna I, Gambardella A, Le Piane E, La Russa A, Condino F, Cittadella R, Aguglia U, Quattrone A (2007) Association between the M129V variant allele of PRNP gene and mild temporal lobe epilepsy in women. *Neurosci Lett* 421: 1-4
- Lalioti MD, Mirosou M, Buresi C, Peitsch MC, Rossier C, Ouazzani R, Baldy-Moulinier M, Bottani A, Malafosse A, Antonarakis SE (1997a) Identification of mutations in cystatin B, the gene responsible for the Unverricht-Lundborg type of progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Am J Hum Genet* 60: 342-51
- Lalioti MD, Scott HS, Buresi C, Rossier C, Bottani A, Morris MA, Malafosse A, Antonarakis SE (1997b) Dodecamer repeat expansion in cystatin B gene in progressive myoclonus epilepsy. *Nature* 386: 847-51
- Lander ES, Schork NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-48
- Lee TS, Mane S, Eid T, Zhao H, Lin A, Guan Z, Kim JH, Schweitzer J, King-Stevens D, Weber P, Spencer SS, Spencer DD, de Lanerolle NC (2007) Gene expression in temporal lobe epilepsy is consistent with increased release of glutamate by astrocytes. *Mol Med* 13: 1-13
- Lehesjoki AE, Koskiniemi M, Sistonen P, Miao J, Hastbacka J, Norio R, de la Chapelle A (1991) Localization of a gene for progressive myoclonus epilepsy to chromosome 21q22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3696-9
- Lennox WG, Lennox, M.A. (1960) *The genetics of epilepsy. Epilepsy and related disorders.*, Little, Brown edn, Boston
- Leppert M, Anderson VE, Quattlebaum T, Stauffer D, O'Connell P, Nakamura Y, Lalouel JM, White R (1989) Benign familial neonatal convulsions linked to genetic markers on chromosome 20. *Nature* 337: 647-8
- Lerche H, Weber YG, Baier H, Jurkat-Rott K, Kraus de Camargo O, Ludolph AC, Bode H, Lehmann-Horn F (2001) Generalized epilepsy with febrile seizures plus: further heterogeneity in a large family. *Neurology* 57: 1191-8
- Lewis TB, Leach RJ, Ward K, O'Connell P, Ryan SG (1993) Genetic heterogeneity in benign familial neonatal convulsions: identification of a new locus on chromosome 8q. *Am J Hum Genet* 53: 670-5
- Li Y, Bollag G, Clark R, Stevens J, Conroy L, Fults D, Ward K, Friedman E, Samowitz W, Robertson M, et al. (1992) Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in human tumors. *Cell* 69: 275-81
- Liang J, Zhang Y, Chen Y, Wang J, Pan H, Wu H, Xu K, Liu X, Jiang Y, Shen Y, Wu X (2007) Common polymorphisms in the CACNA1H gene associated with childhood absence epilepsy in Chinese Han population. *Ann Hum Genet* 71: 325-35
- Liang J, Zhang Y, Wang J, Pan H, Wu H, Xu K, Liu X, Jiang Y, Shen Y, Wu X (2006) New variants in the CACNA1H gene identified in childhood absence epilepsy. *Neurosci Lett* 406: 27-32
- Lopes-Cendes I, Scheffer IE, Berkovic SF, Rousseau M, Andermann E, Rouleau GA (2000) A new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2. *Am J Hum Genet* 66: 698-701
- Lundborg H (1903) *Die Progressive Myoclonus-Epilepsie (Unverrichts Myoklonie)*, Almquist & Wiksell edn, Uppsala

-
- Lyons PJ, Callaway MB, Fricker LD (2008) Characterization of carboxypeptidase A6, an extracellular matrix peptidase. *J Biol Chem* 283: 7054-63
- Ma S, Abou-Khalil B, Sutcliffe JS, Haines JL, Hedera P (2005) The GABBR1 locus and the G1465A variant is not associated with temporal lobe epilepsy preceded by febrile seizures. *BMC Med Genet* 6: 13
- Madia F, Striano P, Gennaro E, Malacarne M, Paravidino R, Biancheri R, Budetta M, Cilio MR, Gaggero R, Pierluigi M, Minetti C, Zara F (2006) Cryptic chromosome deletions involving SCN1A in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Neurology* 67: 1230-5
- Maher J, McLachlan RS (1995) Febrile convulsions. Is seizure duration the most important predictor of temporal lobe epilepsy? *Brain* 118 (Pt 6): 1521-8
- Malafosse A, Leboyer M, Dulac O, Navelet Y, Plouin P, Beck C, Laklou H, Mouchnino G, Grandscene P, Vallee L, et al. (1992a) Confirmation of linkage of benign familial neonatal convulsions to D20S19 and D20S20. *Hum Genet* 89: 54-8
- Malafosse A, Lehesjoki AE, Genton P, Labauge P, Durand G, Tassinari CA, Dravet C, Michelucci R, de la Chapelle A (1992b) Identical genetic locus for Baltic and Mediterranean myoclonus. *Lancet* 339: 1080-1
- Manna I, Labate A, Gambardella A, Forabosco P, La Russa A, Le Piane E, Aguglia U, Quattrone A (2007) Serotonin transporter gene (5-Htt): association analysis with temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett* 421: 52-6
- Mantegazza M, Gambardella A, Rusconi R, Schiavon E, Annesi F, Cassulini RR, Labate A, Carrideo S, Chifari R, Canevini MP, Canger R, Franceschetti S, Annesi G, Wanke E, Quattrone A (2005) Identification of an Nav1.1 sodium channel (SCN1A) loss-of-function mutation associated with familial simple febrile seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18177-82
- Marescaux C, Vergnes M (1995) Genetic Absence Epilepsy in Rats from Strasbourg (GAERS). *Ital J Neurol Sci* 16: 113-8
- Marescaux C, Vergnes M, Depaulis A (1992) Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg--a review. *J Neural Transm Suppl* 35: 37-69
- Marini C, Harkin LA, Wallace RH, Mulley JC, Scheffer IE, Berkovic SF (2003) Childhood absence epilepsy and febrile seizures: a family with a GABA(A) receptor mutation. *Brain* 126: 230-40
- Marini C, Mei D, Helen Cross J, Guerrini R (2006) Mosaic SCN1A mutation in familial severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsia* 47: 1737-40
- Mas C, Taske N, Deutsch S, Guipponi M, Thomas P, Covanis A, Friis M, Kjeldsen MJ, Pizzolato GP, Villemure JG, Buresi C, Rees M, Malafosse A, Gardiner M, Antonarakis SE, Meda P (2004) Association of the connexin36 gene with juvenile myoclonic epilepsy. *J Med Genet* 41: e93
- Mathes A (1969) Genetic studies in epilepsy, Charles C Thomas edn, Springfield, Illinois
- Maurer-Morelli CV, Secolin R, Marchesini RB, Santos NF, Kobayashi E, Cendes F, Lopes-Cendes I (2006) THE SCN2A gene is not a likely candidate for familial mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 71: 233-6
- Menini C, Silva-Barrat C, R. N (1994) The epileptic and nonepileptic generalized myoclonus of the Papio papio baboon, John Libbey & Compagny edn, Montrouge
- Metrakos K, Metrakos JD (1960) Genetics of convulsive disorders. I. Introduction, problems, methods, and base lines. *Neurology* 10: 228-240
- Metrakos K, Metrakos JD (1961) Genetics of convulsive disorders. II. Genetic and electroencephalographic studies in centrencephalic epilepsy. *Neurology* 11: 474-83
- Michelucci R, Poza JJ, Sofia V, de Feo MR, Binelli S, Bisulli F, Scudellaro E, Simionati B, Zimbello R, D'Orsi G, Passarelli D, Avoni P, Avanzini G, Tinuper P, Biondi R, Valle G, Mautner VF, Stephani U, Tassinari CA, Moschonas NK, Siebert R, Lopez de Munain A, Perez-Tur J, Nobile C (2003) Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical spectrum, new epitempin mutations, and genetic heterogeneity in seven European families. *Epilepsia* 44: 1289-97

- Miles DK, Holmes GL (1990) Benign neonatal seizures. *J Clin Neurophysiol* 7: 369-79
- Minassian BA, Lee JR, Herbrick JA, Huizenga J, Soder S, Mungall AJ, Dunham I, Gardner R, Fong CY, Carpenter S, Jardim L, Satishchandra P, Andermann E, Snead OC, 3rd, Lopes-Cendes I, Tsui LC, Delgado-Escueta AV, Rouleau GA, Scherer SW (1998) Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet* 20: 171-4
- Mitchison HM, O'Rawe AM, Lerner TJ, Taschner PE, Schlumpf K, D'Arigo K, de Vos N, Gormally E, Phillips HA, Thompson AD, et al. (1995) Refined localization of the Batten disease gene (CLN3) by haplotype and linkage disequilibrium mapping to D16S288-D16S383 and exclusion from this region of a variant form of Batten disease with granular osmiophilic deposits. *Am J Med Genet* 57: 312-5
- Moller RS, Schneider LM, Hansen CP, Bugge M, Ullmann R, Tommerup N, Tumer Z (2008) Balanced translocation in a patient with severe myoclonic epilepsy of infancy disrupts the sodium channel gene SCN1A. *Epilepsia*
- Morante-Redolat JM, Gorostidi-Pagola A, Piquer-Sirerol S, Saenz A, Poza JJ, Galan J, Gesk S, Sarafidou T, Mautner VF, Binelli S, Staub E, Hinzmann B, French L, Prud'homme JF, Passarelli D, Scannapieco P, Tassinari CA, Avanzini G, Marti-Masso JF, Kluwe L, Deloukas P, Moschonas NK, Michelucci R, Siebert R, Nobile C, Perez-Tur J, Lopez de Munain A (2002) Mutations in the LGI1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Hum Mol Genet* 11: 1119-28
- Morimoto M, Mazaki E, Nishimura A, Chiyonobu T, Sawai Y, Murakami A, Nakamura K, Inoue I, Ogiwara I, Sugimoto T, Yamakawa K (2006) SCN1A mutation mosaicism in a family with severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia* 47: 1732-6
- Morton NE (1955) Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 7: 277-318
- Moulard B, Chaigne D, Malafosse A (2000) Clinical heterogeneity in pedigrees with 2q-linked febrile seizures. *Ann Neurol* 47: 839-40
- Moulard B, Genton P, Grid D, Jeanpierre M, Ouazzani R, Mrabet A, Morris M, LeGuern E, Dravet C, Mauguere F, Utermann B, Baldy-Moulinier M, Belaidi H, Bertran F, Biraben A, Ali Cherif A, Chkili T, Crespel A, Darcel F, Dulac O, Geny C, Humbert-Claude V, Kassiotis P, Buresi C, Malafosse A (2002) Haplotype study of West European and North African Unverricht-Lundborg chromosomes: evidence for a few founder mutations. *Hum Genet* 111: 255-62
- Moulard B, Guipponi M, Chaigne D, Mouthon D, Buresi C, Malafosse A (1999) Identification of a new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) on chromosome 2q24-q33. *Am J Hum Genet* 65: 1396-400
- Mrabet H, Belhedi N, Bouchlaka S, El Gaaied A, Mrabet A (2007) GEFS+ is not related to the most common mutations of SCN1B, SCN1A and GABRG2 in two Tunisian families. *Neurol Sci* 28: 311-4
- Mulley J, Heron S, Scheffer I, Berkovic S (2004) Febrile convulsions and genetic susceptibility: role of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit. *Epilepsia* 45: 561; author reply 561-2
- Mulley JC, Nelson P, Guerrero S, Dibbens L, Iona X, McMahon JM, Harkin L, Schouten J, Yu S, Berkovic SF, Scheffer IE (2006) A new molecular mechanism for severe myoclonic epilepsy of infancy: exonic deletions in SCN1A. *Neurology* 67: 1094-5
- Mulley JC, Scheffer IE, Harkin LA, Berkovic SF, Dibbens LM (2005) Susceptibility genes for complex epilepsy. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2: R243-9
- Murayama K, Greenwood RS, Rao KW, Aylsworth AS (1991) Neurological aspects of del(1q) syndrome. *Am J Med Genet* 40: 488-92
- Nabbout R, Baulac S, Desguerre I, Bahi-Buisson N, Chiron C, Ruberg M, Dulac O, LeGuern E (2007) New locus for febrile seizures with absence epilepsy on 3p and a possible modifier gene on 18p. *Neurology* 68: 1374-81
- Nabbout R, Gennaro E, Dalla Bernardina B, Dulac O, Madia F, Bertini E, Capovilla G, Chiron C, Cristofori G, Elia M, Fontana E, Gaggero R, Granata T, Guerrini R, Loi M, La Selva L, Lispi ML, Matricardi A, Romeo A, Tzolas V, Valseriati D, Veggiotti P, Vigeveno F, Vallee L, Dagna Bricarelli F, Bianchi A, Zara F (2003) Spectrum of SCN1A mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Neurology* 60: 1961-7

-
- Nabbout R, Prud'homme JF, Herman A, Feingold J, Brice A, Dulac O, LeGuern E (2002) A locus for simple pure febrile seizures maps to chromosome 6q22-q24. *Brain* 125: 2668-80
- Nakayama J, Fu YH, Clark AM, Nakahara S, Hamano K, Iwasaki N, Matsui A, Arinami T, Ptacek LJ (2002a) A nonsense mutation of the MASS1 gene in a family with febrile and afebrile seizures. *Ann Neurol* 52: 654-7
- Nakayama J, Hamano K, Iwasaki N, Nakahara S, Horigome Y, Saitoh H, Aoki T, Maki T, Kikuchi M, Migita T, Ohta T, Yokouchi Y, Tanaka R, Hasegawa M, Matsui A, Hamaguchi H, Arinami T (2000) Significant evidence for linkage of febrile seizures to chromosome 5q14-q15. *Hum Mol Genet* 9: 87-91
- Nakayama J, Hamano K, Noguchi E, Horiuchi Y, Iwasaki N, Ohta M, Nakahara S, Naoi T, Matsui A, Arinami T (2003) Failure to find causal mutations in the GABA(A)-receptor gamma2 subunit (GABRG2) gene in Japanese febrile seizure patients. *Neurosci Lett* 343: 117-20
- Nakayama J, Yamamoto N, Hamano K, Iwasaki N, Ohta M, Nakahara S, Horigome Y, Nakahara C, Noguchi E, Shiono J, Shimakura Y, Yamakawa-Kobayashi K, Matsui A, Arinami T (2002b) Failure to find evidence for association between voltage-gated sodium channel gene SCN2A variants and febrile seizures in humans. *Neurosci Lett* 329: 249-51
- Nakayama J, Yamamoto N, Hamano K, Iwasaki N, Ohta M, Nakahara S, Matsui A, Noguchi E, Arinami T (2004) Linkage and association of febrile seizures to the IMPA2 gene on human chromosome 18. *Neurology* 63: 1803-7
- Nelson KB, Ellenberg JH (1976) Predictors of epilepsy in children who have experienced febrile seizures. *N Engl J Med* 295: 1029-33
- Nicoll JA, Mrak RE, Graham DI, Stewart J, Wilcock G, MacGowan S, Esiri MM, Murray LS, Dewar D, Love S, Moss T, Griffin WS (2000) Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 47: 365-8
- Norio R, Koskiniemi M (1979) Progressive myoclonus epilepsy: genetic and nosological aspects with special reference to 107 Finnish patients. *Clin Genet* 15: 382-98
- OMS (2001) Epilepsies : étiologie, épidémiologie et pronostic.
- Ottman R (1992) Genetic and developmental influences on susceptibility to epilepsy: evidence from twins. *Paediatr Perinat Epidemiol* 6: 265-72
- Ottman R, Risch N, Hauser WA, Pedley TA, Lee JH, Barker-Cummings C, Lustenberger A, Nagle KJ, Lee KS, Scheuer ML, et al. (1995) Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat Genet* 10: 56-60
- Ozkara C, Uzan M, Tanriverdi T, Baykara O, Ekinci B, Yeni N, Kafadar A, Buyru N (2006) Lack of association between IL-1beta/alpha gene polymorphisms and temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Seizure* 15: 288-91
- Page GP, George V, Go RC, Page PZ, Allison DB (2003) "Are we there yet?": Deciding when one has demonstrated specific genetic causation in complex diseases and quantitative traits. *Am J Hum Genet* 73: 711-9
- Pal DK, Evgrafov OV, Tabares P, Zhang F, Durner M, Greenberg DA (2003a) BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for common juvenile myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet* 73: 261-70
- Pal DK, Kugler SL, Mandelbaum DE, Durner M (2003b) Phenotypic features of familial febrile seizures: case-control study. *Neurology* 60: 410-4
- Peiffer A, Thompson J, Charlier C, Otterud B, Varvil T, Pappas C, Barnitz C, Gruenthal K, Kuhn R, Leppert M (1999) A locus for febrile seizures (FEB3) maps to chromosome 2q23-24. *Ann Neurol* 46: 671-8
- Pembrey M, Fennell SJ, van den Berghe J, Fitchett M, Summers D, Butler L, Clarke C, Griffiths M, Thompson E, Super M (1989) The association of Angelman's syndrome with deletions within 15q11-13. *J Med Genet* 26: 73-7
- Peng CT, Chou IC, Li CI, Hsu YA, Tsai CH, Tsai FJ (2004) Association of the nicotinic receptor beta 2 subunit and febrile seizures. *Pediatr Neurol* 30: 186-9

-
- Pennacchio LA, Lehesjoki AE, Stone NE, Willour VL, Virtaneva K, Miao J, D'Amato E, Ramirez L, Faham M, Koskineniemi M, Warrington JA, Norio R, de la Chapelle A, Cox DR, Myers RM (1996) Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science* 271: 1731-4
- Pereira S, Vieira JP, Barroca F, Roll P, Carvalhas R, Cau P, Sequeira S, Genton P, Szeppetowski P (2004) Severe epilepsy, retardation, and dysmorphic features with a 2q deletion including SCN1A and SCN2A. *Neurology* 63: 191-2
- Peters HC, Kammer G, Volz A, Kaupmann K, Ziegler A, Bettler B, Epplen JT, Sander T, Riess O (1998) Mapping, genomic structure, and polymorphisms of the human GABABR1 receptor gene: evaluation of its involvement in idiopathic generalized epilepsy. *Neurogenetics* 2: 47-54
- Petit J, Roubertie A, Inoue Y, Genton P (1999) Non-convulsive status in the ring chromosome 20 syndrome: a video illustration of 3 cases. *Epileptic Disord* 1: 237-41
- Phillips HA, Scheffer IE, Berkovic SF, Hollway GE, Sutherland GR, Mulley JC (1995) Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 20q 13.2. *Nat Genet* 10: 117-8
- Phillips HA, Scheffer IE, Crossland KM, Bhatia KP, Fish DR, Marsden CD, Howell SJ, Stephenson JB, Tolmie J, Plazzi G, Eeg-Olofsson O, Singh R, Lopes-Cendes I, Andermann E, Andermann F, Berkovic SF, Mulley JC (1998) Autosomal dominant nocturnal frontal-lobe epilepsy: genetic heterogeneity and evidence for a second locus at 15q24. *Am J Hum Genet* 63: 1108-16
- Pisano T, Marini C, Brovedani P, Brizzolara D, Pruna D, Mei D, Moro F, Cianchetti C, Guerrini R (2005) Abnormal phonologic processing in familial lateral temporal lobe epilepsy due to a new LGI1 mutation. *Epilepsia* 46: 118-23
- Pizzuti A, Calabrese G, Bozzali M, Telvi L, Morizio E, Guida V, Gatta V, Stuppia L, Ion A, Palka G, Dallapiccola B (2002) A peptidase gene in chromosome 8q is disrupted by a balanced translocation in a duane syndrome patient. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 3609-12
- Porfirio B, Valorani MG, Giannotti A, Sabetta G, Dallapiccola B (1987) Ring 20 chromosome phenotype. *J Med Genet* 24: 375-7
- Poza JJ, Saenz A, Martinez-Gil A, Cheron N, Cobo AM, Urtasun M, Marti-Masso JF, Grid D, Beckmann JS, Prud'homme JF, Lopez de Munain A (1999) Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical and genetic study of a large Basque pedigree linked to chromosome 10q. *Ann Neurol* 45: 182-8
- Ren L, Jin L, Zhang B, Jia Y, Wu L, Shen Y (2005) Lack of GABABR1 gene variation (G1465A) in a Chinese population with temporal lobe epilepsy. *Seizure* 14: 611-3
- Rich SS, Annegers JF, Hauser WA, Anderson VE (1987) Complex segregation analysis of febrile convulsions. *Am J Hum Genet* 41: 249-57
- Risch NJ (2000) Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 405: 847-56
- Rothman KJ (1990) No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology* 1: 43-6
- Saavedra JM (2005) Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol* 25: 485-512
- Salzmann A, Moulard B, Crespel A, Baldy-Moulinier M, Buresi C, Malafosse A (2005) GABA receptor 1 polymorphism (G1465A) and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 46: 931-3
- Salzmann A, Perroud N, Crespel A, Lambercy C, Malafosse A (2008) Candidate genes for temporal lobe epilepsy: a replication study. *Neurol Sci*
- Sampson JR, Janssen LA, Sandkuijl LA (1992) Linkage investigation of three putative tuberous sclerosis determining loci on chromosomes 9q, 11q, and 12q. The Tuberous Sclerosis Collaborative Group. *J Med Genet* 29: 861-6
- Sander JW (2003) The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol* 16: 165-70
- Sander T, Schulz H, Saar K, Gennaro E, Riggio MC, Bianchi A, Zara F, Luna D, Bulteau C, Kaminska A, Ville D, Cieuta C, Picard F, Prud'homme JF, Bate L, Sundquist A, Gardiner RM, Janssen GA, de Haan GJ,

-
- Kasteleijn-Nolst-Trenite DG, Bader A, Lindhout D, Riess O, Wienker TF, Janz D, Reis A (2000) Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies. *Hum Mol Genet* 9: 1465-72
- Savukoski M, Kestila M, Williams R, Jarvela I, Sharp J, Harris J, Santavuori P, Gardiner M, Peltonen L (1994) Defined chromosomal assignment of CLN5 demonstrates that at least four genetic loci are involved in the pathogenesis of human ceroid lipofuscinoses. *Am J Hum Genet* 55: 695-701
- Scheffer IE, Berkovic SF (1997) Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain* 120 (Pt 3): 479-90
- Scheffer IE, Harkin LA, Grinton BE, Dibbens LM, Turner SJ, Zielinski MA, Xu R, Jackson G, Adams J, Connellan M, Petrou S, Wellard RM, Briellmann RS, Wallace RH, Mulley JC, Berkovic SF (2007) Temporal lobe epilepsy and GEFS+ phenotypes associated with SCN1B mutations. *Brain* 130: 100-9
- Scheffer IE, Wallace RH, Mulley JC, Berkovic SF (2000) Locus for febrile seizures. *Ann Neurol* 47: 840-1
- Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, Lane AH, Faryniarz AG, Chao MV, Huson S, Korf BR, Parry DM, Pericak-Vance MA, et al. (1987) Genetic linkage of von Recklinghausen neurofibromatosis to the nerve growth factor receptor gene. *Cell* 49: 589-94
- Selmer KK, Egeland T, Solaas MH, Nakken KO, Kjeldsen MJ, Friis ML, Brandal K, Corey LA, Undlien DE (2008) Genetic screening of Scandinavian families with febrile seizures and epilepsy or GEFS+. *Acta Neurol Scand* 117: 289-92
- Serratosa JM, Delgado-Escueta AV, Posada I, Shih S, Drury I, Berciano J, Zabala JA, Antunez MC, Sparkes RS (1995) The gene for progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type maps to chromosome 6q. *Hum Mol Genet* 4: 1657-63
- Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG (1997) Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet* 61: 642-50
- Shimizu-Nishikawa K, Kajiwara K, Kimura M, Katsuki M, Sugaya E (1995) Cloning and expression of SEZ-6, a brain-specific and seizure-related cDNA. *Brain Res Mol Brain Res* 28: 201-10
- Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC (1990) Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 61: 931-7
- 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: 25-9
- Singh R, Andermann E, Whitehouse WP, Harvey AS, Keene DL, Seni MH, Crossland KM, Andermann F, Berkovic SF, Scheffer IE (2001) Severe myoclonic epilepsy of infancy: extended spectrum of GEFS+? *Epilepsia* 42: 837-44
- Singh R, Gardner RJ, Crossland KM, Scheffer IE, Berkovic SF (2002) Chromosomal abnormalities and epilepsy: a review for clinicians and gene hunters. *Epilepsia* 43: 127-40
- Singh R, Scheffer IE, Crossland K, Berkovic SF (1999) Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a common childhood-onset genetic epilepsy syndrome. *Ann Neurol* 45: 75-81
- Singh S, Sethi I, Francheschetti S, Riggio C, Avanzini G, Yamakawa K, Delgado-Escueta AV, Ganesh S (2006) Novel NHLRC1 mutations and genotype-phenotype correlations in patients with Lafora's progressive myoclonic epilepsy. *J Med Genet* 43: e48
- Skradski SL, Clark AM, Jiang H, White HS, Fu YH, Ptacek LJ (2001) A novel gene causing a mendelian audiogenic mouse epilepsy. *Neuron* 31: 537-44
- Skradski SL, White HS, Ptacek LJ (1998) Genetic mapping of a locus (mass1) causing audiogenic seizures in mice. *Genomics* 49: 188-92
- Sleat DE, Donnelly RJ, Lackland H, Liu CG, Sohar I, Pullarkat RK, Lobel P (1997) Association of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Science* 277: 1802-5

-
- Steinberg AG, Brown DC (1960) On the Incidence of Cystic Fibrosis of the Pancreas. *Am J Hum Genet* 12: 416-24
- Steinlein OK (1999) Idiopathic epilepsies with a monogenic mode of inheritance. *Epilepsia* 40 Suppl 3: 9-11
- Steinlein OK, Magnusson A, Stoodt J, Bertrand S, Weiland S, Berkovic SF, Nakken KO, Propping P, Bertrand D (1997) An insertion mutation of the *CHRNA4* gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Hum Mol Genet* 6: 943-7
- Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF (1995) A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* 11: 201-3
- Stogmann E, Zimprich A, Baumgartner C, Aull-Watschinger S, Hollt V, Zimprich F (2002) A functional polymorphism in the prodynorphin gene promoter is associated with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 51: 260-3
- Stogmann E, Zimprich A, Baumgartner C, Gleiss A, Zimprich F (2006) Lack of association between a GABA receptor 1 gene polymorphism and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 47: 437-9
- Strachan T, Read A (2003) Human gene expression
- Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Fukushima K, Shimomura J, Fujiwara T, Hamano S, Inoue Y, Yamakawa K (2002) Frequent mutations of *SCN1A* in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurology* 58: 1122-4
- Sugawara T, Tsurubuchi Y, Agarwala KL, Ito M, Fukuma G, Mazaki-Miyazaki E, Nagafuji H, Noda M, Imoto K, Wada K, Mitsudome A, Kaneko S, Montal M, Nagata K, Hirose S, Yamakawa K (2001) A missense mutation of the Na⁺ channel alpha II subunit gene *Na(v)1.2* in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6384-9
- Sugawara T, Tsurubuchi Y, Fujiwara T, Mazaki-Miyazaki E, Nagata K, Montal M, Inoue Y, Yamakawa K (2003) *Nav1.1* channels with mutations of severe myoclonic epilepsy in infancy display attenuated currents. *Epilepsy Res* 54: 201-7
- Sugimoto Y, Morita R, Amano K, Fong CY, Shah PU, Castroviejo IP, Khan S, Delgado-Escueta AV, Yamakawa K (2000) Childhood absence epilepsy in 8q24: refinement of candidate region and construction of physical map. *Genomics* 68: 264-72
- Suls A, Claeys KG, Goossens D, Harding B, Van Luijk R, Scheers S, Deprez L, Audenaert D, Van Dyck T, Beeckmans S, Smouts I, Ceulemans B, Lagae L, Buyse G, Barisic N, Misson JP, Wauters J, Del-Favero J, De Jonghe P, Claes LR (2006) Microdeletions involving the *SCN1A* gene may be common in *SCN1A*-mutation-negative SMEI patients. *Hum Mutat* 27: 914-20
- Sunami K, Hayashi N, Endo S (1988) A twin study of febrile convulsions in the general population. *Jpn J Psychiatry Neurol* 42: 549-51
- Tan NC, Heron SE, Scheffer IE, Berkovic SF, Mulley JC (2005) Is variation in the GABA(B) receptor 1 gene associated with temporal lobe epilepsy? *Epilepsia* 46: 778-80
- Tan NC, Mulley JC, Berkovic SF (2004) Genetic association studies in epilepsy: "the truth is out there". *Epilepsia* 45: 1429-42
- Tanaka M, Castroviejo I, Medina M (2000) Linkage analysis between subsyndromes of childhood absence epilepsy and the GABAA receptor β 3 subunit on chromosome 15q11.2-12. . *Epilepsia* 250: 41
- Tarkka R, Paakko E, Pyhtinen J, Uhari M, Rantala H (2003) Febrile seizures and mesial temporal sclerosis: No association in a long-term follow-up study. *Neurology* 60: 215-8
- Tilgen N, Pfeiffer H, Cobilanschi J, Rau B, Horvath S, Elger CE, Propping P, Heils A (2002) Association analysis between the human interleukin 1beta (-511) gene polymorphism and susceptibility to febrile convulsions. *Neurosci Lett* 334: 68-70
- Tilgen N, Rebstock J, Horvath S, Propping P, Elger CE, Heils A (2003) Prodynorphin gene promoter polymorphism and temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 53: 280-1; author reply 281-2

-
- Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, Eldridge R, Kley N, Menon AG, Pulaski K, et al. (1993) A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 75: 826
- Tsai FJ, Chou IC, Hsieh YY, Lee CC, Lin CC, Tsai CH (2002a) Interleukin-4 intron 3 polymorphism is not related to susceptibility to febrile seizures. *Pediatr Neurol* 27: 271-4
- Tsai FJ, Hsieh YY, Chang CC, Lin CC, Tsai CH (2002b) Polymorphisms for interleukin 1 beta exon 5 and interleukin 1 receptor antagonist in Taiwanese children with febrile convulsions. *Arch Pediatr Adolesc Med* 156: 545-8
- Tsuboi T (1980) Genetic aspects of epilepsy. *Folia Psychiatr Neurol Jpn* 34: 215-25
- Tsuboi T (1987) Genetic analysis of febrile convulsions: twin and family studies. *Hum Genet* 75: 7-14
- Tsuboi T, Christian W (1973) On the genetics of the primary generalized epilepsy with sporadic myoclonias of impulsive petit mal type. A clinical and electroencephalographic study of 399 probands. *Humangenetik* 19: 155-82
- Tsuboi T, Endo S (1977) Incidence of seizures and EEG abnormalities among offspring of epileptic patients. *Hum Genet* 36: 173-89
- Tsuboi T, Endo S (1991) Genetic studies of febrile convulsions: analysis of twin and family data. *Epilepsy Res Suppl* 4: 119-28
- Unverricht H (1891) *Die Myoclonie*, Franz Deuticke edn, Vienna
- Urak L, Feucht M, Fathi N, Hornik K, Fuchs K (2006) A GABRB3 promoter haplotype associated with childhood absence epilepsy impairs transcriptional activity. *Hum Mol Genet* 15: 2533-41
- Vadlamudi L, Andermann E, Lombroso CT, Schachter SC, Milne RL, Hopper JL, Andermann F, Berkovic SF (2004) Epilepsy in twins: insights from unique historical data of William Lennox. *Neurology* 62: 1127-33
- Vamvakopoulos JE, Taylor CJ, Morris-Stiff GJ, Green C, Metcalfe S (2002) The interleukin-1 receptor antagonist gene: a single-copy variant of the intron 2 variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism. *Eur J Immunogenet* 29: 337-40
- van Slechtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, Lindhout D, van den Ouweland A, Halley D, Young J, Burley M, Jeremiah S, Woodward K, Nahmias J, Fox M, Ekong R, Osborne J, Wolfe J, Povey S, Snell RG, Cheadle JP, Jones AC, Tachataki M, Ravine D, Sampson JR, Reeve MP, Richardson P, Wilmer F, Munro C, Hawkins TL, Sepp T, Ali JB, Ward S, Green AJ, Yates JR, Kwiatkowska J, Henske EP, Short MP, Haines JH, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ (1997) Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* 277: 805-8
- VanLandingham KE, Heinz ER, Cavazos JE, Lewis DV (1998) Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions. *Ann Neurol* 43: 413-26
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, et al. (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65: 905-14
- Vesa J, Hellsten E, Verkruyse LA, Camp LA, Rapola J, Santavuori P, Hofmann SL, Peltonen L (1995) Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nature* 376: 584-7
- Virta M, Hurme M, Helminen M (2002) Increased frequency of interleukin-1beta (-511) allele 2 in febrile seizures. *Pediatr Neurol* 26: 192-5
- Virtaneva K, Miao J, Traskelin AL, Stone N, Warrington JA, Weissenbach J, Myers RM, Cox DR, Sistonen P, de la Chapelle A, et al. (1996) Progressive myoclonus epilepsy EPM1 locus maps to a 175-kb interval in distal 21q. *Am J Hum Genet* 58: 1247-53
- Wagstaff J, Knoll JH, Fleming J, Kirkness EF, Martin-Gallardo A, Greenberg F, Graham JM, Jr., Menninger J, Ward D, Venter JC, et al. (1991) Localization of the gene encoding the GABAA receptor beta 3 subunit to the Angelman/Prader-Willi region of human chromosome 15. *Am J Hum Genet* 49: 330-7

-
- Wallace RH, Berkovic SF, Howell RA, Sutherland GR, Mulley JC (1996) Suggestion of a major gene for familial febrile convulsions mapping to 8q13-21. *J Med Genet* 33: 308-12
- Wallace RH, Marini C, Petrou S, Harkin LA, Bowser DN, Panchal RG, Williams DA, Sutherland GR, Mulley JC, Scheffer IE, Berkovic SF (2001) Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet* 28: 49-52
- Wallace RH, Scheffer IE, Parasivam G, Barnett S, Wallace GB, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC (2002) Generalized epilepsy with febrile seizures plus: mutation of the sodium channel subunit SCN1B. *Neurology* 58: 1426-9
- Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL, Jr., Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC (1998) Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet* 19: 366-70
- Walz R, Castro RM, Velasco TR, Alexandre V, Jr., Lopes MH, Leite JP, Santos AC, Assirati JA, Jr., Wichert-Ana L, Terra-Bustamante VC, Bianchin MM, Maciag PC, Ribeiro KB, Guarnieri R, Araujo D, Cabalero O, Moura R, Salim AC, Kindlmann K, Landemberger MC, Marques W, Jr., Fernandes RM, Serafini LN, Machado HR, Carlotti CG, Jr., Brentani RR, Sakamoto AC, Martins VR (2003) Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant. *Neurology* 61: 1204-10
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES (1998) Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280: 1077-82
- Wang X, Sun W, Zhu X, Li L, Wu X, Lin H, Zhu S, Liu A, Du T, Liu Y, Niu N, Wang Y (2008) Association between the gamma-aminobutyric acid type B receptor 1 and 2 gene polymorphisms and mesial temporal lobe epilepsy in a Han Chinese population. *Epilepsy Res*
- Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44: 388-96
- Wei S, Segura S, Vendrell J, Aviles FX, Lanoue E, Day R, Feng Y, Fricker LD (2002) Identification and characterization of three members of the human metalloprotease gene family. *J Biol Chem* 277: 14954-64
- Weinhaeusel A, Morris MA, Antonarakis SE, Haas OA (2003) DNA deamination enables direct PCR amplification of the cystatin B (CSTB) gene-associated dodecamer repeat expansion in myoclonus epilepsy type Unverricht-Lundborg. *Hum Mutat* 22: 404-8
- Weissbecker KA, Durner M, Janz D, Scaramelli A, Sparkes RS, Spence MA (1991) Confirmation of linkage between juvenile myoclonic epilepsy locus and the HLA region of chromosome 6. *Am J Med Genet* 38: 32-6
- Wertelecki W, Rouleau GA, Superneau DW, Forehand LW, Williams JP, Haines JL, Gusella JF (1988) Neurofibromatosis 2: clinical and DNA linkage studies of a large kindred. *N Engl J Med* 319: 278-83
- Whitehouse WP, Rees M, Curtis D, Sundqvist A, Parker K, Chung E, Baralle D, Gardiner RM (1993) Linkage analysis of idiopathic generalized epilepsy (IGE) and marker loci on chromosome 6p in families of patients with juvenile myoclonic epilepsy: no evidence for an epilepsy locus in the HLA region. *Am J Hum Genet* 53: 652-62
- Wjst M (2004) Target SNP selection in complex disease association studies. *BMC Bioinformatics* 5: 92
- Yeni SN, Ozkara C, Buyru N, Baykara O, Hanoglu L, Karaagac N, Ozyurt E, Uzan M (2005) Association between APOE polymorphisms and mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Eur J Neurol* 12: 103-7
- Yinan M, Yu Q, Zhiyue C, Jianjun L, Lie H, Liping Z, Jianhui Z, Fang S, Dingfang B, Qing L, Xiru W (2004) Polymorphisms of casein kinase I gamma 2 gene associated with simple febrile seizures in Chinese Han population. *Neurosci Lett* 368: 2-6

-
- Yu ZL, Jiang JM, Wu DH, Xie HJ, Jiang JJ, Zhou L, Peng L, Bao GS (2007) Febrile seizures are associated with mutation of seizure-related (SEZ) 6, a brain-specific gene. *J Neurosci Res* 85: 166-72
- Zimprich A, Kraus J, Woltje M, Mayer P, Rauch E, Hollt V (2000) An allelic variation in the human prodynorphin gene promoter alters stimulus-induced expression. *J Neurochem* 74: 472-7
- Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, Gleiss A, Dal-Bianco A, Zimprich A, Plumer S, Baumgartner C, Mannhalter C (2004) Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 63: 1087-9