



HAL
open science

Caractérisation de variants génétiques de vulnérabilité à l'épilepsie chez des familles Algériennes

Amina Chentouf

► **To cite this version:**

Amina Chentouf. Caractérisation de variants génétiques de vulnérabilité à l'épilepsie chez des familles Algériennes. Génétique humaine. Faculté de Médecine d'Oran, Université Oran 1, 2016. Français. NNT: . tel-01672987

HAL Id: tel-01672987

<https://theses.hal.science/tel-01672987>

Submitted on 28 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université d'Oran



Faculté de Médecine d'Oran
Département de Médecine d'Oran

Thèse pour l'obtention du Doctorat en Sciences Médicales

**Caractérisation de variants génétiques de vulnérabilité à l'épilepsie
chez des familles Algériennes**

Soutenue publiquement par
Le Docteur Amina CHENTOUF épouse MEZOUUGH
Maitre Assistante en Neurologie
Le 28 Avril 2016
Jury

Directrice de thèse

Pr Malika CHAOUCH

Faculté de Médecine d'Alger

Présidente

Pr Salima Assami

Faculté de Médecine d'Alger

Membres

Pr Lakhdar Griene

Faculté de Médecine d'Alger

Pr Abdelmadjid Aboubeker

Faculté de Médecine d'Oran

Pr Djawed Bouchenak Khelladi

Faculté de Médecine de Tlemcen

Dr Meriem Aberkane

Faculté de Médecine d'Oran

Au nom de Dieu Clément et Miséricordieux
Je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la
santé, le savoir et la persévérance pour réaliser ce travail.

“The only way to be truly satisfied is to do what you believe is great work, and the only way to do great work is to love what you do. If you haven't found it yet, keep looking, and don't settle. As with all matters of the heart, you'll know when you find it. And like any great relationship, it just gets better and better as the years roll on. So keep looking, don't settle”.

-Steve Jobs-

DÉDICACES ET REMERCIEMENTS

Enfin, nous y voici ! Ces années de thèse sont passées et cette aventure se termine donc. Une thèse est avant tout un travail scientifique de longue haleine, un défi que l'on se donne à soi-même, mais c'est aussi une expérience forte et ô combien enrichissante. Cette période de doctorat aura été probablement l'un des meilleurs chapitres de ma vie.

Je me dois de remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail, que ce soit sur le terrain, à la pailasse, dans la réflexion, ou tout simplement par leur présence au quotidien. Il est difficile d'exprimer par des mots tous ces sentiments, mais je vais tenter de le faire, en essayant de n'oublier personne.

Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice de thèse Pr. Malika Chaouch ; Professeur en Neurologie à l'Etablissement Hospitalier Spécialisé de Benaknoun à Alger, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral. Je lui suis reconnaissante pour sa patience, ses encouragements, sa sympathie et sa disponibilité à tout moment. Ses conseils, ses commentaires, ses corrections et ses qualités scientifiques ont été très précieux pour mener à bien ce travail. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines, à sa rigueur, à son professionnalisme et à son ouverture d'esprit. Puisse ce travail répondre à son attente et lui témoigner de ma profonde admiration.

J'adresse mes vifs remerciements au Pr Salima Assami qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Veuillez croire en mon éternel respect et ma sincère gratitude.

Je remercie Pr Lakhdar Griene, Pr Abdelmadjid Aboubeker et Pr Djawed Bouchenak Khelladi d'avoir accepté avec une grande amabilité de faire partie de ce jury pour examiner cette thèse. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance et de ma considération respectueuse.

Mes remerciements très chaleureux vont au Dr Meriem Aberkane qui m'a accueillie au sein de son Laboratoire de Cytogénétique et Biologie Moléculaire, et qui m'a permis d'assister à ses conférences. Je remercie vivement tous les membres de son équipe pour leur grande disponibilité et l'ambiance décontractée qui m'a facilité le travail, et tout particulièrement le Dr Wefa Boughrara pour m'avoir formée à l'extraction de l'ADN, au caryotype, aux techniques de PCR et de FISH. Je la remercie pour la lecture critique de ce manuscrit et pour les précieux conseils qu'elle m'a apportés tout au long de mon stage. Je n'omettrai pas de remercier le Dr Fatima Moghtit pour la mise en page de cette thèse et pour les séances de travaux pratiques, ainsi que Imène Ouahba pour les expériences sur la pailasse.

Toute ma profonde gratitude va à mon Maître et Chef de service le Dr Mohand Laid Oubaich pour ses encouragements, son soutien et ses précieux conseils.

Je remercie le Pr Stylianos E. Antonarakis ; Chef du Laboratoire de Médecine Génétique et Développement à l'Université de Genève (Suisse), Directeur de iGE3 (institute of Genetics and Genomics of Geneva) et Président de HUGO (Human Genome Organisation). La collaboration avec sa fine équipe fut une expérience enrichissante.

Je citerai notamment Michel Guipponi pour le séquençage de nouvelle génération, Frédérique Sloan-Béna pour la recherche de CNV sur puces à ADN, Federico A. Santoni pour la partie bioinformatique et Corinne Gehrig pour le côté technique.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Dr Annick Salzmänn-Traschler pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail. Je la remercie notamment pour avoir su trouver du temps pour lire et apporter des corrections à mes manuscrits. Cette thèse ne serait sans doute pas ce qu'elle est sans sa collaboration. Avec toute mon admiration, Sincères remerciements.

Toute ma profonde gratitude va au Pr Hanan Hamamy; Professeur en Génétique Humaine au Département de Médecine Génétique et Développement à l'Hôpital Universitaire de Genève. Je lui suis reconnaissante pour sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements. Je la remercie pour le temps qu'elle a consacré à la lecture et à la correction des *drafts* de mes publications, pour la précieuse documentation qu'elle a mise à ma disposition et pour m'avoir formée au logiciel Genial Pedigree qui m'a servi à l'élaboration des arbres généalogiques.

Je tiens également à exprimer mes remerciements amicaux au Dr Kristin Webling et au Pr Ulo Langel du Département de Neurochimie de l'Université de Stockholm en Suède, pour avoir accepté de réaliser l'étude *in silico* de la mutation Galanine. Merci Kristin pour les cours de biochimie et pour la documentation.

La réalisation d'une partie des travaux présentés dans ce document a été rendue possible grâce aux soutiens financiers obtenus auprès du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (SNF-144082), du NCCR (National Center of Competence in Research) Synapsy, du Téléthon d'Italie (Grant no. GGP12078), de la Commission de Génétique de la Ligue Italienne Contre l'Épilepsie, et du Conseil Suédois de la Recherche.

Je tiens à remercier Dr. Nagy A. Youssef, Éditeur en chef de la revue Américaine « Journal of Psychology, Neuropsychiatric disorders and Brain Stimulation », ainsi que tous mes collègues de l'équipe éditoriale pour leur soutien et leurs encouragements.

Je remercie mes collègues du service de Neurologie du CHU d'Oran et le personnel de la Faculté de Médecine d'Oran en particulier Mme Houaria Ali Chaouche et Mme Fatiha Khalfa pour leur soutien inconditionnel.

Je garderai une place particulière pour mon amie Aicha Dahdouh ; Maître de Conférence en Psychiatrie au CHU d'Oran. Merci pour le travail remarquable que tu as effectué pour l'évaluation psychiatrique de toutes les familles incluses dans ce travail. Merci pour ton investissement, ta disponibilité et tes critiques intelligentes qui m'ont permis, je pense, de murir mes réflexions de jeune chercheur.

Que soient également remerciés Dr Noria Tahraoui pour avoir réalisé les IRM de mes patients ainsi que Dr Selouani, Dr Senouci et Dr Sellam pour leur collaboration aux examens neurophysiologiques.

Je n'omettrai pas de remercier Michael Sexton pour les cours de perfectionnement en Anglais, pour la relecture et les corrections de mes articles ainsi que la documentation qu'il a mise à ma disposition.

Je remercie l'équipe de l'ISPED (Institut de Santé Publique et Développement) à Bordeaux, en particulier mon tuteur du Diplôme Universitaire Pierre Joly. Les connaissances qu'il m'a inculquées dans le domaine des méthodes statistiques de régression en épidémiologie m'ont servies à réaliser la partie épidémiologique de ce travail.

Mes vifs remerciements vont à l'équipe du Laboratoire de Biostatistiques de la Faculté de Médecine d'Oran pour m'avoir formée à la recherche clinique, à la lecture critique, à la rédaction scientifique et à la manipulation des logiciels SPSS et EPI Info.

Je remercie le Pr Belarbi Khemliche et le Pr Brahim Fergoug du Laboratoire de Recherche en Pédagogie et Développement Didactique en Sciences Médicales de la Faculté de médecine d'Oran, de m'avoir formée à l'utilisation du logiciel de recherche documentaire EndNote. Merci pour cet outil précieux qui m'a fait gagner du temps dans la rédaction de ma thèse.

Mes remerciements les plus profonds vont aux patients et à leurs familles qui ont accepté de participer à ce travail.

Je dédie ce travail à ma famille, à la mémoire de mes grands-parents, à mes amis qui se reconnaîtront, et à mes parents qui me demandent depuis un moment déjà « Alors, c'est bientôt fini cette thèse ? ».

Et enfin, à ceux qui ont enduré ces années de thèse : mon mari et mes deux garçons Karim et Ishak. Je vous remercie, pour tout ce qu'il vous aura fallu supporter depuis mes absences jusqu'à ma présence virtuelle. Merci pour votre patience et pour tous les sacrifices auxquels vous avez consenti. Ce travail est avant tout le vôtre et vous méritez cet aboutissement plus que quiconque.

A toutes et à tous, un grand MERCI !

Merci 

Table des matières

Préface	17
Preface	19
Liste des figures	21
Liste des tableaux	23
Liste des annexes	25
Liste des abréviations	27
CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE	29
1. Définition de l'épilepsie	29
2. Historique de l'épilepsie	30
3. Epidémiologie de l'épilepsie	32
3.1. Incidence.....	32
3.2. Prévalence.....	33
3.3. Mortalité	33
3.4. Facteurs de risque	34
4. Physiopathologie de l'épilepsie	34
4.1. Modèles animaux	34
4.2. Mécanismes des crises	35
4.3. Mécanismes de l'épileptogenèse.....	35
5. Classification des crises d'épilepsie	37
5.1. Les crises généralisées.....	37
5.2. Les crises focales	37
6. Classification des épilepsies et des syndromes épileptiques	39
6.1. Les épilepsies génétiques	41
6.2. Les épilepsies structurales/métaboliques	47
6.3. Les épilepsies de cause inconnue	48
7. Diagnostic différentiel	48
8. Génétique des épilepsies	49
8.1. Concepts de génétique	49
8.2. Epidémiologie génétique	53
8.3. Techniques en génétique moléculaire appliquées à l'épilepsie.....	61
8.4. Bio-informatique et analyse du génome : Utilisation des banques de données	66
8.5. Progrès récents en génétique de l'épilepsie.....	68
8.6. Le conseil génétique.....	70

EXPOSE DES TRAVAUX

CHAPITRE II : L'épilepsie familiale en Algérie, caractéristiques cliniques et modes de transmission	75
Résumé	75
Abstract	77
1. Introduction	79
2. Matériels et méthodes	79
2.1. Région d'étude.....	79
2.2. Recrutement des familles et évaluation clinique.....	81
2.3. Classification des crises et des syndromes épileptiques	83
2.4. Consentement éclairé.....	84
2.5. Définitions.....	84

2.6. Analyses statistiques	85
3. Résultats	85
3.1. Caractéristiques cliniques de la cohorte	85
3.2. Caractéristiques cliniques des 40 probants	86
3.3. Résultats de l'analyse des modes de transmission	90
4. Discussion	93
4.1. Discussion des caractéristiques cliniques des 40 familles.....	93
4.2. Discussion des caractéristiques cliniques des 40 probants	94
4.3. Discussion des modes de transmission	96
5. Limites de l'étude	98
6. Conclusion	98
CHAPITRE III : Consanguinité et agrégation familiale de l'épilepsie	99
Résumé.....	99
Abstract.....	101
1. Introduction	103
2. Matériels et méthodes	104
2.1. Type d'enquête.....	104
2.2. Population d'étude	105
2.3. Définitions.....	105
2.4. Plan d'analyse.....	106
3. Résultats	106
3.1. Résultats de l'analyse descriptive des cas	107
3.2. Résultats de l'analyse univariée.....	108
3.3. Résultats de l'analyse multivariée	110
4. Discussion	110
5. Limites de l'étude	114
6. Conclusion	115
CHAPITRE IV : Mutation du gène <i>GAL</i> et épilepsie du lobe temporal.....	117
Résumé.....	117
Abstract.....	119
1. Introduction	121
2. Matériels et méthodes	122
2.1. Prélèvements sanguins.....	122
2.3. Identification de variants pathogènes.....	123
2.4. Recrutement d'individus épileptiques pour le dépistage de mutations <i>GAL</i>	124
2.5. Analyses fonctionnelles	125
3. Résultats	129
3.1. Résultats de l'analyse phénotypique de la famille EPI-ORA-AFF.....	129
3.2. Résultats du séquençage exomique.....	132
3.3. Résultats de la recherche de variants génétiques par VariantMaster.....	133
3.4. Résultats du dépistage des mutations du gène <i>GAL</i> dans la cohorte de patients avec épilepsie focale	135
3.5. Résultats de l'analyse fonctionnelle de la mutation p.A39E.....	136
4. Discussion	140
5. Conclusion	146
CHAPITRE V : Polymorphismes du gène <i>RELN</i> et vulnérabilité à l'épilepsie et à la schizophrénie	147
Résumé.....	147
Abstract.....	149
1. Introduction	151
2. Matériels et méthodes	152
2.1. Extraction de l'ADN	152

2.2. Analyses par séquençage exomique.....	152
3. Résultats	153
3.1. Description phénotypique de la famille EPI-ORA-SIA	153
3.2. Résultats du séquençage exomique.....	158
3.3. Résultats de la recherche de variants génétiques par VariantMaster.....	159
4. Discussion	161
4.1. Discussion des modes de transmission	161
4.2. Discussion des résultats du séquençage d'exons.....	161
5. Limites de l'étude et conclusion	166
CHAPITRE VI : Mutations du gène <i>EPM1</i> et épilepsie myoclonique progressive de type 1	169
Résumé.....	169
Abstract.....	171
1. Introduction	173
2. Matériels et méthodes	173
2.1. Extraction de l'ADN.....	174
2.2. Analyse par PCR quantitative (qPCR).....	174
2.3. Analyse par Southern Blot.....	175
3. Résultats	175
3.1. Résultats de l'analyse clinique et généalogique	175
3.2. Résultats de l'analyse génétique par Southern Blot	186
4. Discussion	187
4.1. Discussion des résultats cliniques, généalogiques et des modes de transmission	187
4.2. Discussion des résultats de l'analyse par Southern Blot	189
5. Conclusion	191
CHAPITRE VII : Variations du nombre de copies d'ADN et épilepsie	193
Résumé.....	193
Abstract:	195
1. Introduction	197
2. Matériel et méthodes	198
2.1. Analyses par CGH-array	198
2.2. Analyses bioinformatiques par Genome Browsers.....	198
3. Résultats	199
3.1. Résultats de l'analyse clinique et généalogique	199
3.2. Résultats des analyses génétiques de recherche de CNV par CGH-array	209
4. Discussion	217
4.1. Discussion des résultats de la famille EPI-ORA-FEL.....	218
4.2. Discussion des résultats de la famille EPI-ORA-KHE	223
5. Limites de l'étude	229
6. Conclusion	230
CHAPITRE VIII : CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	231
Références Bibliographiques	233
Annexes.....	293
Annexe 1: Publications en rapport avec la thèse.....	295
Annexe 2: Questionnaire d'investigation de l'épilepsie.....	327
Annexe 3: Formulaire de consentement et copie du journal officiel	347
Résumé en français.....	354
Résumé en arabe.....	355
Abstract en anglais.....	356

Préface

L'existence d'une composante génétique dans l'épilepsie est connue depuis des années grâce aux études épidémiologiques de concordance entre jumeaux et d'agrégation familiale, qui fournissent des preuves convaincantes pour l'héritabilité de l'épilepsie.

En dépit des avancées majeures des techniques d'exploration pangénomique, les épilepsies génétiques n'ont pas encore livré tous leurs secrets. En effet, la plupart des gènes découverts ont été associés aux épilepsies monogéniques qui ne représentent que 1 à 2% de toutes les épilepsies génétiques, et il reste encore beaucoup de formes familiales à hérédité complexe, pour lesquelles les gènes de susceptibilité demeurent inconnus.

Ce travail de thèse a pour objectifs la caractérisation de variants génétiques de vulnérabilité aux épilepsies, ainsi que l'étude des modes de transmission et des relations génotype/phénotype chez des familles Algériennes. Il s'inscrit dans le cadre de la rencontre de trois disciplines : l'épileptologie, l'épidémiologie et la génétique. Chacune à sa manière tentera d'apporter des éléments qui vont contribuer à répondre aux objectifs de cette thèse à travers plusieurs chapitres :

Le premier chapitre rapporte brièvement des données générales sur les épilepsies et sur les avancées dans le domaine de la génétique des épilepsies. Il aborde plus particulièrement les méthodes de recherche en épidémiologie génétique et en génétique moléculaire appliquées à l'épilepsie.

Dans le chapitre II, nous présentons une étude épidémiologique descriptive d'une cohorte de quarante familles multigénérationnelles d'origine Algérienne, comptant plusieurs individus atteints d'épilepsie. Dans cette partie du travail, nous détaillons les méthodes de recrutement et d'évaluation de notre population d'étude, nous présentons une description phénotypique détaillée de notre échantillon, et nous établissons les éventuels modes de transmission à travers l'analyse des *pedigrees*.

Dans le chapitre III, nous présentons une enquête épidémiologique analytique de type cas-témoins, visant à étudier la relation entre la consanguinité et l'épilepsie, à rechercher une agrégation familiale de l'épilepsie, et à identifier les éventuels facteurs de risque associés à l'épilepsie. L'analyse multivariée par régression logistique a retenu cinq variables significativement associées à l'épilepsie dans le modèle final: la consanguinité parentale au premier degré ($p=0.029$), une histoire familiale d'épilepsie chez un apparenté au premier degré ($p<10^{-4}$), des antécédents de convulsions fébriles

($p=0.005$), de traumatisme crânien sévère ($p=0.020$), et la déficience intellectuelle ($p=0.006$).

Dans le chapitre IV, nous rapportons une famille avec des jumeaux monozygotes atteints d'épilepsie du lobe temporal. Le séquençage exomique a identifié une mutation *de novo* (p.A39E) dans le gène *GAL* codant pour le neuropeptide galanine. Le rôle de ce dernier dans la régulation du processus d'épileptogénèse a été démontré il y a plus de deux décennies sur des modèles animaux, mais à ce jour, aucune mutation *GAL* en rapport avec un phénotype épileptique n'avait été décrite chez l'Homme. Nous avons complété l'étude génétique par des analyses *in silico* qui ont confirmé l'hypothèse de causalité de la mutation identifiée, et corrélé le génotype au phénotype dans cette famille.

Dans le chapitre V, nous rapportons une famille comportant deux frères au phénotype d'épilepsie du lobe temporal et comorbidités psychiatriques. Le séquençage exomique a identifié un polymorphisme du gène *RELN* (rs55689103), dont les mutations ont déjà été associées à l'épilepsie et à la schizophrénie.

Dans le chapitre VI, nous rapportons deux familles consanguines comportant six individus au phénotype d'épilepsie myoclonique progressive de type 1. L'étude génétique par Southern Blot a mis en évidence une expansion du dodécamère CCCCCCCCCGCG dans le gène *EPM1*.

Dans le chapitre VII, nous nous intéressons à la recherche de variations du nombre de copies d'ADN (CNV) chez deux familles d'origine Algérienne dont le phénotype primaire est l'épilepsie. L'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN (*CGH-array*) a mis en évidence six CNV dont deux semblent conforter la corrélation génotype/phénotype.

Le dernier chapitre intitulé « Conclusion générale et perspectives » résumera les résultats les plus pertinents de ce cette thèse, et proposera des perspectives de recherche dans le domaine de la génétique des épilepsies en Algérie.

Enfin, nous rapportons en annexes quatre publications inhérentes à ce travail de thèse, le questionnaire qui nous a servi à collecter les données, et les formulaires de consentement.

Mots clés : épilepsie, épidémiologie, génétique, consanguinité, phénotype, pedigree, polymorphisme, mutation, CNV, *CGH-array*, séquençage exomique.

Preface

A genetic component to epilepsy has been recognized since Antiquity and is well established through twin and familial aggregation studies, which provide convincing evidence for the heritability of epilepsy. Despite major advances in genetic studies, genetic epilepsies have not yet revealed all their secrets. Indeed, most of gene discoveries concerned monogenic epilepsies that account for only 1 to 2% of genetic epilepsies, and there are still several familial multifactorial and polygenic forms where susceptibility genes remain unknown.

This project aims to identify genetic variants of epilepsy, to document the genotype/phenotype correlations and inheritance patterns in multigenerational Algerian families. This falls within the framework of the meeting of three disciplines: epilepsy, epidemiology and genetics. Each in its own way will attempt to provide elements that will contribute to meet the objectives of this thesis through several chapters:

The first chapter briefly relates general data on epilepsy and recent advances in the field of epilepsy genetics. It tackles particularly the research methods in genetic epidemiology and molecular genetics applied to epilepsy.

In Chapter II, we provide a descriptive epidemiological study of forty multigenerational families of Algerian ancestry, with several individuals suffering from epilepsy. In this section, we detail family recruitment and clinical evaluation of our study population; we document the clinical characteristics and inheritance patterns of epilepsy through pedigree analysis.

In Chapter III, we report an analytical epidemiological case-control study, which aims to assess the relationship between inbreeding and epilepsy, to seek a familial aggregation of epilepsy and to identify other risk factors associated with epilepsy in an Algerian-born population. Multivariate logistic regression identified five factors significantly associated with epilepsy: first-degree parental consanguinity ($p=0.029$), history of epilepsy in first-degree relatives ($p<10^{-4}$), antecedent of febrile seizures ($p=0.005$), severe head injury ($p=0.020$) and intellectual disability ($p=0.006$).

In Chapter IV, we studied a family with a pair of monozygotic twins affected by temporal lobe epilepsy. Exome sequencing revealed that both twins carried a novel *de novo* mutation (p.A39E) in the *GAL* gene encoding the galanin neuropeptide. This latter was found to act as a potent anticonvulsant and regulates epileptic seizures in animal models. However, until now its role in human epilepsy was not established. Functional analysis showed evidence that the mutant protein disrupts galanin signalling, and strongly supports *GAL* as the causal gene for the TLE in this family.

In Chapter V, we describe a family with two siblings affected by temporal lobe epilepsy and psychiatric comorbidities. Exome sequencing identified a single nucleotide polymorphism in the *RELN* gene (rs55689103) whose mutations have been associated with epilepsy and schizophrenia.

In Chapter VI, we report two consanguineous families including six affected individuals showing Unverricht-Lundborg phenotype. Genetic studies by Southern blotting showed an expansion of dodecamer CCCC GCCCGCG in *EPM1* gene.

In Chapter VII, we aimed to identify copy number variants (CNV) in two Algerian epileptic families. Comparative Genomic Hybridization analysis (CGH-array) highlighted six CNV, two of which seem to support the genotype/phenotype correlation.

Chapter VIII “General Conclusion” summarizes all findings and provides some research perspectives in the field of epilepsy genetics in Algeria.

Finally, we report as appendices four publications related to this thesis work, the structured questionnaire used to collect data and the consent forms.

Key words: epilepsy, epidemiology, genetics, consanguinity, phenotype, pedigree, polymorphism, mutation, CNV, CGH-array, exome sequencing.

Liste des figures

Figure 1: Tablette babylonienne décrivant l'épilepsie	31
Figure 2: Classification des crises d'épilepsie 2010	38
Figure 3: Classification des épilepsies et syndromes épileptiques 2010	41
Figure 4: Structure de la molécule d'ADN	50
Figure 5: Exemple d'un arbre généalogique	53
Figure 6: Représentation schématique des différentes étapes d'un cycle de PCR.....	63
Figure 7: Principe de la technique CGH-array	64
Figure 8: Séquenceurs de deuxième génération.....	65
Figure 9: Carte géographique de la wilaya d'Oran.....	81
Figure 10: Distribution des 40 probants en fonction de leur syndrome épileptique	87
Figure 11: Pedigrees des familles 1 à 20	91
Figure 12: Pedigrees des familles 21 à 40	92
Figure 13: Carte géographique représentant la répartition du taux de consanguinité dans le monde	104
Figure 14: Répartition des types de crises chez les cas	109
Figure 15: Organisation du gène Galanin/GMAP	122
Figure 16: Protocole d'analyse de liaison des récepteurs Gal par la méthode de déplacement	127
Figure 17: Pedigree de la famille EPI-ORA-AFF.....	129
Figure 18: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-AFF-II-03	131
Figure 19: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-AFF-II-04	132
Figure 20: Résultats du séquençage par la méthode Sanger.....	135
Figure 21: Résultats de l'étude de liaison aux récepteurs galanine	137
Figure 22: Inhibition de la stimulation de hGal (WT) par le peptide hGal (A39E)	138
Figure 23: Production de Phosphates Inositols dans les cellules CHO exprimant hGalR2.....	139
Figure 24: Production de Phosphates Inositols dans les cellules CHO exprimant hGalR2.....	140
Figure 25: Alignement des séquences d'acides aminés prédites du peptide galanine	141
Figure 26: Pedigree de la famille EPI-ORA-SIA	153
Figure 27: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-SIA-II-02.....	154
Figure 28: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-SIA-II-03.....	156
Figure 29: Chromatographe de la séquence du gène RELN chez les membres de la famille EPI-ORA-SIA.....	160
Figure 30: Position du gène RELN en 7q22.....	163
Figure 31: Pedigree de la famille EPI-ORA-BEL.....	176
Figure 32 a et b: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-BEL-II-08.....	178
Figure 33 a et b: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-BEL-II-07	180
Figure 34: Pedigree de la famille EPI-ORA-BER.....	182
Figure 35: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-BER-II-01.....	183
Figure 36: Tracé de l'individu EPI-ORA-BER-II-06.....	184
Figure 37: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-BER-II-07.....	185
Figure 38: Résultats de l'analyse par Southern Blot	190
Figure 39: Structure de la protéine CSTB humaine	190
Figure 40: Pedigree de la famille EPI-ORA-FEL	199
Figure 41: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-FEL-I-06.....	200
Figure 42: IRM cérébro-médullaire de la probante II-06.....	202
Figure 43: Pedigree de la famille EPI-ORA-KHE	205
Figure 44: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-KHE-II-02	206
Figure 45: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-KHE-II-06	207
Figure 46: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-KHE-I-02.....	208
Figure 47: Représentation graphique du segment dupliqué 7q21.12	209
Figure 48: Région dupliquée en 7q21.12 sur UCSC	210
Figure 49: Résultats de l'analyse par CGH-array chez l'individu EPI-ORA-KHE-I-02	211
Figure 50: Représentation graphique du gène localisé dans le segment délété 20q13.13.....	212
Figure 51: Résultats de l'analyse par CGH-array chez l'individu EPI-ORA-KHE-II-02	213
Figure 52: Représentation graphique des gènes localisés dans le segment dupliqué Xp11.22	214
Figure 53: Représentation graphique des gènes localisés dans le segment délété 8p23.1	215
Figure 54: Représentation graphique du gène localisé dans le segment délété 13q12.13.....	216
Figure 55: Représentation graphique des gènes localisés dans le segment dupliqué 22q11.21	217
Figure 56: Représentation graphique de la région délétée 20q13.13 sur UCSC.....	224

Figure 57: Variants du gène <i>CEBPB</i> répertoriés dans DGV	224
Figure 58: Représentation graphique des micro-ARN de la région dupliquée Xp11.22 sur UCSC	225
Figure 59: Représentation graphique du gène <i>NFKBIA</i> dans la région délétée 14q13.2 sur UCSC.....	227
Figure 60: Représentation graphique du gène <i>AMER2</i> dans la région délétée 13q12.13 sur UCSC.....	228

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques cliniques et génétiques des épilepsies généralisées idiopathiques	42
Tableau 2: Caractéristiques de l'épilepsie frontale nocturne AD et de l'épilepsie temporale latérale AD.....	43
Tableau 3: Caractéristiques des autres formes familiales d'épilepsies partielles idiopathiques	44
Tableau 4: Caractéristiques des formes familiales d'épilepsies partielles idiopathiques du nourrisson.	45
Tableau 5: Caractéristiques génétiques des différentes épilepsies myocloniques progressives	46
Tableau 6: Caractéristiques des anomalies corticales d'origine génétique	46
Tableau 7: Gènes identifiés par analyses de liaison.....	57
Tableau 8: Bases de données disponibles sur Internet	67
Tableau 9: Caractéristiques électrocliniques et modes de transmission de l'épilepsie chez les 40 probants. ..	89
Tableau 10: Classification syndromique des cas et évolution sous traitement	107
Tableau 11: Résultats de l'analyse univariée par régression logistique	109
Tableau 12: Résultats de l'analyse multivariée par régression logistique.....	110
Tableau 13: Résultats du séquençage d'exome du trio parents-enfant.....	132
Tableau 14: Liste des variants de novo validés.....	133
Tableau 15: Autres variants identifiés dans la famille EPI-ORA-AFF.....	134
Tableau 16: Valeurs Ki de hGal(WT) et hGal(A39E) vis-à-vis des récepteurs de la galanine	136
Tableau 17: Implication des récepteurs de galanine dans différentes fonctions	142
Tableau 18: Liste des variants faux-sens et perte de fonction dans le gène GAL, rapportés par ExAC	145
Tableau 19: SNVs identifiés lors du séquençage exonique de la famille EPI-ORA-SIA	158
Tableau 20: SNV identifiés pour le phénotype épileptique.....	159
Tableau 21: SNV identifié pour le phénotype "schizophrénie".....	160
Tableau 22: Critères de distinction entre CNV bénins et pathogènes	218

Liste des annexes

Annexe 1 : Publications en rapport avec la thèse

Annexe 2 : Questionnaire d'investigation de l'épilepsie

Annexe 3 : Formulaires de consentement et copie du journal officiel

Liste des abréviations

% : Pourcentage
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
CF : convulsions fébriles
CGH : Comparative Genomic Hybridization
CNV : Copy Number Variation
CSTB : Cystatine B
DGV : Database of Genomic Variants
DIGS : Diagnostic Interview for Genetic Studies
DL : Déséquilibre de liaison
EAE : Epilepsie absence de l'enfant
EEG : Electroencéphalographie
EGCF+ : Epilepsie génétique avec convulsions fébriles Plus
EGG : Epilepsie généralisée génétique
ELT : Epilepsie du lobe temporal
EMJ : Epilepsie myoclonique juvénile
EMP1 : Epilepsie myoclonique progressive de type 1
ENMG : Electroneuromyographie
GABA : L'acide γ -aminobutyrique
GAL : Galanine
GWAS : Genome-wide association study
HPN : hyperpnée
IRM : imagerie par résonance magnétique
LICE : ligue internationale contre l'épilepsie
MAF : Minor Allele Frequency
NGS : Next Generation Sequencing
OMIM : Online Mendelian Inheritance In Man
pb : paires de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
PPO : polypointes ondes
PO : pointes ondes
PSH : paraplégie spastique héréditaire
RM : retard mental
Rs : référence SNP
SLI : stimulation lumineuse intermittente
SNC : système nerveux central
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SNV : Single Nucleotide Variant
SUDEP : Sudden Unexpected Death in Epilepsy
TCG : tonicoclonique généralisée
TAD : transmission autosomique dominante
TAR : transmission autosomique récessive
UCSC : University of California, Santa Cruz
WES : Whole Exome Sequencing

Nomenclature :

- Les gènes sont indiqués en italique
- Les protéines produites par ces gènes sont indiquées en lettres droites

CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Définition de l'épilepsie

L'épilepsie a longtemps été définie comme une affection neurologique chronique, caractérisée par la récurrence de crises épileptiques paroxystiques, résultant d'une activité hyper-synchrone et anormale d'une population neuronale cérébrale [1]. Une autre définition alternative conceptuelle a été proposée par Fisher en 2005 :

« L'épilepsie est un trouble cérébral caractérisé par une prédisposition durable à générer des crises épileptiques et par les conséquences neurobiologiques, cognitives, psychologiques et sociales de cette affection. La définition de l'épilepsie requiert la survenue d'au moins une crise d'épilepsie » [2].

L'introduction de cette définition a suscité un large débat. En effet, le terme « trouble » implique une perturbation fonctionnelle pas nécessairement durable, alors que le terme « maladie » désigne plutôt un dérèglement durable. De même, la vraisemblable « prédisposition durable à générer des crises » sur laquelle repose cette définition est difficile à évaluer et nécessite pour être mise en œuvre de disposer d'examens complémentaires attestant de l'augmentation du risque de récurrence [3-5].

A des fins de diagnostic clinique, la ligue internationale contre l'épilepsie (LICE) a chargé un groupe de travail de formuler une définition opérationnelle de l'épilepsie. Ainsi, l'épilepsie peut aussi être considérée comme présente après une seule crise non provoquée chez les patients présentant d'autres facteurs associés à une forte probabilité d'abaissement permanent du seuil épileptogène, et donc un risque de récurrence élevé. Ce risque doit être équivalent au risque de survenue d'une troisième crise chez les patients ayant déjà eu deux crises non provoquées, soit d'au moins 60 % environ [6]. Ce dernier niveau de risque est observé en présence de lésions structurales anciennes, de diagnostic d'un syndrome épileptique spécifique ou, dans certains cas, d'autres facteurs de risque.

Les patients présentant des crises épileptiques réflexes (par exemple photosensibles), sont également considérés comme épileptiques. L'épilepsie n'est pas toujours une affection à vie : elle est considérée comme étant résolue chez les patients qui n'ont pas eu de crise au cours des dix dernières années sans avoir pris de traitement

antiépileptique depuis au moins 5 ans, et chez ceux qui ont dépassé l'âge auquel un syndrome épileptique âge-dépendant est applicable.

Cette définition est plus complexe que l'ancienne. Les études apportant des connaissances détaillées sur le risque de récurrence des crises étant rares, la plupart des diagnostics d'épilepsie devront continuer à être posés sur la base de la documentation de deux crises non provoquées. L'application des définitions de l'épilepsie gagnera en précision et en utilité au fur et à mesure de l'augmentation des connaissances sur le risque de récurrence en fonction des étiologies spécifiques [7].

En 2016, Berg a proposé une autre définition de l'épilepsie tenant compte de l'avalanche de l'information génétique, structurelle et fonctionnelle : « *Il est devenu très évident que ce que nous appelons les épilepsies sont en fait des désordres neurologiques complexes, parfois même multisystémiques, pouvant impliquer des dysfonctionnements cognitifs, comportementaux, moteurs, autonomes, des troubles du sommeil, et bien d'autres déficiences systémiques. Les crises sont souvent une facette éminente de ces désordres, mais ne constituent pas à elles seules des troubles* » [8].

2. Historique de l'épilepsie

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 « attaquer par surprise » [9].

Le plus ancien de tous les documents traitant de l'épilepsie est une tablette babylonienne qui se trouve au British Muséum (**Figure 1**). Il s'agit d'un chapitre d'un manuel de médecine babylonien comportant 40 tablettes qui datent d'au moins 2000 ans avant Jésus-Christ. On y trouve une description précise de bon nombre des différents types de crises actuellement reconnus [10].

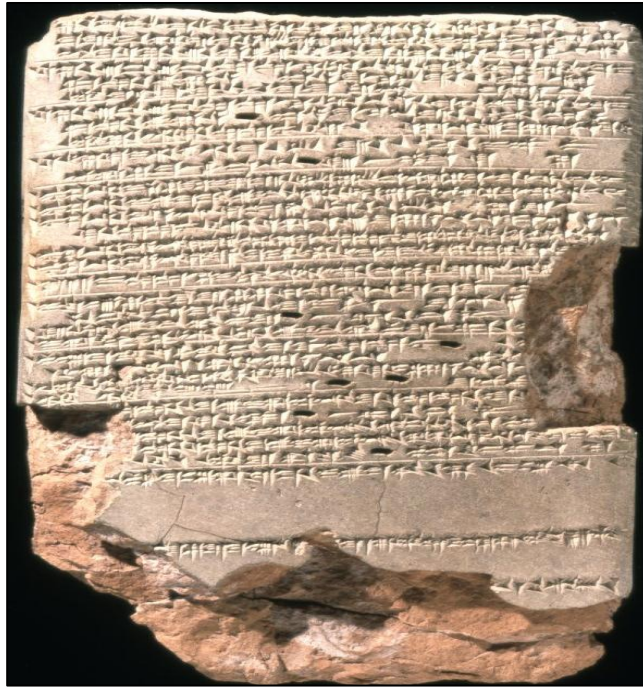


Figure 1: Tablette babylonienne décrivant l'épilepsie [10]

Pendant longtemps les épileptiques ont suscité la crainte, la suspicion et l'incompréhension, et ont été rejetés par la société. Ils étaient traités comme des parias et punis. Pourtant, certains ont réussi et sont devenus célèbres. Parmi eux, Jules César, Nobel, Napoléon, le Tsar de Russie Pierre le Grand, le Pape Pie IX, les écrivains Féodor Dostoïevski et Gustave Flaubert, le poète Lord Byron et bien d'autres [11]. En 1770, Samuel Auguste David Tissot publie son traité de l'épilepsie, qui fut une des premières approches scientifiques de la pathologie : « *Pour produire l'épilepsie, il faut nécessairement deux choses. Une disposition du cerveau à entrer en contraction plus aisément qu'en santé, et une cause d'irritation qui met en action cette disposition* » [12]. Cette citation issue de son traité ouvrira la porte à de nombreuses avancées dans le domaine.

Au dix-neuvième siècle, avec les débuts de la neurologie qui commençait à s'imposer en tant que nouvelle discipline distincte de la psychiatrie, l'idée que l'épilepsie était un dérèglement cérébral a commencé à se répandre, notamment en Europe et aux Etats-Unis. Ainsi, en 1815 Jean-Etienne Esquirol distingue les attaques légères des attaques sévères, qu'il définit respectivement comme *petit mal* et *grand mal* ; quatre décennies plus tard (1857), l'efficacité des bromures comme traitement contre l'épilepsie est découverte par Sir Charles Locock [13].

En 1873, alors que l'électroencéphalographie (EEG) n'est pas encore près de voir le jour, John Hughlings Jackson émet l'hypothèse que ce sont de brutales décharges électriques qui sont à l'origine de la maladie. Selon leur emplacement, celles-ci définissent le caractère de la crise [14]. Puis en 1920, le psychiatre Allemand Hans Berger invente l'EEG qui ne sera capable de détecter un signal d'activité cérébrale que neuf ans plus tard. L'EEG a ainsi permis de développer des possibilités de traitements neurochirurgicaux qui sont devenus beaucoup plus courants à partir des années cinquante. De plus, c'est au vingtième siècle que les premiers réels espoirs thérapeutiques ont émergé grâce à l'avènement des barbituriques.

3. Epidémiologie de l'épilepsie

L'épilepsie est une pathologie neurologique chronique ubiquitaire. Elle affecte les enfants et les adultes, quel que soit leur sexe, leur âge, leur ethnie, leur religion, leur patrimoine génétique et leur classe sociale [15, 16]. Sa distribution n'est toutefois pas homogène. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que le nombre de sujets épileptiques à travers le monde est d'environ 50 millions et que près de 80% d'entre eux vivent dans des pays en voie de développement [17]. Il s'agit d'un véritable problème de santé publique qui altère de façon significative la qualité de vie des patients [18-20].

3.1. Incidence

L'incidence annuelle de l'épilepsie est de 50 nouveaux cas pour 100.000 habitants/an dans les pays industrialisés, tandis que dans les pays en voie de développement, ce chiffre est plus important, allant de 100 à 190 nouveaux cas pour 100.000 habitants/an [21]. Les principales raisons de cette différence d'incidence sont le risque plus élevé d'infections cérébrales (neurocysticercose, méningite, paludisme), les complications obstétricales et la malnutrition [22]. Dans le monde Arabe, l'incidence moyenne de l'épilepsie a été estimée à travers une étude récente à 56 nouveaux cas/100.000h/an [23]. En Algérie, très peu d'études épidémiologiques concernant l'épilepsie ont été publiées, et une seule étude d'incidence a été menée en 1978 dans le cadre d'un travail de thèse. En comptabilisant les nouveaux cas d'épilepsie vus durant l'année 1978 dans les centres neurologiques, pédiatriques et psychiatriques à Alger,

l'auteur a recensé 1.117 cas pour l'année en question, et pour les 1.998.000 habitants de la wilaya d'Alger au 01.01.1978; d'où une incidence de 55.9 pour 100.000 habitants [24]. Cette incidence est très proche de l'incidence moyenne dans le monde arabe [23].

3.2. Prévalence

La prévalence moyenne de l'épilepsie, d'après de nombreuses études effectuées dans le monde, est estimée à environ 8.2 pour 1000 dans l'ensemble de la population [25-27]. Toutefois, il peut s'agir là d'une sous-estimation, car certaines études menées dans des pays en voie de développement (Colombie, Equateur, Inde, Libéria, Nigéria, Panama, République Unie de Tanzanie et Venezuela) suggèrent une prévalence plus élevée, supérieure à 10 pour 1000 [28-30]. En Algérie, une étude transversale multicentrique a été menée en 2012, dans le but de déterminer la prévalence nationale de l'épilepsie. Cette étude a inclus 8.046 sujets âgés de plus de deux mois, répartis sur cinq régions du pays (Alger, Sétif, Sidi Belabes, El Oued et Laghouat). Soixante-sept patients ont été identifiés comme ayant une épilepsie active, donnant un ratio brut de prévalence de 8.32 pour 1000 (IC 95% : 6.34-10.3) et un ratio ajusté sur l'âge de 8.9 pour 1000. Le ratio le plus élevé (16.92 pour 1000) a été noté dans la tranche d'âge 10-19 ans [31].

3.3. Mortalité

Les patients souffrant d'épilepsie ont un taux de mortalité 2 à 3 fois supérieur à celui de la population générale [32-36]. Cette surmortalité est essentiellement notée chez les patients souffrant d'une épilepsie partielle pharmacorésistante où le Ratio standardisé de mortalité (RSM) est 5 fois supérieur à celui de la population générale [37]. La moitié des décès affectant cette population est directement liée à la survenue de crises d'épilepsie, par le biais d'accidents, d'états de mal épileptiques ou de morts soudaines inattendues (*Sudden unexpected death in epilepsy*, SUDEP) [38]. La fréquence des décès par SUDEP a été évaluée à 0.35 pour 1000 personne-année dans une population de sujets épileptiques non sélectionnés [39]. Chez les patients atteints d'épilepsie réfractaire, le risque annuel de SUDEP est estimé à 0.4% [40]. Ce risque augmente avec la fréquence des crises tonico-cloniques généralisées, l'absence de traitement antiépileptique reflétant une mauvaise observance ou au contraire, la prise d'une polythérapie, témoin indirect de la sévérité de la maladie, un âge de début précoce

ou une durée prolongée de l'épilepsie [38, 41-44]. Par ailleurs, les données classiques considèrent qu'environ 10% des décès dans l'épilepsie peuvent être rapportés à un suicide [45], que le taux de suicide est cinq fois supérieur chez les personnes épileptiques comparé à la population générale [46] et qu'il pourrait être multiplié par 25 dans les suites d'une chirurgie de l'épilepsie [47].

3.4. Facteurs de risque

En dépit des nouvelles techniques d'exploration, l'étiologie des épilepsies demeure inconnue dans près de 2/3 des cas [21]. Au cours des trois dernières décades, plusieurs études cas-témoins visant à identifier les facteurs de risque associés à l'épilepsie ont été menées [28, 48-50]. Bien que ces études aient identifié une série de facteurs, les résultats étaient très hétérogènes allant des complications périnatales aux traumatismes crâniens, en passant par les accidents vasculaires cérébraux, les tumeurs cérébrales et les infections du système nerveux central [51, 52]. Cette grande hétérogénéité des résultats couplée à l'absence d'études propres à la population Algérienne, nous a incités à mener une étude épidémiologique visant à identifier les facteurs de risque associés à l'épilepsie dans une population de l'ouest Algérien [53]. Nous aborderons cette étude dans le chapitre III de ce document.

4. Physiopathologie de l'épilepsie

4.1. Modèles animaux

Afin d'élucider les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent l'épilepsie, plusieurs modèles animaux sont utilisés depuis les années nonante. Ainsi, une crise convulsive peut être provoquée chez de jeunes rats par une hyperthermie pendant 30 minutes, modélisant une convulsion fébrile [54]. Chez certains rats du même modèle, des crises focales peuvent être observées à l'âge adulte [55].

Par ailleurs, un état de mal épileptique peut être provoqué par l'injection intra-péritonéale de pilocarpine, un agoniste des récepteurs muscariniques ou celle de kainate, un agoniste des récepteurs glutamatergiques [56]. Quelques semaines plus tard, les animaux présentent des crises convulsives spontanées récurrentes et des lésions dans l'hippocampe et d'autres structures limbiques qui évoquent une sclérose

hippocampique, constituant ainsi des modèles d'épilepsie méso-temporale [57].

Enfin, certains animaux sont porteurs de mutations génétiques qui les rendent épileptiques. C'est le cas des GAERS¹ découverts à Strasbourg en 1982, et qui présentent des crises caractérisées par un arrêt du comportement et la survenue de décharges de pointe-onde sur l'EEG, compatibles avec un modèle d'épilepsie absence [58].

4.2. Mécanismes des crises

Durant la crise, les neurones se mettent à décharger un potentiel d'action (PA) de façon synchrone à haute fréquence. Ce PA est déchargé si le potentiel de membrane atteint une valeur seuil, qui correspond à l'ouverture des canaux ioniques laissant entrer le sodium. Cette valeur seuil est atteinte si la somme des entrées synaptiques excitatrices dépolarisantes, dépasse celle des entrées inhibitrices hyperpolarisantes.

A partir de ce schéma simpliste, trois hypothèses majeures ont émergé : l'épilepsie serait due à une diminution de l'inhibition par l'acide gamma aminobutyrique (GABA), à une augmentation de l'excitation par le glutamate, et/ou à une modification des propriétés cellulaires (canalopathies) [59]. La majorité des antiépileptiques prétendent agir sur ces processus [60].

4.3. Mécanismes de l'épileptogénèse

4.3.1. Rôle de la barrière hémato-encéphalique

Les modèles animaux ont démontré qu'une agression initiale du tissu cérébral était associée à une réponse inflammatoire dans les réseaux neuronaux par rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) [61, 62]. Il en résulte un afflux d'albumine dans le tissu neuronal avec constitution d'un foyer épileptogène dans le cortex [63]. En effet, l'albumine est transportée dans les astrocytes, ce qui va altérer leur fonctionnement, en particulier leur capacité à pomper le glutamate et le potassium, dont l'accumulation dans le milieu extracellulaire va dépolariser les neurones, les faire décharger des PA et favoriser la survenue des crises [64].

¹*Genetic absence epilepsy rat from Strasbourg.*

4.3.2. Réactions inflammatoires

La rupture de la BHE déclenche une réaction inflammatoire via la libération d'interleukine 1b, une cytokine impliquée dans la défense immunitaire contre l'infection, et produite par les macrophages, monocytes, fibroblastes et les cellules dendritiques, entraînant une souffrance neuronale [65]. En effet, les cellules en souffrance sécrètent une protéine appelée *high-mobility group box-1* (HMGB1) qui va se fixer sur les récepteurs de type *Toll-like receptor 4* (TLR4) situés sur les neurones, les astrocytes et les cellules immunitaires telles que les microglies [66]. L'activation des récepteurs TLR4 entraîne la libération de facteurs inflammatoires comme l'interleukine 1b. Cette dernière va agir sur les récepteurs au glutamate et augmenter l'excitabilité neuronale [67]. De plus, il a été démontré que le blocage pharmacologique de HMGB1 ou de TLR4 diminuait la sévérité des crises [68].

4.3.3. Modifications des gènes

L'agression initiale est à l'origine d'une modification de l'expression des gènes qui codent pour des protéines exprimées dans le tissu cérébral. Ces modifications vont altérer le mode de fonctionnement des circuits neuronaux aboutissant au processus d'épileptogénèse. C'est par exemple le cas du gène *Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha-1H subunit* (*CACNA1H Cav3.2*) qui code pour une sous-unité d'un canal calcique² et qui est surexprimée de façon transitoire juste après l'agression initiale [69-71]. En effet, les gènes possèdent une région promotrice, avec des sites sur lesquels peuvent se fixer différents facteurs de transcription, qui peuvent aboutir à l'expression ou non d'un gène. Les études expérimentales s'intéressent actuellement au *Neuron Restricting Silencing Factor* (NRSF) qui a la capacité de contrôler 1800 gènes, et qui se trouve surexprimé après un état de mal épileptique [72]. Cependant, les mécanismes responsables de la surexpression de NRSF ne sont pas encore élucidés [73].

²Une protéine située dans la membrane des cellules dont l'ouverture permet l'entrée de calcium.

5. Classification des crises d'épilepsie

5.1. Les crises généralisées

Une crise épileptique est dite généralisée (CG) lorsque la désorganisation critique intéresse des aires corticales et sous-corticales étendues et bilatérales pouvant être asymétriques [74]. Dans la classification des crises épileptiques établie par la LICE, plus de dix types différents de crises généralisées sont individualisés. Bien que soumise à des réévaluations régulières par la Commission de Recherche de la LICE, cette classification reste d'actualité (**Figure 2**), de même que la classification des syndromes épileptiques [75, 76]. Le point commun entre les différents types de CG est l'existence d'une altération de la conscience et du contact, d'intensité variable. On différencie les CG non convulsives (absences) des CG convulsives, qui comportent des manifestations motrices bilatérales qui peuvent être tonico-cloniques, myocloniques, cloniques, toniques ou atoniques.

5.2. Les crises focales

Les crises focales possèdent toutes un point commun: l'apparition de décharges épileptiques dans une partie limitée du cortex cérébral. L'origine de ces décharges est fréquemment liée à une population de neurones inclus dans une région corticale appelée *zone épileptogène*. Actuellement, la distinction entre les différents types de crises focales a été abandonnée (partielle complexe ou partielle simple). Il est important toutefois de reconnaître que l'état de conscience, la localisation et la progression des symptômes critiques peuvent être d'une importance primordiale dans l'évaluation de chaque patient et pour diverses raisons spécifiques (diagnostic différentiel entre événements non-épileptiques et crises épileptiques, essais cliniques, chirurgie). Aucun élément de cette recommandation n'empêche de décrire les crises focales en fonction de ces caractéristiques [74].

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

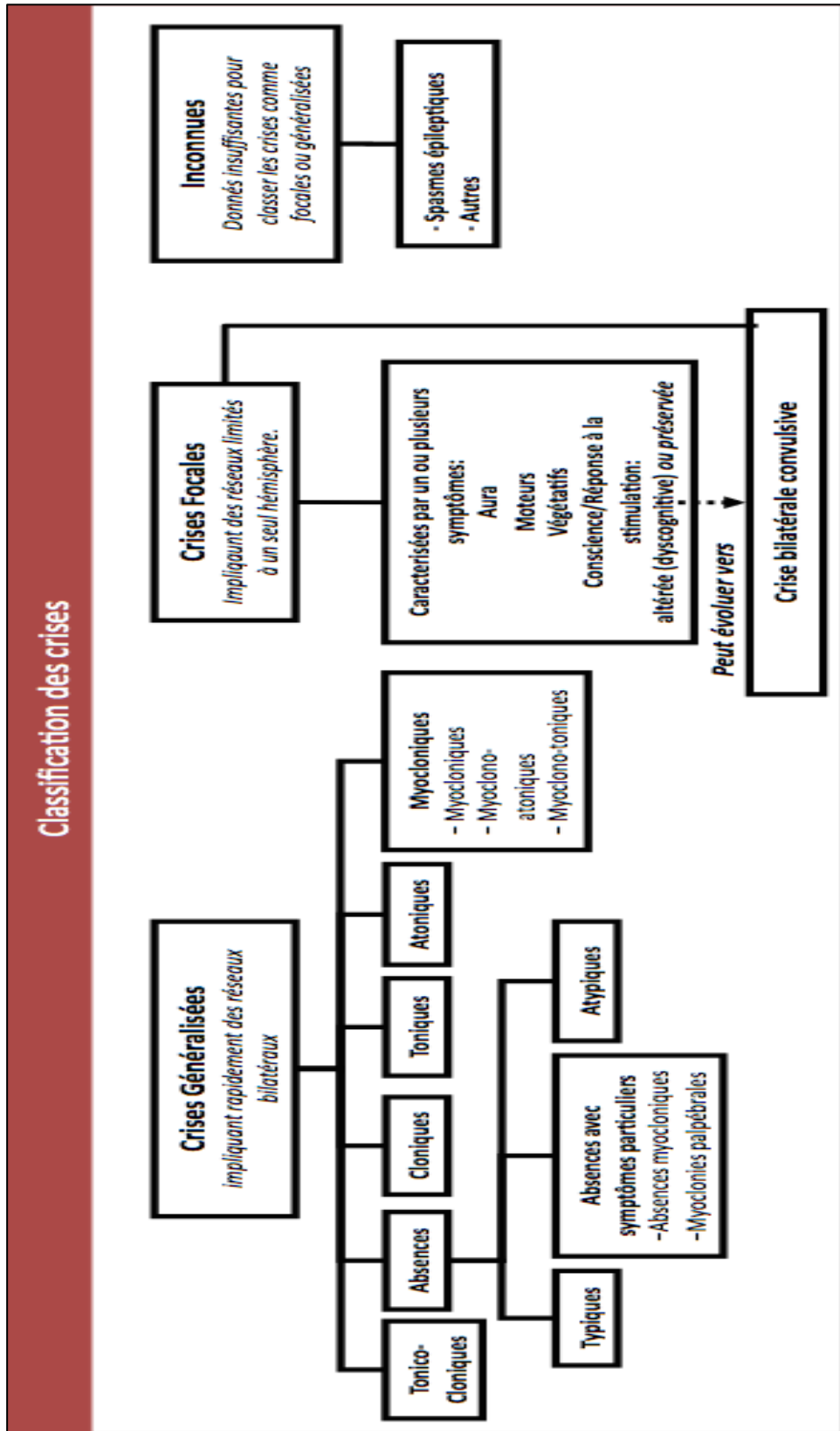


Figure 2: Classification des crises d'épilepsie 2010 (www.lfce.fr)

6. Classification des épilepsies et des syndromes épileptiques

Un syndrome épileptique est un ensemble cohérent identifié par une constellation de plusieurs éléments : le type des crises, l'âge du patient lors des premières crises, les anomalies électroencéphalographiques, l'étiologie, les circonstances des crises, et parfois d'autres détails. Prise isolément, chacune de ces caractéristiques n'a pas de grande signification. Ensemble, elles réalisent un tableau spécifique dont l'identification peut améliorer la prise en charge des patients [77]. En effet, la mise en évidence d'un syndrome épileptique peut influencer l'évaluation et le traitement du patient, et fournir des informations quant à son devenir probable. En outre, la connaissance des syndromes spécifiques facilite la recherche étiologique et thérapeutique.

Avant le concept de syndrome, l'épilepsie était considérée comme une seule affection pouvant se présenter sous différentes formes. La nature de la crise constituait l'élément pris en considération pour porter un diagnostic et instaurer un traitement. Ainsi, les premières classifications des épilepsies ne faisaient pas de distinctions entre les crises et les syndromes épileptiques, et 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 [78]. La première version officielle de la classification internationale des épilepsies et des syndromes épileptiques a été publiée en 1970 dans *Epilepsia*, la revue de la LICE [79], suivie en 1985 d'une autre version révisée et plus détaillée [80]. Cette classification a été réalisée dans le contexte d'un désir exprimé par l'OMS d'avoir un langage commun pour décrire les phénomènes épileptiques et d'avoir un système diagnostique standardisé et utilisé universellement. La classification actuelle des épilepsies et syndromes épileptiques date de 1989 [76], et a été révisée par la LICE lors du mandat 2005-2009, étant donné que la précédente était basée sur des concepts qui précédaient la neuro-imagerie moderne, la génomique et la biologie moléculaire [74]. Les termes « *génétique* », « *structurelle-métabolique* » et « *de cause inconnue* » sont une évolution des concepts remplaçant idiopathique, symptomatique et cryptogénique respectivement (**Figure3**).

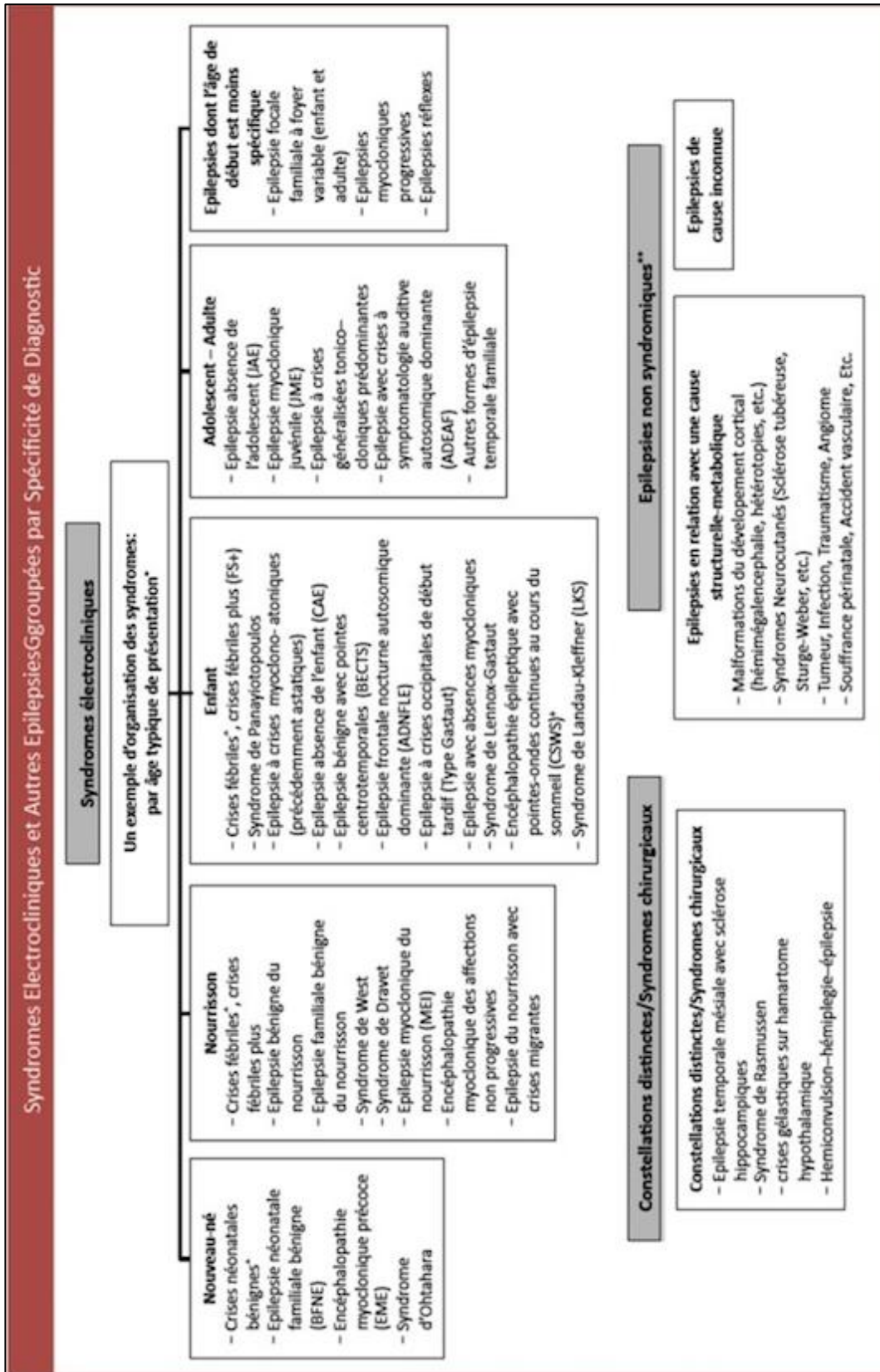


Figure 3: Classification des épilepsies et des syndromes épileptiques 2010

6.1. Les épilepsies génétiques

Le concept d'épilepsie génétique signifie que « *l'épilepsie est, au mieux de notre compréhension, la conséquence directe d'un défaut génétique connu ou présumé dont les crises sont la manifestation principale. Les connaissances concernant les contributions génétiques peuvent provenir d'études génétiques moléculaires spécifiques, reproductibles, parfois même devenues la base pour des tests diagnostiques ou de données démontrant le rôle central d'un facteur génétique* » [74]. Désigner la nature fondamentale du trouble en tant que génétique n'exclut *pas* la possibilité d'une contribution de facteurs environnementaux dans l'expression de la maladie. A l'heure actuelle, il n'existe en pratique aucune donnée soutenant l'influence spécifique de facteurs environnementaux en tant que causes, ou facteurs contributifs à ces formes d'épilepsie.

Grâce au développement d'outils de recherche en génétique, ces dernières années ont connu l'émergence de plusieurs syndromes épileptiques d'ordre génétique. Certains sont attribués à des anomalies génétiques clairement établies (mutations, remaniements chromosomiques) alors que d'autres ont été liés à des loci de susceptibilité et attendent toujours l'identification du gène causal. **Les tableaux 1-6** résument l'ensemble des données cliniques et génétiques concernant ces différents syndromes épileptiques.

Tableau 1: Caractéristiques génétiques des formes familiales d'épilepsies généralisées idiopathiques [81]

Pathologies familiales	Mode de transmission	Gènes et loci
Convulsions néonatales familiales bénignes	AD	Gènes de canaux potassiques voltage-dépendants : Le plus souvent <i>KCNQ2</i> (20q13) Rarement <i>KCNQ3</i> (8q24) Autre locus suspecté sur le chromosome 5
EGI hétérogènes	AD	Gène <i>CLCN2</i> (3q36) du canal chlore voltage-dépendant <i>ClC2</i>
EMJ familiales pures	AD	Gène <i>GABRA1</i> (5q34) de la sous-unité alpha-1 du récepteur GABAA Gène <i>EFHC1</i> (6p12) de la myoclonine-1
Épilepsies-absences	Rares cas sporadiques ou familiaux	Gène <i>CACNA1A</i> (19p) de la sous-unité alpha-1 du canal calcique de type P/Q
Épilepsie myoclonique bénigne de l'adulte ou tremblement myoclonique cortical familial avec épilepsie	AD	8q23 (gène NI) 2p11 (gène NI) Autre locus suspecté

Tableau 2: Caractéristiques génétiques de l'épilepsie frontale nocturne AD et de l'épilepsie temporale latérale AD [81]

Pathologies familiales	Gènes et loci
Épilepsie frontale nocturne autosomique dominante (pénétrance variable selon les mutations : 29 %-100 %)	Gènes de sous-unités du Rr nicotinique neuronal à l'Ach : CHRNA4 (20q13.2), CHRNB2 (chs1), CHRNA2 (8p12.3-q12.3) Locus en 15q 24 (gène NI)
Épilepsie temporale latérale autosomique dominante (pénétrance de 60 %-70 %)	LGI1 (gène de l'épitempine) (10q22-24) Autre locus recherché (seulement 30 %-50 % des familles liées à LGI1)

Tableau 3: Caractéristiques génétiques des autres formes familiales d'épilepsies partielles idiopathiques [81].

Pathologies familiales (mode de transmission)	Gènes et loci
Épilepsie mésiotemporale familiale « bénigne » (AD)	4q13.2-q21.3 (gène NI)
Épilepsie mésiotemporale familiale avec SH (AD)	Locus NI
Épilepsie mésiotemporale familiale avec CF et sans SH (AD)	12q22-q23.3 (gène NI)
Épilepsie partielle familiale à foyer variable (AD, pénétrance de 70 %)	2qter (gène NI) 22q11-12, (gène NI)
Épilepsie rolandique familiale (AD)	15q14 (gène NI)
Épilepsie rolandique avec dyspraxie orale et de la parole (une forme AD avec anticipation et une forme liée à l'X)	Locus NI dans la forme AD Gène <i>SRPX2</i> (Xq22)
Épilepsie rolandique avec dystonie induite par l'exercice et crampe de l'écrivain (AR)	16p12-11.2 (NI) (une famille décrite)

Tableau 4: Caractéristiques cliniques et génétiques des formes familiales d'épilepsies partielles idiopathiques du nourrisson [81].

Pathologies familiales (mode de transmission)	Gènes et loci
Convulsions infantiles familiales bénignes (AD)	19q12-q13.1 (gène NI) 2q24 (gène NI) 16p12-q12 (gène NI)
Syndrome convulsions infantiles et choréoathétose paroxystique (AD)	16p12-q12 (comme dans la forme pure) (gène NI)
Convulsions bénignes familiales néonatales-infantiles (AD)	SCN2A (2q24) (gène de la sous-unité alpha-2 du canal sodique voltage- dépendant)

Tableau 5: Caractéristiques génétiques des différentes épilepsies myocloniques progressives [81].

Mildew	Mode de transmission	Locus
Unverricht-Lundborg	AR	21q22.3 12p11-q13
Lafora	AR	6q24 6p22 Autre locus

Céroïdes lipofuscinoses		
Forme infantile	AR	1p32
Forme infantile tardive	AR	11p15
Forme juvénile	AR	16p12
Forme adulte (maladie de Kufs)	Divers modes de transmission décrits Le plus souvent cas sporadiques	NI
Forme infantile tardive variant finlandais	AR	13q22
Forme infantile tardive variant indo-européen	AR	15q21-23
Forme infantile tardive variant turc et <i>Northern epilepsy</i>	AR	8p23
Sialidose	AR	6p21.3
Galactosialidose	AR	20q13
Encéphalopathie avec inclusions de neuroserpine	AD	3q26
Gaucher type 3	AR	1q21
Forme juvénile de maladie de Huntington	AD	4p16.3
Forme juvénile d'atrophie dentato-rubro-pallido-lusienne	AD	12p13
EMP liée à KCTD7	AR	7q11.2

Tableau 6: Caractéristiques anatomiques et génétiques des anomalies corticales d'origine génétique [81].

Type de malformation corticale	Anomalies cérébrales associées particulières	Gènes impliqués selon le sexe et les anomalies cérébrales associées
Hétérotopie nodulaire périventriculaire		<i>FLNA</i> : surtout F (rarement H) Très rarement gène <i>ARFGEF2</i> duplication 5p15
Lissencéphalies type 1 Agyrie-pachygyrie		H : <i>DCX</i> , <i>LIS1</i> et délétion 17p13.3 F : <i>LIS1</i> et délétion 17p13.3
	Hypoplasie cérébelleuse	Gène <i>RELN</i> ++ <i>LIS1</i> <i>TUBA3</i>
	Atteinte du corps calleux	<i>ARX</i> +++ (H) <i>TUBA3</i>
Double cortex		<i>DCX</i> +++ : surtout F, rarement H <i>LIS1</i> : rarement H <i>TUBA3</i>
Polymicrogyries		<i>GPR56</i> Délétion 22q11

6.2. Les épilepsies structurales/métaboliques

Elles concernent conceptuellement « *une condition ou maladie structurale ou métabolique, pour laquelle il a été démontré l'existence d'une association avec augmentation substantielle du risque de développer une épilepsie par des études rigoureuses. Les lésions structurales incluent évidemment les lésions acquises, telles que les accidents vasculaires cérébraux, les traumatismes et les infections. Elles peuvent aussi être d'origine génétique (sclérose tubéreuse, diverses malformations du développement cortical..)* » [74].

6.3. Les épilepsies de cause inconnue

« Le terme inconnue est utilisé dans le sens de la neutralité et indique que la nature de la cause sous-jacente reste jusque là inconnue ; il pourrait y avoir un facteur génétique causal à l'origine des crises ou il pourrait s'agir de la manifestation d'une anomalie distincte (structurelle- métabolique....) non encore identifiée » [74].

7. Diagnostic différentiel

Le diagnostic d'une épilepsie est relativement aisé. Il repose sur l'interrogatoire du patient et des témoins des crises, ainsi que sur l'évaluation clinico-électroencéphalographique qui devra s'attacher à rassembler les critères qui permettent le diagnostic d'un syndrome épileptique particulier.

Ainsi, les éléments qui plaident en faveur d'une crise TCG sont : la perte de connaissance brutale, l'épisthotonos à la phase tonique qui dure entre 10 et 20 secondes, la durée un peu plus prolongée de la phase clonique (30 secondes), l'émission d'urines, l'hypersalivation, la morsure du bord latéral de la langue, la respiration stertoreuse avec cyanose, et la confusion post-critique.

Par ailleurs, les crises focales sont caractérisées par des manifestations neurologiques qui dépendent du point de départ de la décharge épileptogène. Ce début est plus facile à reconnaître lorsqu'il s'agit d'une aire primaire (hallucinations visuelles, auditives, olfactives, etc.). Certaines crises focales sont suivies d'une confusion post-critique de quelques minutes.

Les principaux diagnostics différentiels sont représentés par les syncopes et lipothymies d'origine cardiaque ou vasogénique qui sont de durée plus courte, précédées de signes d'appel cardiaques tels que les tachycardies, entraînant une chute brutale à l'emporte pièce, avec reprise de conscience rapide. Les clonies, lorsqu'elles sont présentes, sont brèves, d'une durée de quelques secondes. En outre, certaines crises pseudo-épileptiques ou malaises psychogéniques sont parfois très difficiles à distinguer des véritables crises épileptiques. Dans ce cas là, seule la visualisation des crises permet de redresser le diagnostic ; celui-ci repose aussi sur l'existence

d'antécédents psychiatriques, d'évènements psychologiques marquants, les possibles bénéfices secondaires pour le patient, et une sémiologie clinique ne correspondant à aucun cadre nosologique. Parfois, ces crises psychogéniques peuvent se voir chez des individus épileptiques ; l'élément clé du diagnostic étant alors l'enregistrement vidéo-électroencéphalographique.

D'autres causes métaboliques, médicamenteuses et toxiques peuvent engendrer des crises d'épilepsie qui disparaissent après correction du trouble ou sevrage du médicament ou de la substance toxique en question ; d'où l'intérêt d'effectuer un bilan complet devant une crise épileptique inaugurale.

8. Génétique des épilepsies

A partir des années nonante, les progrès en génétique humaine ont été considérables, à tel point que le terme de « révolution » n'est sans doute pas exagéré. Outre la connaissance déjà ancienne de familles avec plusieurs membres présentant des crises d'épilepsie, et une fois la distinction faite entre épilepsies symptomatiques et épilepsies idiopathiques, la part génétique dans les épilepsies idiopathiques est indéniable. Les outils d'analyse génomique, le traitement bioinformatique des résultats et la détermination de la séquence du génome humain qui leur a été concomitante ont permis des avancées majeures dont a grandement bénéficié l'épileptologie génétique [82, 83].

8.1. Concepts de génétique

8.1.1. Définitions élémentaires

- L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une macromolécule biologique présente dans toutes les cellules. Il contient toute l'information génétique, appelée génotype, permettant le développement et le fonctionnement des êtres vivants. Il s'agit d'une double hélice constituée de deux chaînes nucléotidiques entrelacées, antiparallèles et complémentaires appelées brins d'ADN. Chaque brin est formé d'un enchaînement de nucléotides, eux mêmes composés de bases azotées, de sucres et de groupements

phosphate [84]. On retrouve quatre bases azotées différentes dans l'ADN : adénine (A), guanine (G), cytosine (C) et thymine (T). Ces bases se regroupent par paires : A-T, T-A, C-G et G-C grâce à des liaisons d'hydrogène (**Figure 4**). Le rôle principal de l'ADN est la synthèse de protéines via l'acide ribonucléique.

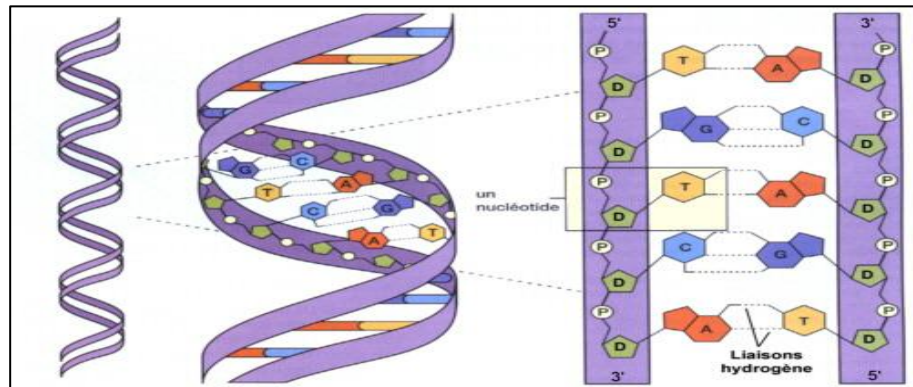


Figure 4: Structure de la molécule d'ADN³

- Un gène est une région chromosomique capable d'engendrer un transcrit fonctionnel. Il contient des régions codantes appelées « exons » et des régions non codantes appelées « introns ». Il est souvent précédé d'une région appelée « promoteur », qui joue un rôle dans la régulation de la transcription de l'ADN en ARN. Chez l'Homme, on estime que le nombre de gènes est compris entre 25.000 et 30.000 [84].

- Le terme « locus » désigne un emplacement précis et invariable sur un chromosome. Il peut faire référence à un gène ou à une séquence quelconque. Un « allèle » désigne l'une des différentes versions sous lesquelles un gène ou un segment d'ADN se présente. Une des mesures de la variabilité génétique d'une population est la fréquence allélique. Ainsi, lorsqu'une mutation est délétère, sa fréquence dans la population sera faible, en partie à cause de la sélection. Par contre, si une variation génétique n'engendre pas de conséquences importantes sur l'expression d'un gène, elle pourra devenir fréquente dans la population. Théoriquement, lorsque la fréquence allélique dans la population est supérieure à 1%, on parle de polymorphisme, et lorsqu'elle est inférieure à 1%, on parle de variant rare. En pratique, on parle souvent de

³ <http://lewebpedagogique.com/Mise> à jour le 01/01/2016

variant ou de polymorphisme indifféremment de leur fréquence. Dans le cas d'un locus bi-allélique, on définit l'allèle le moins fréquent comme étant l'allèle mineur, et sa fréquence comme la fréquence de l'allèle mineur ou *minor allele frequency* (MAF) [85].

- Le génotype correspond à l'ensemble des allèles d'un ou de plusieurs loci dans un organisme. Il détermine les caractères d'un individu constituant le phénotype, et se transmet des parents à leurs descendants [84].

8.1.2. L'arbre généalogique

L'étude de la génétique humaine repose en partie sur l'analyse des arbres généalogiques (*pedigrees*). On appelle arbre généalogique la représentation, sous forme d'un arbre avec ses ramifications, des liens de parenté existant au sein d'une famille. Pour tracer un *pedigree*, certaines normes doivent être respectées : les individus de sexe masculin sont désignés par des carrés, et les individus de sexe féminin le sont par des cercles. Les couples sont reliés par un trait horizontal (ou deux s'ils sont apparentés), à partir duquel un trait vertical va les relier par le biais d'un autre trait horizontal à leur progéniture. Les générations sont numérotées en chiffres romains, et les sujets dans chaque génération sont numérotés en chiffres arabes. Le proposant ou cas-index est désigné par une flèche, et les sujets atteints d'une maladie génétique verront leurs carrés ou cercles colorés (**Figure 5**).

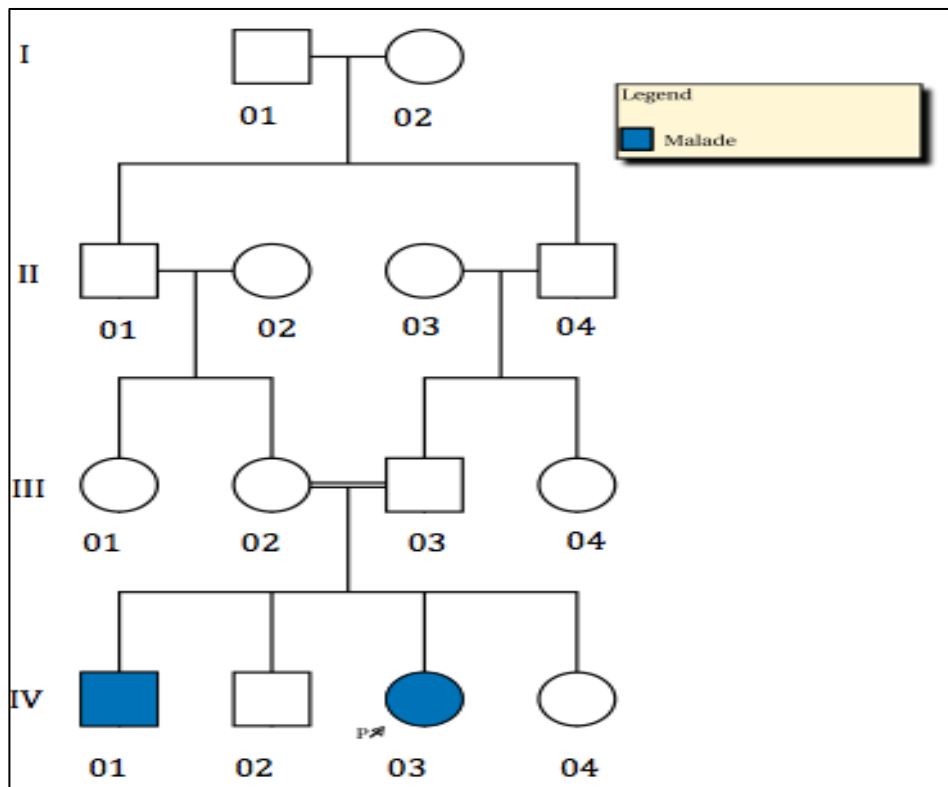


Figure 5: Exemple d'un arbre généalogique

8.1.3. Modes de transmission

Certaines affections sont transmises selon les règles de la génétique mendélienne⁴ qui sont définies comme suit :

- L'anomalie ou mutation contenue dans un gène donné est transmise sur un mode dit *autosomique dominant* lorsque la présence d'un seul allèle morbide est suffisante pour que la maladie s'exprime. L'allèle morbide est transmis par l'un des parents malades avec un risque de 50% à chaque conception. La maladie atteint autant les filles que les garçons et n'épargne aucune génération lorsque la pénétrance est complète.

- L'anomalie est transmise sur un mode dit *autosomique récessif* si le gène en cause est porté par un autosome et si la présence de deux allèles mutés du gène est nécessaire pour l'expression du phénotype. Les malades sont alors homozygotes pour le gène en cause. Là aussi, la maladie affecte autant les garçons que les filles avec

⁴D'après le nom de l'éminent généticien du dix-neuvième siècle, Mendel.

cependant, un saut de générations.

- Des maladies très rares, peuvent se transmettre par le matériel génétique qui n'est pas contenu dans les chromosomes mais dans les mitochondries. La maladie dans ce cas est toujours transmise par la mère [86].

8.2. Epidémiologie génétique

L'épidémiologie génétique consiste à analyser la contribution des facteurs de risque génétiques et leur interaction avec les facteurs de risque environnementaux dans le déterminisme d'une pathologie donnée, dans des familles ou dans des populations humaines [87]. Ainsi, l'épidémiologie génétique des syndromes épileptiques peut être étudiée selon deux grands groupes distincts :

- Celui des syndromes rares dont le mode de transmission génétique obéit à des lois simples, mendéliennes, et qui présentent une héritabilité autosomique dominante ou récessive, ou encore liée au chromosome X [88] ;

- Celui des syndromes, de loin beaucoup plus fréquents, dont le mode de transmission est complexe [89, 90].

Dans le premier groupe, les études génétiques reposent sur la collecte de grandes familles dans lesquelles ségrège le phénotype d'intérêt afin d'identifier une mutation causale dans un gène donné. En effet, la stratégie dite de *clonage positionnel* passe successivement par l'identification des familles, la détermination de leur structure par l'établissement des pedigrees, le phénotypage précis des malades et des apparentés non atteints, la définition du mode de transmission, le génotypage et le traitement statistique des données générées, et enfin le criblage par séquençage des gènes situés dans la région incriminée afin d'identifier les mutations pathogènes dans les familles étudiées.

Dans le second groupe, il s'agit plutôt d'étudier un grand nombre de petites familles voire de cas isolés, afin d'identifier des variations génétiques conférant une susceptibilité génétique pour un phénotype particulier, et influençant son émergence en agissant de concert avec d'autres variations génétiques et/ou avec des facteurs environnementaux [91]. La stratégie actuelle repose soit sur le séquençage direct des gènes dont la fonction laisse supposer un rapport avec la physiopathologie épileptique

(gènes candidats), afin de rechercher des variants de susceptibilité dont la fréquence est faible dans la population (*hypothèse dite de maladie commune-variant rare*) ; soit sur des études d'association cas-témoins pour la recherche de variants fréquents (*hypothèse dite de maladies communes-variants communs*) [92].

8.2.1. Etudes d'agrégation familiale

Pour démontrer l'existence d'une agrégation familiale de l'épilepsie, on peut montrer par exemple que la maladie est plus fréquente chez les apparentés au premier degré des malades (parents, fratrie, enfants) que dans la population générale ou chez les apparentés au premier degré de témoins sains [93]. Pour cela, il faut s'assurer que les deux populations de cas et de témoins soient appariées au sexe et à l'âge [94]. Toutefois, le fait de démontrer un excès de cas familiaux dans l'épilepsie peut correspondre à l'action d'un ou de plusieurs gènes ainsi que de l'environnement partagé par les membres d'une même famille, et ne fait que suggérer qu'il faut rechercher une composante génétique.

8.2.2. L'étude de concordance entre jumeaux

Les études de jumeaux constituent un outil efficace pour déterminer le degré d'implication des facteurs génétiques et environnementaux dans la survenue d'une maladie. Le principe de ces études est de comparer les taux de concordance, pour un trait donné, entre des jumeaux monozygotes (même patrimoine génétique) et des jumeaux dizygotes (environ 50% de leur patrimoine génétique en commun).

Toutes les études de jumeaux épileptiques rapportent des taux de concordance plus élevés chez les monozygotes (65-80%) par rapport aux dizygotes (0-33%), confirmant la composante génétique [95-101]. Ceci est particulièrement vrai pour les épilepsies généralisées génétiques [102]. En effet, 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 étant défini comme l'interaction entre 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 [103]. D'ailleurs, pour illustrer la présence de mécanismes épigénétiques chez les jumeaux monozygotes, une étude originale a évalué les différences de méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones chez des paires de jumeaux monozygotes [104]. Elle a montré que ces jumeaux étaient indistinguables durant leurs premières années de vie, mais que par la suite, ils présentaient 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. 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 l'expression d'une pathologie à composante héréditaire.

8.2.3. Les analyses de ségrégation

Ces analyses étudient la distribution familiale du spectre phénotypique de l'épilepsie dans des familles et cherchent à déterminer le mode de transmission qui explique le mieux les données observées [105]. Les études familiales menées jusqu'à ce jour dans le domaine des épilepsies soulignent deux points essentiels :

- Premièrement, sans doute l'observation la plus cohérente dans l'épidémiologie génétique des épilepsies est « l'effet maternel ». En effet, le risque d'épilepsie est environ deux fois plus élevé chez les enfants de femmes épileptiques que dans la descendance des pères affectés [94].
- Deuxièmement, la plupart des études de familles souligne l'existence d'une association significative entre l'âge de début précoce des crises chez le cas-index et le risque d'épilepsie chez les apparentés [106].

8.2.4. Etudes de liaison et recherche de gènes candidats

Les études de liaison génétique permettent de mettre en évidence des régions chromosomiques liées à un phénotype particulier, en montrant une ségrégation de la maladie avec certains allèles des marqueurs de cette région dans une famille présentant plusieurs individus atteints [107]. Ceci s'explique par une localisation du gène muté à proximité de ces marqueurs, avec une transmission d'une large région de l'ordre de 10cM (centimorgan) autour de la mutation sur quelques méioses. La région déterminée contient généralement encore de nombreux gènes parmi lesquels il faudra trouver celui

impliqué dans la maladie. L'identification d'autres familles avec un phénotype semblable lié au même locus permet d'affiner la localisation du gène responsable, et d'entamer la recherche de mutations dans les gènes candidats. En théorie, une seule famille peut toutefois permettre l'identification du gène responsable [108].

Les analyses de liaison sont basées sur le calcul d'un logarithme des probabilités, le LOD score (*logarithm of odds*), qui permet d'établir le degré de liaison génétique entre deux loci en se basant sur les probabilités de transmission des allèles à la descendance. Ce LOD score est le logarithme du rapport de la probabilité d'observer une co-ségrégation si les loci sont liés, sur la probabilité de l'observer en absence de liaison. Le seuil conventionnel de signification $p=0.05$ nécessite une probabilité de 1000 chances pour 1 en faveur de la liaison pour pouvoir affirmer celle-ci [109].

La méthode d'analyse de liaison non paramétrique permet de rechercher des facteurs liés sans modèle de transmission a priori. Toutefois, dans les études de liaison, il est recommandé de recruter de grandes familles dont la provenance d'isolats populationnels endogames avec un nombre limité d'ancêtres communs est un avantage majeur [107]. Ainsi, cela évite une trop grande hétérogénéité génétique entre les différents membres de la famille et augmente la fréquence des effets fondateurs [110].

Plusieurs études de liaisons dans des familles épileptiques ont été effectuées ces dernières années, mais seuls quelques gènes ont été liés aux épilepsies monogéniques, par *linkage* dans des pedigrees étendus (**Tableau 7**).

Tableau 7: Gènes identifiés par analyses de liaison

Gène	Syndrome épileptique	Référence
<i>SCN1A</i>	<i>Syndrome de Dravet, EGFS+</i>	[111, 112]
<i>SCN1B</i>	EGCF+	[113, 114]
<i>SCN2A</i>	BFNIS	[115, 116]
<i>LGI1</i>	ADLTE	[117, 118]
<i>GABRA1</i>	EMJ, EAE	[119, 120]
<i>CACNA1H</i>	EGI	[121, 122]
<i>CLCN2</i>	EGI	[123]
<i>GABRG2</i>	EGCF+, EAE	[124]
<i>KCND2</i>	ELT	[125]
<i>SCL2A1</i>	EA à début précoce	[126]
<i>KCNJ11</i>	DEND syndrome	[127]
<i>ABCC8</i>	DEND syndrome	[128]
<i>EFHC1</i>	EMJ	[129]
Délétion 15q13.3	EGI	[130, 131]
<i>POLG1</i>	Epilepsie à phénotypes mixtes	[132, 133]
<i>STXBP1</i>	Syndrome d'Ohtahara	[134, 135]
<i>CDKL5</i>	Rett-like syndrome	[136, 137]
<i>ARX</i>	West et syndrome d'Ohtahara	[138, 139]
<i>KCNQ2</i>	BFNC	[140, 141]
<i>KCNQ3</i>	BFNC	[142, 143]
<i>KCNA1</i>	AE1 et épilepsie	[144, 145]
<i>CHRNA4</i>	ADNFLE	[146, 147]
<i>CHRNA2</i>	ADNFLE	[148, 149]
<i>CHRN2</i>	ADNFLE	[150]
<i>PCDH19</i>	EFMR	[151]
<i>ATP1A2</i>	MHF et épilepsie	[152]

DEND syndrome: retard du développement, épilepsie et diabète néonatal; AD: autosomique dominant; ADNFLE: Epilepsie frontale à crises nocturnes autosomique dominante; ADLTE: Epilepsie du lobe temporal latéral autosomique dominante; EAE: épilepsie absence de l'enfant; BFNC: convulsions néonatales familiales bénignes; BFNIS: convulsions néonatales-infantiles familiales bénignes; AE1: Ataxie épisodique type 1; EFMR: épilepsie avec retard mental limitée aux filles; MHF: migraine hémiplegique familiale; EGCF+: épilepsie génétique avec convulsions fébriles Plus; EMJ: Epilepsie myoclonique juvénile; EGI: Epilepsie généralisée idiopathique

En 2012, l'Epicure consortium⁵ a effectué une méta analyse des études de liaison à l'échelle du génome entier visant à cartographier des loci de susceptibilité partagés par un large spectre d'épilepsies généralisées génétiques (EGG), et les marqueurs génétiques de prédisposition aux crises d'absences typiques et aux crises myocloniques. La méta-analyse a été réalisée à partir de 379 familles multiplex d'ascendance européenne, comptant 982 sujets avec EGG [153]. Afin d'identifier les gènes de susceptibilité liés au type de crise, les familles ont été stratifiées en deux sous-groupes comprenant 235 familles avec épilepsie absence et 118 familles avec épilepsie myoclonique juvénile (EMJ). L'analyse de liaison sur la totalité de l'échantillon (EGG) a révélé six loci de liaison : 1p36.22, 3p14.2, 5q34, 13q12.12, 13q31.3 et 19q13.42. Un LOD score de 3.43 a été obtenu pour le locus 2q34 dans les 118 familles JME, et un lien paramétrique significatif au locus 13q31.3 a été retrouvé dans les 235 familles avec épilepsie absence. 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 liaison est dû au seuil rigoureux du LOD score établi à 3 par Morton [154].

8.2.5. L'étude de paires de germains atteints (*affected sib-pair analysis*)

Dans l'analyse de paires de germains atteints, on calcule le pourcentage d'allèles parentaux partagés par les enfants atteints. Si le marqueur étudié est proche, voire dans un gène de susceptibilité impliqué dans la maladie, les paires de germains malades présenteront un excès d'allèles du marqueur en commun : cet excès s'explique par la liaison (*linkage*) existant entre le locus marqueur et le locus impliqué dans la maladie. En l'absence de liaison, les probabilités que les deux germains atteints partagent 0, 1 ou 2 allèles identiques parentaux sont respectivement de $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{4}$. Ces proportions sont faciles à estimer si les quatre allèles parentaux sont différents [155]. Cette stratégie évite d'avoir à faire des hypothèses sur le mode de transmission de la maladie. Par ailleurs,

⁵ Epicure Consortium est un réseau de collaboration entre plusieurs groupes de recherche à travers l'Europe. Il vise à élucider les voies physiopathologiques de l'épilepsie en étudiant l'implication de gènes codant pour les canaux ioniques dans la voie de signalisation neuronale.

elle permet de contourner le problème de la pénétrance incomplète, puisque seuls les sujets atteints sont pris en considération. Cependant, 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 [156].

8.2.6. Etudes d'association

Les études d'association consistent à comparer la fréquence d'allèles dans une population d'individus atteints par rapport à une population d'individus témoins dans le but de mettre en évidence des allèles de prédisposition à la pathologie [157]. Elles permettent donc de déterminer une association entre un haplotype ou un marqueur donné et le fait de développer une maladie et sont plus puissantes que les études de liaison dans la recherche de variants à effet faible. Les premières études d'association ont été réalisées avec l'approche « gène candidat » dont le principe est de tester un nombre souvent restreint de variants génétiques localisés dans des loci intéressants de par leur fonction ou leur localisation.

8.2.6.1. Les études de trios

Il s'agit d'une approche fondée sur l'analyse de familles nucléaires (séquençage de l'exome de l'individu malade et de ses deux parents). Cette stratégie est basée sur l'hypothèse qu'une mutation *de novo* a une probabilité élevée d'être causale dans la survenue de la maladie [158]. Toutefois, l'accumulation des données de séquençage, a remis en question cette vision simplifiée et la présence d'une mutation *de novo*, peut être observée dans une population témoin normale. Ainsi, pour valider l'hypothèse de gène candidat, une confirmation sur un grand nombre de patients partageant le même syndrome doit être réalisée. Cette stratégie d'analyse a été utilisée pour étudier les bases génétiques de certaines encéphalopathies épileptiques (spasmes infantiles et syndrome de Lennox-Gastaut) et a permis l'identification de mutations *de novo* dans les gènes Gamma-Aminobutyric Acid Receptor, Beta-3 (*GABRB3*) [159] et Asparagine-Linked Glycosylation 13 (*ALG13*) [160]. En effet, ces deux gènes ont montré une forte association aux encéphalopathies épileptiques, avec des degrés de significativité de 4.1×10^{-10} et 7.8×10^{-12} , respectivement [161].

8.2.6.2. Les études d'associations cas-témoins

Ces études comparent la fréquence d'allèles spécifiques chez des malades et des sujets témoins sains. Un allèle est dit « associé » à une maladie s'il est présent plus fréquemment parmi les malades non apparentés que parmi les sujets témoins. Néanmoins, pour qu'une étude d'association soit valide, les témoins et les malades doivent provenir de la même origine géographique et, idéalement, résulter d'unions aléatoires, prouvant ainsi qu'ils sont représentatifs de la population testée pour tous les aspects autres que le statut malade [162]. Malgré un résultat statistiquement significatif, celui-ci n'est pas suffisant pour conclure à une association, car il faut tenir compte du déséquilibre de liaison (DL) [163]. Le DL est une situation dans laquelle deux allèles correspondant à deux loci distincts d'un même chromosome sont plus fréquemment associés en cis dans une population que ne le voudrait le hasard. Le DL suppose à la fois la liaison génétique et le déséquilibre gamétique. Une telle association allélique est favorisée par la proximité physique des loci et le caractère récent de la mutation ayant produit l'un des deux allèles [164]. Cette liaison a tendance à s'amenuiser avec le temps, en raison des phénomènes de recombinaison. Par conséquent, du fait 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 pathogénique et causal. De ce fait, 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 responsable de la maladie [163].

En dépit de plusieurs études d'association cas-témoins dans le domaine des épilepsies génétiques, les associations restent incertaines et les réplifications négatives. Ceci est en partie dû à la stratification de la population étudiée, à la petite taille des échantillons de cas et de témoins, au degré limite de la significativité statistique et à la plausibilité biologique peu convaincante du marqueur testé. Des recommandations mettant l'accent sur les critères méthodologiques, ont tenté d'améliorer les normes pour les études d'associations génétiques [165].

8.2.6.3. Les études d'association pangénomique

Avec les progrès des techniques génétiques et génomiques au début de ce siècle, est venu l'espoir que les études d'association pangénomique (*Genome Wide Association Studies* GWAS) élucident les bases génétiques de nombreuses maladies, y compris l'épilepsie. Ce concept est basé sur l'idée que les maladies communes, telles que les épilepsies, ne sont pas médiées uniquement par des facteurs génétiques à hérédité mendélienne, mais que la variabilité génétique à de nombreux loci pourrait influencer le risque de développer une épilepsie. L'objectif des études GWAS dans les épilepsies multigéniques ou complexes, est d'identifier les loci de susceptibilité qui confèrent un risque accru de développer la maladie, avec des tailles d'effet très modestes. Souvent, les régions chromosomiques associées peuvent comprendre plusieurs gènes qui sont susceptibles de jouer un rôle dans le développement d'une épilepsie complexe [166]. Cependant, la plupart des tentatives de GWAS dans l'épilepsie étaient infructueuses ou initialement non reproductibles [167]. Ceci peut être expliqué par l'hétérogénéité phénotypique et le manque de puissance suffisante pour détecter des signaux de faible effet [168].

8.3. Techniques en génétique moléculaire appliquées à l'épilepsie

Le génome humain est soumis à une dynamique mutationnelle qui résulte en un spectre complexe de variants de séquence et de structure de l'ADN, qui vont des altérations nucléotidiques simples (mutations ponctuelles) à des remaniements (variations du nombre de copies d'ADN), en passant par des expansions de répétition en tandem (*Variable Number of Tandem Repeats* VNTR, ou *Short Tandem Repeats* STR) [169]. L'identification des anomalies génétiques causales sous-jacentes à la maladie grâce aux nouvelles techniques en génétique moléculaire, permet une confirmation du diagnostic, un typage génétique précis, un conseil génétique approprié et un éventuel diagnostic présymptomatique ou prénatal [170]. Nous détaillons ici les techniques utilisées dans ce travail :

8.3.1. Amplification génique *in vitro* par réaction en chaîne (PCR)

Conçue en 1985 par Kary Bank Mullis⁶, cette méthode consiste à réaliser *in vitro*, la répétition d'un cycle de synthèse d'un fragment d'ADN. Elle permet d'amplifier de manière sélective une séquence d'ADN choisie, même si cette dernière est présente dans un mélange complexe d'autres molécules d'ADN, et sans avoir à la purifier au préalable.

Dans le premier cycle de PCR : les deux brins de l'ADN que l'on veut amplifier sont dénaturés par la chaleur (95°C). Une paire d'amorces spécifiques et complémentaires de l'extrémité 3' est ajoutée. La température est ensuite abaissée à 55-65°C afin que ces amorces puissent s'hybrider, une amorce sur chaque brin, de part et d'autre de la région à amplifier. A partir de ces amorces, une ADN polymérase particulière, la Taq Polymérase, qui est thermorésistante, va synthétiser à 72°C un nouveau brin d'ADN en lisant la séquence du brin existant, cette étape est appelée « élongation ». A la fin du premier cycle, les deux brins d'ADN ont été copiés pour former deux fragments d'ADN double brin (**Figure 6**).

Dans les cycles suivants, les mêmes étapes sont répétées : séparation des brins par la chaleur, hybridation des amorces, et élongation par la Taq Polymérase. Le nombre de copies du fragment compris entre ces amorces augmente ainsi considérablement : au bout de 20 cycles, on obtient environ 10^6 copies et au bout de 30 cycles environ 10^9 copies. A cette étape, le produit de la PCR est appelé amplimère.

⁶ Lauréat au prix Nobel de chimie en 1993 pour la mise au point de la PCR.

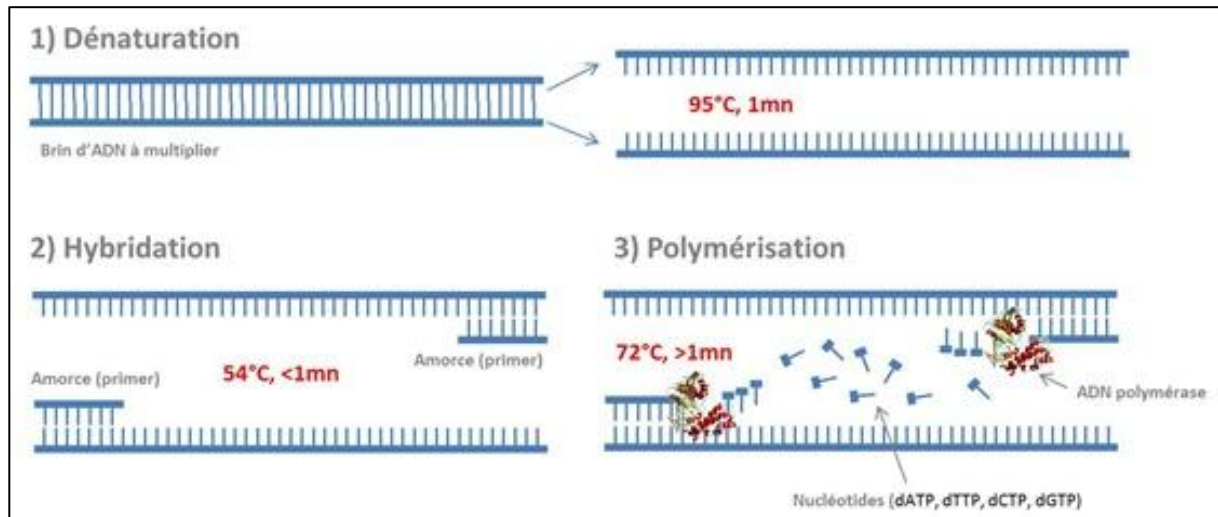


Figure 6: Représentation schématique des différentes étapes d'un cycle de PCR

A partir de la réaction de PCR « classique » se sont développées de nombreuses méthodes dérivées, dont la RT-PCR et la Q-PCR :

- L'acronyme RT-PCR signifie « Reverse Transcriptase PCR ». C'est en fait une PCR réalisée sur un ADN complémentaire obtenu après transcription inverse d'un ARN [171].
- L'acronyme Q-PCR signifie « PCR quantitative ». Elle permet de suivre en temps réel l'évolution de la quantité d'ADN synthétisé lors de la réaction de PCR en utilisant des marqueurs fluorescents [172].

8.3.2. Hybridation Génomique Comparative sur micro-réseaux d'ADN et recherche de CNV

Cette technique récente constitue l'avancée la plus significative de ces dernières années dans le diagnostic des réarrangements chromosomiques. Elle repose sur le principe de la CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) appliquée aux puces à ADN. Une puce à ADN est un support de quelques cm^2 , le plus souvent en verre ou en silice, sur lequel sont présents un grand nombre de fragments d'ADN simple brin. Ces fragments correspondent à des séquences d'ADN humain, appelées « marqueurs », réparties sur le génome en fonction des régions étudiées.

Lors de l'analyse par *CGH-array*, l'ADN du patient à analyser est comparé à l'ADN d'un témoin. Si une région chromosomique est délétée, elle apparaîtra en moindre nombre chez le patient par rapport au témoin. A l'inverse, si une région chromosomique est

dupliquée, elle apparaîtra en plus grand nombre chez le patient par rapport au témoin [173]. Les déséquilibres génomiques mis en évidence par *CGH-array* sont dénommés *Copy Number Variants* (CNVs).

En pratique, le principe de cette technique est le suivant : l'ADN du patient est marqué par incorporation d'un fluorochrome, et parallèlement, on marque l'ADN du témoin avec un deuxième fluorochrome d'une autre couleur. Ces deux ADN sont ensuite combinés puis déposés sur la puce : c'est l'étape d'hybridation. Les ADN marqués vont se fixer de façon compétitive sur leur séquence d'ADN complémentaire qui est présente sur la puce. Enfin, la lecture de la puce s'effectue à l'aide d'un scanner qui détermine les rapports d'intensité entre chaque fluorochrome et compare ainsi le nombre de copies de chaque ADN (patient et témoin) au niveau de chaque marqueur étudié (**Figure 7**) [174]. Cette analyse est aidée par l'utilisation des bases de données publiques de CNV mais il est fréquent qu'en complément, une étude familiale soit nécessaire. Aujourd'hui, la technique de *CGH-array* a supplanté le caryotype pour l'étude globale du génome en offrant une résolution 10 à 500 fois supérieure, et en donnant accès au contenu génique de la région remaniée.

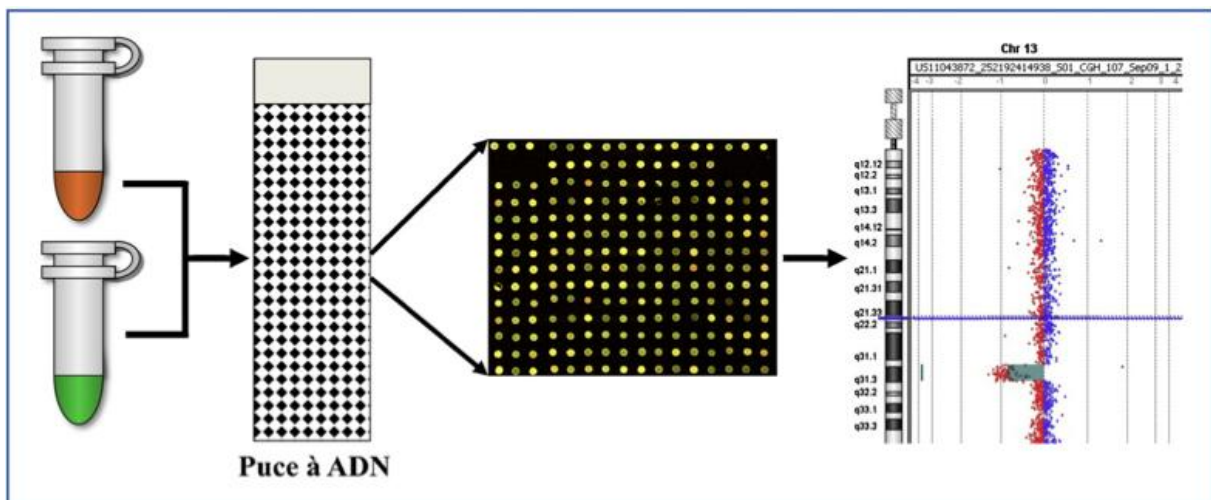


Figure 7: Principe de la technique CGH-array [173]

8.3.3. Séquençage massivement parallèle

Les techniques de séquençage massivement parallèle également appelées séquençage à haut débit ou *Next Generation Sequencing* (NGS) ne sont pour le moment

pas utilisées en diagnostic de routine mais constituent probablement les méthodes d'analyse du génome les plus prometteuses. Les termes «deuxième» et «troisième génération» sont synonymes de l'évolution des technologies depuis la méthode de séquençage direct de Sanger dite de «première génération» [175].

Trois technologies NGS à haut débit sont apparues de façon quasi simultanée : le pyro-séquençage (454 Life Sciences, Roche Diagnostics, Bâle, Suisse), le séquençage avec des terminateurs réversibles (HiSeq2000, Illumina/Solexa, Inc., San Diego, CA, USA) et le séquençage par ligation (SOLiDTM, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)(**Figure 8**) [176, 177].

Séquenceurs 2 ^{ème} génération										
Société	Roche			Illumina				Life Technologies		
Plateforme										
Technologie	Titanium	FLX Titanium FLX +					Chip 314 Chip 316 Chip 318			
Acides nucléiques (matrice)										
Ligation adaptateurs										
Méthode d'amplification	PCR en émulsion		« Bridge PCR »				PCR en émulsion			
Méthode de séquençage	Synthèse (Pyroséquençage)		Synthèse				Ligation			
Durée de séquençage/run	10h	10h 20h	26h	8jrs	8jrs	14jrs	2h	12jrs	8jrs	8jrs
Capacité (Mb) séquençage/run	50	500 900	1500	100000	200000	95000	>10 >100 >1000	70000	80000	150000
Taille moyenne des reads	400	400 700	150+150	100+100	100+100	150+150	100 >100 >100	50+35	75+35	75+35
Coût (\$) /run	1100	6200	750	10000	20000	11500	500 750 950	8150	6100	10500
Coût machine + annexes ((K\$))	110+25	500+30	125	560	690	250	50+20	480+55	350+55	600+55
Exactitude de séquençage (%)	99	99	99,9	99,9	99,9	99,9	99	99,95	99,95	99,99

Figure 8: Séquenceurs de deuxième génération⁷

Ces techniques permettent de déterminer la séquence complète d'un génome.

⁷ <http://www.biorigami.com/mise> à jour le 06/02/2016

Pour cela, la séquence est assemblée en utilisant les chevauchements entre les *reads*, pour former des *contigs*⁸. Elles permettent également de détecter les réarrangements chromosomiques et d'avoir l'équivalent d'un caryotype mais avec une résolution maximale, à la base près. Par ailleurs, elles peuvent déterminer pour chaque région chromosomique le nombre de *reads* générés. Si une région est délétée, ce nombre sera relativement moindre par rapport aux autres régions du génome, ce qui est en faveur d'une anomalie déséquilibrée. Le traitement informatique de cette très grande quantité de données nécessite des algorithmes lourds et de puissants calculateurs afin de réaliser leur assemblage puis leur analyse [178].

8.4. Bio-informatique et analyse du génome : Utilisation des banques de données

8.4.1. Genome Browsers

Une base de données est un ensemble structuré et organisé permettant le stockage de grandes quantités d'informations afin d'en faciliter l'utilisation. Les bases de données utiles dans le domaine de la génétique sont appelées « *Genome Browsers* ». Elles permettent d'accéder aux données du génome humain et de celui d'autres espèces à l'aide d'une interface graphique. La base de données de référence pour les maladies génétiques est sans conteste OMIM⁹. Cette base de données est une compilation exhaustive de gènes humains et de phénotypes causés par des anomalies génétiques. En effet, elle répertorie des de données sur plus de 12.000 gènes. Parallèlement à OMIM, il existe des bases de données dédiées aux épilepsies génétiques, dont epiGAD et CarpeDB, des référentiels en ligne des données relatives aux études d'association génétique dans le domaine de l'épilepsie (**Tableau 8**).

⁸ Séquences continues générées par l'alignement de séquences de fragments qui se chevauchent

⁹ Online Mendelian Inheritance in Man; National Center for Biotechnology Information.

Tableau 8: Bases de données disponibles sur Internet

Bases de données	Adresse internet
<i>Bases de données et sites pour l'étude du génome</i>	
Ensembl	www.ensembl.org/index.html
Complete Genomics	www.completegenomics.com/public-data
Génome de référence (site UCSC)	genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway
Genome reference consortium	www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/
Base de données de pseudogènes	pseudogene.org
Base de données de miARNs	www.mirbase.org
Base de données de lncARNs	www.lncrnadb.org
<i>Base de données de polymorphismes</i>	
dbSNP (Single nucleotide polymorphism database)	www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
Exome variant server	evs.gs.washington.edu/EVS/
<i>Base de données de facteurs de transcription</i>	
ITFP (Integrated Transcription Factor Platform)	itfp.biosino.org/itfp/
<i>Projets de séquençage de génomes humains individuels</i>	
Projet 1000 génomes	www.1000genome.org
Personal Genome Project	www.personalgenomes.org
<i>Base de données d'études d'association pangénomique</i>	
GWAS central	www.gwascentral.org
Catalogue des études GWAS de la littérature mondiale (National Human Genome Research Institute, USA)	www.genome.gov/26525384
<i>Etude du microbiome humain</i>	
Projet microbiome humain-Human Microbiome Project (HMP)	commonfund.nih.gov/hmp
International Human Microbiome Consortium	www.human-microbiome.org
<i>Bases de données de mutations</i>	
HMGD (Human Genes Mutations Database)	www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
HGVS data bases (Human Genome Variation Society)	www.hgvs.org/dblist/dblist.html
Projet HapMap	hapmap.ncbi.nlm.nih.gov
Human Heredity and Health in Africa	www.h3africa.org/about.cfm
MITOMAP (Human Mitochondrial genome database)	www.mitomap.org/MITOMAP
DGV (Data of Genomic Variants)	projects.tcag.ca/variation
DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources)	decipher.sanger.ac.uk
Copy Number Variation (CNV) Project	www.sanger.ac.uk/research/areas/humangenetics/cnv
ECARUCA (European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations)	umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.js
Annuaire de bases de données de variants structurels du génome	www.hgvs.org/dblist/chromo.html
<i>Encyclopédie des maladies héréditaires monogéniques</i>	
OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)	www.omim.org
<i>Groupe d'étude de l'épigénome humain</i>	
	www.epigenome.org
	www.roadmapepigenomics.org
<i>Bases de données dédiées à l'épilepsie</i>	
The Epilepsy Genetic Association Database (epiGAD)	http://www.epigad.org/
CarpeDB (University of Alabama)	http://www.carpedb.ua.edu/

UCSC: Université de Californie à Santa Cruz, miARN : microARN, lncARN : long non coding ARN

8.4.2. Bases de données et polymorphismes nucléotidiques

Le séquençage du génome humain et les progrès des techniques de biologie moléculaire ont permis de répertorier plus de 10 millions de polymorphismes nucléotidiques simples (*single nucleotide polymorphisms*, SNP). Les SNP constituent un type de variation de l'ADN dans lequel deux chromosomes diffèrent sur un segment donné par une seule paire de bases. Les SNP sont stables, très abondants et distribués uniformément dans tout le génome et surviennent tous les mille pb [179-181]. Ces variations sont associées à la diversité entre populations ou individus, à la différence de sensibilité à des maladies et à la réponse individuelle aux médicaments. En fait, chaque SNP est référencé par un numéro « rs : Reference SNP », et se caractérise également par la fréquence de ses deux allèles dans une population donnée. Cette fréquence s'estime à partir des génotypes observés chez des individus non apparentés, et sa précision dépend de la taille de l'échantillon. La fréquence de l'allèle le plus rare, ou mineur, est appelée MAF « Minor Allele Frequency ».

Les SNP sont répertoriés dans des bases de données publiques, notamment la banque de données dbSNP gérée par NCBI «National Center of Biotechnology Information» [182] et celle du projet «HapMap». Ce projet dont l'objectif est de créer une base de données publique détaillée des variations génétiques les plus fréquentes chez l'Homme, a permis d'établir un catalogue des SNP chez les individus originaires d'Afrique, d'Europe et d'Asie. Plus récemment, le projet «1000 génomes» basé sur le séquençage de nouvelle génération, a apporté une énorme contribution à l'identification et la caractérisation des SNP pour les populations du monde entier [183]. C'est ainsi que ces ressources bioinformatiques constituent un outil précieux pour la recherche en génétique.

8.5. Progrès récents en génétique de l'épilepsie

8.5.1. Epilepsies monogéniques

Les technologies de séquençage à haut débit ont permis l'identification de plusieurs gènes incriminés dans les épilepsies monogéniques [184, 185]. Ainsi, des mutations du gène Proline-Rich Transmembrane Protein 2 (*PRRT2*) responsable de plus de 70% des Convulsions familiales infantiles bénignes, ont été identifiées chez des familles de différentes ethnicités (Australiennes, suédoises et israéliennes-juives) [186,

187]. Ce gène dont la taille est de 7.832 pb, comporte 6 exons et est localisé en 16p11.2. Il est fortement exprimé dans le cerveau et la moelle épinière, et code pour une protéine transmembranaire contenant dans sa partie N-terminale, un domaine riche en proline [188]. Cette protéine interagit avec la protéine *synaptosomal-associated 25-KD* (SNAP-25), un composant du mécanisme moléculaire impliqué dans la libération des neurotransmetteurs au niveau de la membrane présynaptique [189].

L'autre découverte surprenante est l'identification en 2012 de mutations du gène Potassium Channel, Subfamily T, Member 1 (*KCNT1*) dans deux épilepsies monogéniques apparemment sans rapport : l'épilepsie avec crises partielles migrantes malignes (MMPSI) et l'épilepsie frontale nocturne autosomale dominante (ADNFLE) [190, 191]. Ce gène a été localisé en 9q34.3 et code pour un canal potassium sodium-dépendant fortement exprimé dans le cerveau. Les mutations de ce gène conduisent à l'activation du canal l'amenant à une ouverture maximale et permanente [192]. MMPSI et ADNFLE pourraient donc représenter les extrêmes d'un nouveau spectre phénotypique d'épilepsie causée par le même gène.

8.5.2 Epilepsies génétiques complexes

En 2012, les premiers variants génétiques communs associés à l'épilepsie généralisée génétique (EGG) ont été publiés par le consortium européen d'Epicure [193]. L'étude a inclus 3020 patients avec EGG et 3954 témoins d'ascendance Européenne. L'analyse par GWAS a révélé une association significative aux EGG en 2p16.1 (rs13026414, $p=2.5 \times 10^{-9}$), en 17q21.32 (rs72823592, $p=9.3 \times 10^{-9}$) et dans la région 2q24.3 (rs11890028, $p=4.0 \times 10^{-6}$), à proximité du gène *SCN1A*, qui est actuellement le gène avec le plus grand nombre de mutations connues dans l'épilepsie [194]. Après stratification selon la classification syndromique, la recherche de susceptibilité allélique a identifié une association à l'épilepsie absence en 2q22.3 (rs10496964, $p=9.1 \times 10^{-9}$) et à l'EMJ en 1q43 (rs12059546, $p=4.1 \times 10^{-8}$). Les régions associées abritent des gènes candidats: Cholinergic Receptor Muscarinic 3 (*CHRM3*) en 1q43, Vaccinia-Related kinase 2 (*VRK2*) en 2p16.1, Zinc Finger E Box-binding Homeobox 2 (*ZEB2*) en 2q22.3, Sodium channel neuronal type I, alpha subunit (*SCN1A*) en 2q24.3 et Pyridoxamine 5-Prime-Phosphate Oxidase (*PNPO*) en 17q21.32 [193]. A l'exception de *SCN1A* et *CHRM3*, tous les autres gènes ne sont pas des gènes candidats connus de susceptibilité à l'EGG, faisant

allusion à des voies encore inconnues, outrepassant l'implication des canaux ioniques.

Plus récemment encore, le Consortium des Epilepsies Complexes¹⁰ a publié les résultats d'une méta-analyse incluant 8.696 individus épileptiques et 26.157 témoins avec des données phénotypiques et génotypiques de 12 cohortes suivies pendant plusieurs années [195]. Une association pangénomique significative a été retrouvée avec le locus 2q24.3 contenant le gène Sodium channel neuronal type II, alpha subunit (*SCN2A*), et avec un locus sur le chromosome 4 (4p15.1) contenant le gène Protocadherin (*PCDH7*). L'analyse de cette cohorte a également révélé une importante association entre les EGG et le locus 2p16.1 contenant les gènes Fanconi anemia complementation group L (*FANCL*), et Vaccinia related kinase 2 (*VRK2*), une sérine-thréonine kinase précédemment associée à l'épilepsie et à la schizophrénie [196].

En dépit de ces avancées majeures, et à l'ère du diagnostic de l'épilepsie par des applications disponibles sur Smartphones [197], et de son traitement personnalisé par les cellules pluripotentes et par thérapie génique [198, 199], force est de constater que la situation est loin d'être satisfaisante. En effet, la plupart des gènes découverts ont été associés aux épilepsies monogéniques qui ne représentent que 1 à 2% de toutes les épilepsies génétiques, et il reste encore beaucoup de formes familiales à hérédité complexe, pour lesquelles les gènes de susceptibilité demeurent inconnus [200].

8.6. Le conseil génétique

Le conseil génétique est le processus par lequel des patients ou des parents présentant un risque de maladie héréditaire sont conseillés et informés de la nature et des conséquences de cette maladie, de la probabilité de la développer ou de la transmettre à leur descendance, et des options qui se présentent à eux en matière de planification de vie et de planification familiale, de manière à prévenir la maladie. Ce processus complexe peut être séparé en deux parties : le diagnostic (estimation des risques) et une deuxième partie, plus complexe, de conseil en fonction du diagnostic. Tout comme la singularité d'une maladie génétique est sa tendance à récidiver dans la famille, l'aspect unique du conseil génétique est de ne pas se limiter seulement au patient mais de

¹⁰ Le Consortium des épilepsies complexes a été conçu par la LICE en 2009 dans le but d'identifier les loci de susceptibilité aux épilepsies complexes.

s'intéresser aussi aux membres de sa famille, à la fois présents et passés.

Les avancées significatives dans le domaine de la génétique des épilepsies rendent les tests génétiques cliniques encore plus concevables et envisageables. Ainsi, le patient doit comprendre d'une part la raison pour laquelle un test génétique lui est proposé et d'autre part ses différentes répercussions (médicales, éthiques, juridiques et sociales) afin de pouvoir prendre une décision « éclairée ». A cet effet, les *guidelines* attestent que « tout test génétique doit être précédé d'une information adéquate sur les objectifs et les résultats possibles du test et les choix qui pourraient en découler »¹¹. Cette déclaration s'applique clairement aux épilepsies vu qu'elles constituent une entité hétérogène avec une grande variabilité étiologique et phénotypique.

Ainsi, le conseil génétique pour les épilepsies devrait inclure:

- L'évaluation du patient, de sa perception du risque et de ses attentes.
- L'interprétation du test en terme de sensibilité, de spécificité et de probabilité d'obtenir un résultat positif, négatif ou non concluant. Comme la plupart des épilepsies génétiques sont multifactorielles et à transmission complexe, les limites de l'analyse devraient être expliquées [201].
- L'implication du dépistage et ses répercussions sur la prise en charge médicale et sur la décision de reproduction.
- Une description des méthodes utilisées pour prélever des échantillons de sang. Lorsque les échantillons d'ADN doivent être obtenus à partir de membres de la famille afin d'effectuer un test génétique informatif, la question de « vie privée » doit être prise en compte. La pratique éthique consiste à demander au patient de communiquer directement avec les autres membres de sa famille. À cette étape, il ne devrait y avoir aucun contact direct entre les professionnels de soins de santé et les membres de la famille [202].
- Un plan pour la communication des résultats au patient, notamment dans le futur et en tenant compte de l'évolution de la pharmacogénétique. Il est recommandé que les

¹¹ <http://www.who.int/genomics/publications/en/ethicalguidelines1998.pdf>

patients soient recontactés si cela est appropriée et souhaité. L'impact émotionnel de communiquer de nouvelles informations sensibles, la protection de la vie privée, et les interactions familiales devraient également être pris en considération.

EXPOSÉ DES TRAVAUX

CHAPITRE II : L'épilepsie familiale en Algérie, caractéristiques cliniques et modes de transmission

Résumé

Objectifs : Analyser les caractéristiques cliniques et les modes de transmission de l'épilepsie chez des familles Algériennes multigénérationnelles.

Matériels et méthodes : Tous les individus présentant le phénotype épileptique ont été évalués au service de Neurologie du CHU d'Oran. Les données cliniques, électroencéphalographiques et iconographiques ont été collectées, et les syndromes épileptiques ont été classés selon les critères de la LICE (2010). Les modes de transmission ont été déterminés à travers l'analyse des *pedigrees*.

Résultats : Quarante familles comportant chacune au moins deux membres atteints d'épilepsie, ont participé à l'étude. Nous avons collecté des données concernant 907 individus, dont 156 (17.2%) présentaient un phénotype épileptique. Une consanguinité parentale a été notée chez la moitié des familles dont 80% au premier degré. Une concordance phénotypique a été observée dans vingt-cinq familles (62.5%). L'analyse des *pedigrees* suggérait une transmission autosomique dominante avec ou sans pénétrance réduite dans 18 familles (45%), une transmission autosomique récessive dans 14 familles (35%) et une transmission récessive liée à l'X dans une seule famille.

Conclusion : Cette étude a révélé une ségrégation de l'épilepsie dans des familles Algériennes multiplex, confortant l'hypothèse du caractère héréditaire de cette maladie. Elle a également mis en évidence un taux non négligeable d'unions endogames, suggérant un rôle de la consanguinité dans le déterminisme génétique de l'épilepsie.

Mots Clés : Épilepsie familiale, consanguinité, mode de transmission, pedigree.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue « Seizure, European Journal of Epilepsy » (**Annexe 1**).

CHAPTER II: Familial epilepsy in Algeria, clinical features and inheritance profiles

Abstract

Background: This study aimed to document the clinical characteristics and inheritance pattern of epilepsy in multigenerational Algerian families.

Materials and methods: Affected members from extended families with familial epilepsy were assessed at the University Hospital of Oran in Algeria. Available medical records, neurological examination, electroencephalography and imaging data were reviewed. The epilepsy type was classified according to the ILAE criteria (2010) and modes of inheritance were deduced from pedigree analysis.

Results: Forty families with two or more members affected by idiopathic epilepsy participated in the study. We collected data from 907 subjects, of whom 156 (17.2%) showed epilepsy. The consanguinity rate among parents of affected individuals was 50% with phenotypic concordance observed in 25 families (62.5%). Pedigree analysis suggested autosomal dominant inheritance with or without reduced penetrance in 18 families (45%), probable autosomal recessive inheritance in 14 families (35%), and an X-linked recessive inheritance in one family.

Conclusion: This study revealed large Algerian families with multigenerational inheritance of epilepsy and highlighted a significant rate of endogamous unions. These results suggest familial segregation of epilepsy, and a probable role of inbreeding in genetic epilepsies.

Key words: Familial epilepsy, consanguinity, inheritance pattern, pedigree.

This observational study has been published in « Seizure, European Journal of Epilepsy » **(Appendix 1)**.

1. Introduction

Les études généalogiques et familiales de populations endogames présentent un intérêt particulier du fait de la faible stratification de la population et de la possibilité de réaliser des études à la fois de liaison et d'association. Elles représentent des approches puissantes pour l'identification de variants génétiques rares.

Depuis la mise en place d'une consultation spécialisée en épilepsie au service de Neurologie du CHU d'Oran en 2011, nous avons constaté l'existence de plusieurs familles comportant au moins deux individus atteints d'épilepsie. Dans la plupart des cas, il s'agit de larges familles consanguines dont les phénotypes les plus souvent en cause sont :

- l'épilepsie familiale du lobe temporal (ELT) ;
- l'épilepsie myoclonique juvénile (EMJ) ;
- l'épilepsie myoclonique progressive de type 1 (EMP1) ;
- l'épilepsie absence de l'enfant (EAE) ;
- et l'épilepsie génétique avec convulsions fébriles plus (EGCF+).

Cette constatation nous a incité à mener une étude descriptive de ces familles, dont l'objectif est double :

- d'une part, décrire les caractéristiques cliniques et phénotypiques ;
- et d'autre part, établir les modes de transmission de l'épilepsie à travers l'analyse des *pedigrees*.

2. Matériels et méthodes

Il s'agit d'une étude observationnelle menée au service de neurologie du centre hospitalier universitaire d'Oran sur une période de 05 ans (de Janvier 2011 à Décembre 2015).

2.1. Région d'étude

La wilaya d'Oran est la capitale de l'Ouest Algérien et une des plus importantes villes du Maghreb. Elle est située au bord de la rive sud du bassin méditerranéen, au nord-ouest de l'Algérie, à 432 km de la capitale Alger. Bordée à l'est par Mostaganem, au sud-est par Mascara, au sud-ouest par Sidi-Bel-Abbès et à l'ouest par Ain Témouchent, la

ville s'étend sur 2.114 km². Depuis le dernier redécoupage administratif de 1984, la wilaya d'Oran est divisée en neuf daïras, sur lesquelles se répartissent 26 communes **(Figure 9)**.

D'après le dernier recensement de la population en 2009¹², la ville compte 1.584.607 habitants avec un taux d'accroissement de 1.9 et une densité de 9530.3 habitants/km². Elle est caractérisée par une population très jeune, 42.3% de la population est âgée de moins de 20 ans et 62.6% est âgée de moins de 30 ans. Fondée en 902 par les Andalous, Oran a connu une succession de colonisations. De ce fait, elle mêle plusieurs influences : arabes, berbères, portugaises, espagnoles, turques et françaises.

¹² www.ons.dz mise à jour le 07/01/2016

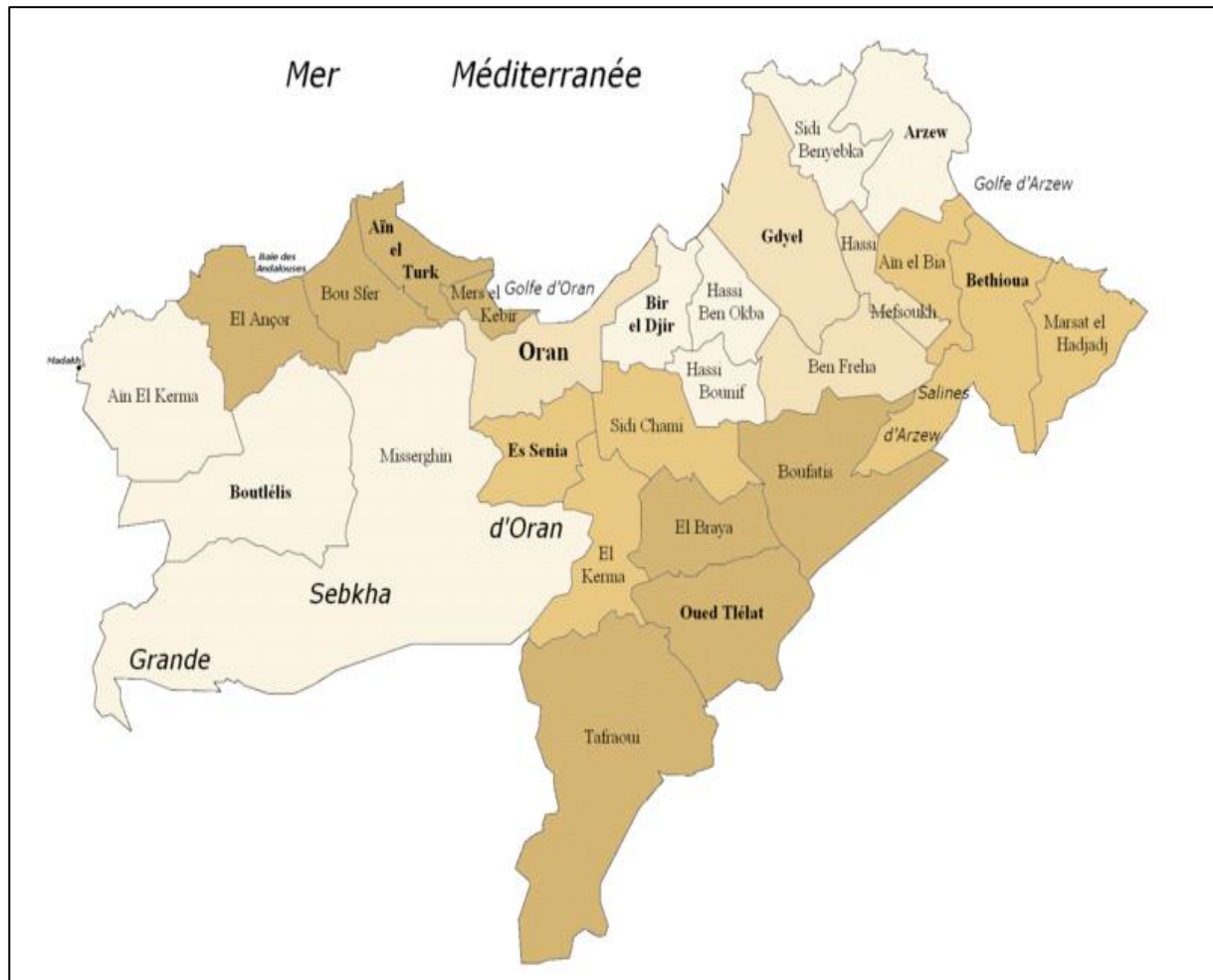


Figure 9: Carte géographique de la wilaya d'Oran¹³

2.2. Recrutement des familles et évaluation clinique

Tous les épileptiques suivis en consultation spécialisée sont systématiquement interrogés sur la notion de cas similaires dans la famille. Ceux qui répondent favorablement sont basculés en consultation « épilepsie familiale », et font l'objet d'une réévaluation clinique avec examen neurologique rigoureux. Ils bénéficient également d'enregistrements électroencéphalographiques (EEG) périodiques, selon le système international 10-20 à l'état de veille et, si possible, pendant le sommeil diurne induit par la privation de sommeil. Le bilan est ensuite complété par une imagerie cérébrale par résonance magnétique (IRM) avec injection de gadolinium. Tous les membres

¹³ [https://fr.wikipedia.org/mise à jour le 06/02/2016](https://fr.wikipedia.org/mise_à_jour_le_06/02/2016)

possiblement affectés sont par la suite convoqués et évalués de la même façon. Les apparentés apparemment sains, sont aussi interrogés, examinés et bénéficient d'un enregistrement EEG systématique.

Le questionnaire utilisé est celui de l'Institut d'Epidémiologie neurologique et de Neurologie Tropicale de Limoges soutenu par la Ligue Internationale Contre l'Epilepsie [203]. Initialement élaboré par les membres d'un Comité de Recherche multidisciplinaire, ce questionnaire a été discuté avec des experts internationaux et utilisé lors de recherches épidémiologiques et lors d'enquêtes hospitalières réalisées dans plusieurs pays Africains : Bénin [204], Burkina-Faso [205], Cameroun [206], République Centrafricaine [207], et Mauritanie [208], où il a démontré son applicabilité et sa faisabilité. Plusieurs versions corrigées ont ainsi pu être réalisées. La version finale qui a reçu l'approbation de tous, a 4 grands objectifs : dépister les patients atteints, décrire les formes cliniques, rechercher les étiologies, et évaluer les traitements prescrits. Sa structure est modulaire et comprend les 9 sections suivantes : données démographiques, dépistage, confirmation de l'épilepsie, histoire naturelle de l'épilepsie, antécédents, examen clinique, examens complémentaires, étiologies et traitement anti-épileptique (**Annexe 02**).

Le recueil des données s'est effectué sur plusieurs consultations avec les patients et leur entourage. Ces entretiens ont permis d'enquêter sur les antécédents familiaux d'épilepsie, de définir les degrés de parenté entre les individus, d'identifier les unions endogames, d'obtenir des informations sur le déroulement des grossesses et leur surveillance, les modalités d'accouchement et le développement psychomoteur des sujets atteints.

Dans un second temps, des entretiens avec les grands parents, les apparentés et les collatéraux ont été effectués au service de neurologie, parfois même au domicile des patients. Nous avons également eu des entretiens téléphoniques avec des apparentés vivant hors du pays pour confirmer les dires des patients et pouvoir déterminer les liens de parenté entre les ascendants. Ces entretiens nous ont permis de recueillir des informations concernant l'origine des familles, leurs histoires migratoires et leur exposition à d'éventuels facteurs de risque environnementaux. Nous avons également consulté les livrets de familles, les actes de naissance et de mariage et parfois même les registres de l'état civil pour nous assurer de l'identité des individus, de leurs âges exacts et de leurs liens de parenté. Des données sur le degré de parenté des différents conjoints,

sur l'origine des conjoints non apparentés, ainsi que les maladies prévalant dans les familles ont été également précisées.

Par la suite, des arbres généalogiques d'au moins trois générations ont été élaborés et codés « EPI-ORA-XXX » (EPI pour épilepsie, ORA pour Oran, et XXX pour les trois premières lettres du nom de chaque famille nucléaire). Les pedigrees ont été retracés suivant les normes standardisées utilisées dans les études de génétique médicale et ce, à l'aide du logiciel « Genial Pedigree ».

La version française de la DIGS (*Diagnostic Interview for Genetic Studies*) a été utilisée pour évaluer les patients ayant des troubles mentaux associés [209]. Cette évaluation a été réalisée par un psychiatre entraîné et bilingue (français-arabe) exerçant au CHU d'Oran. La DIGS est à l'origine un outil semi-structuré développé par la « National Institute of Mental Health Genetics Initiative » dans la perspective d'une meilleure caractérisation des phénotypes psychiatriques. Elle permet également d'évaluer l'existence, présente ou passée, d'un large spectre de pathologies de l'Axe I du manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-IV), et d'en préciser l'évolution au cours du temps.

Nous avons également procédé à un dépistage de la dépression chez tous les patients par le questionnaire NDDI-E (*The Neurological Disorders Depression Inventory for epilepsy*). Pour cela, nous avons utilisé les deux versions validées en arabe [210] et en français [211, 212].

Tous nos patients ont bénéficié d'un examen génétique à la recherche d'éventuelles malformations ou variations morphologiques individuelles ou familiales, pouvant contribuer à l'identification d'un syndrome déjà connu. L'examen morphologique a consisté en des mesures paramétriques du poids, de la taille et du périmètre crânien. Nous nous sommes également intéressés à l'aspect général de la face, des phanères, des extrémités, et des organes génitaux externes ; nous avons même visionné des photographies des patients et de leurs apparentés prises à différents âges.

2.3. Classification des crises et des syndromes épileptiques

Nous avons collecté les informations inhérentes aux manifestations critiques en interrogeant les patients et les témoins des crises. En cas de doute, nous demandions à l'entourage de filmer les crises. Nous nous sommes basés sur les antécédents des malades, leur statut neurologique, leur types de crises, leur enregistrements EEG et leur

imagerie cérébrale pour classer les syndromes épileptiques selon les recommandations de la LICE [74].

2.4. Consentement éclairé

Le protocole de cette étude a été soumis à l'approbation par consentement écrit de tous les participants (**Annexe 3**). Pour les mineurs et les sujets présentant des troubles du jugement, le consentement éclairé fut signé par le tuteur légal du sujet atteint, et ce, conformément à la réglementation algérienne (Journal Officiel N°52 du 08 Juillet 1992 ; Règles de déontologie médicale. Chapitre II, paragraphe 3, Article 44 (**Annexe 3**) [213].

2.5. Définitions

- Le cas-index (proband ou proposant) a été défini comme le premier membre de la famille à avoir été identifié dans cette étude.
- La consanguinité a été définie comme une relation maritale entre deux individus qui partagent le même ancêtre ; le degré de consanguinité étant déterminé par le nombre total de générations qui séparent deux individus de leur ancêtre commun [214].
- Une histoire familiale d'épilepsie a été considérée positive si au moins un apparenté au 1^{er} degré (parent, frère, sœur, enfant), 2^{ème} degré (oncle, tante, grands-parents, petits-enfants, neveu, nièce) ou 3^{ème} degré (cousin germain) était épileptique.
- Nous avons conclu à une concordance phénotypique lorsque tous les membres affectés présentaient les mêmes caractéristiques cliniques (type de crises, âge de début des crises, réponse au traitement et résultats de l'EEG et de l'imagerie cérébrale).
- Les modes de transmission ont été déterminés à partir de l'analyse des pedigrees. Nous avons conclu à un mode de transmission autosomique dominant lorsque les deux sexes étaient atteints de façon verticale sur plusieurs générations. Une transmission autosomique récessive était suggérée lorsque les individus atteints appartenaient à une génération issue de parents apparemment indemnes (apparentés ou originaires du même village). Un mode de transmission récessif

lié à l'X était suspecté lorsque l'affection épargnait les sujets de sexe féminin et lorsqu'aucune transmission « *male-to-male* » n'était observée.

- Les convulsions fébriles ont été définies comme la survenue de crises entre 06 et 60 mois, accompagnées de fièvre (température ≥ 100.4 °F ou 38 °C), en l'absence de toute infection du système nerveux central [215].
- Le retard mental (RM) ou déficience intellectuelle (DI) est défini selon le système de classification du DSM IV TR par un quotient intellectuel (QI) inférieur à 70, un début avant l'âge de 18 ans, et l'existence de déficits ou d'altérations du fonctionnement adaptatif [216]. Du fait de la non disponibilité de tests validés, et notamment en arabe, la notion de RM a été étudiée à travers des entretiens avec les patients et leurs familles sur le développement psychomoteur, le déroulement de la scolarité et le niveau de fonctionnement et de raisonnement actuel.
- L'épilepsie a été considérée comme pharmacorésistante en cas de: (a) échec de deux antiépileptiques appropriés, (b) survenue d'au moins une crise par mois durant une période ≥ 18 mois, et (c) pas plus de 3 mois sans crises au cours de ces 18 mois [217].
- Une épilepsie contrôlée a été définie par l'absence de crise durant au moins six mois chez des patients qui n'ont jamais répondu aux critères de pharmacorésistance [218].

2.6. Analyses statistiques

Les données collectées ont été codées et saisies sur logiciel SPSS version 21.0 pour Mac OS X. Nous avons procédé à une analyse descriptive des cas-index, faisant appel au calcul des moyennes et des écarts-types pour les variables quantitatives et des pourcentages pour les variables qualitatives.

3. Résultats

3.1. Caractéristiques cliniques de la cohorte

Quarante familles comportant au moins deux membres atteints d'épilepsie ont participé à l'étude. Nous avons collecté les données de 907 sujets, parmi lesquels 156 (17.2%) présentaient une maladie épileptique, dont deux paires de jumeaux

monozygotes. En plus des 40 probants, l'épilepsie a été diagnostiquée chez 61 apparentés au premier degré, 17 du second degré et 19 du troisième degré. Le nombre moyen d'individus par famille (malades et sains) était de 22.7 avec une moyenne de 4 membres affectés par famille.

La notion de consanguinité a été relevée chez la moitié de nos familles (20/40) dont 16 (80%) au premier degré et 4 (20%) au second degré.

Dans 25 familles (62.5%), les membres affectés partageaient le même phénotype alors que dans les 15 autres, les individus atteints souffraient de formes différentes d'épilepsie.

Dans deux familles (5%), le phénotype épileptique était associé à d'autres manifestations telles que le déficit intellectuel, paraplégie spastique, cécité et microcéphalie, probablement en rapport avec un syndrome autosomique récessif non diagnostiqué.

3.2. Caractéristiques cliniques des 40 probants

Parmi les 40 probants, il y avait 23 sujets de sexe masculin (57.5%) et 17 de sexe féminin (42.5%) avec un sex-ratio estimé à 1.35.

L'âge variait entre 4 et 59 ans avec une moyenne de 27.7 ± 13.2 ans. Il s'agit d'une population à prédominance adulte (72.5% étaient âgés de plus de 18 ans).

L'âge de début de la maladie variait entre trois mois et 22 ans (âge moyen : 9.5 ± 6.1 ans). En se basant sur le type de crises inaugurales, 16 patients (40%) présentaient des crises focales, 20 sujets (50%) avaient des crises généralisées et les quatre restant (10%) n'ont pu être classés car leur maladie avait débuté par une combinaison de crises focales et généralisées.

Onze probants (27.5%) avaient des antécédents personnels de convulsions fébriles (CF) et huit d'entre eux (72.7%) avaient en plus, une histoire familiale de CF.

La distribution des cas-index en fonction de la classification syndromique de la LICE est présentée dans la **Figure 10**.

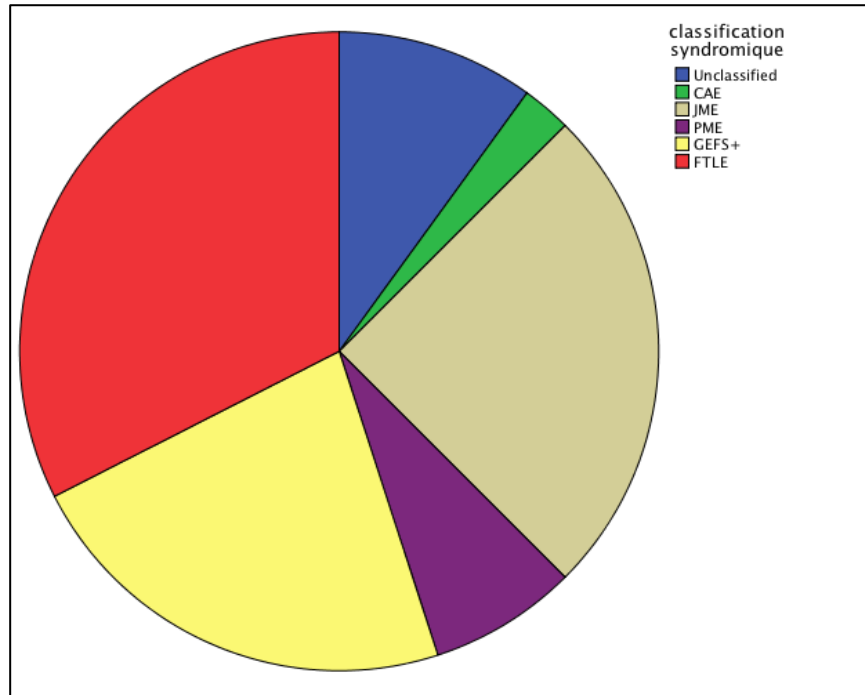


Figure 10: Distribution des 40 probants en fonction de leur syndrome épileptique

CAE: épilepsie absence de l'enfant, JME: épilepsie myoclonique juvénile, EPM1: épilepsie myoclonique progressive de type 1, GEFS+: épilepsie génétique avec convulsions fébriles Plus, FTLE: épilepsie familiale du lobe temporal

Vingt quatre probants (60%) étaient sous monothérapie, douze (30%) sous deux antiépileptiques et deux (5%) sous trithérapie. Les antiépileptiques les plus fréquemment prescrits étaient par ordre décroissant : l'acide valproïque® (22/40, 55%), la Carbamazépine® (11/40, 27.5%) et le Lévétiracétam® (8/40, 20%).

Au moment de l'étude, 21 patients (52.5%) avaient une épilepsie contrôlée par mono- ou bithérapie. Vingt huit (70%) étaient libres de crises depuis au moins 3 mois, dont deux (5%) ont été sevrés depuis plus de trois ans. Les douze autres probants (30%) continuaient à présenter des crises malgré plusieurs combinaisons d'antiépileptiques.

Après évaluation psychiatrique, deux probants ont été diagnostiqués avec déficience intellectuelle et 12 (30%) avaient une comorbidité psychiatrique : 6 patients présentaient de l'anxiété, 4 étaient dépressifs, un seul patient était schizophrène et un autre présentait un trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH).

Les caractéristiques cliniques, les données de l'examen neurologique, les résultats de l'EEG ainsi que les probables modes de transmission sont résumés dans le **Tableau 9**.

L'imagerie cérébrale (TDM, IRM) était normale chez tous nos patients hormis le cas index de la famille 17 qui présentait une atrophie corticale et cérébelleuse.

Tableau 9: Caractéristiques électrocliniques et modes de transmission de l'épilepsie chez les 40 probants.

Probants	Age de début (Années)	Type de crises	Syndrome épileptique	Résultats de l'EEG	Examen neurologique	Mode de transmission
1 EPI-ORA-AFF	13	Focales complexes	EFLT	Pointes ondes temporales	Normal	De novo [219]
2 EPI-ORA-BAH	15	Myocloniques	EMJ	Polypointes généralisées	Normal	AD pénétrance réduite
3 EPI-ORA-BEF	18	Focales simples	EFLT	Ondes lentes temporales	Normal	AD pénétrance réduite
4 EPI-ORA-BEK	18	Myocloniques	EMJ	Polypointes généralisées	Normal	AD pénétrance réduite ? AR ?
5 EPI-ORA-BEL	10	Myocloniques	EMP1	Polypointes ondes généralisées/ photosensibilité	Dysarthrie, ataxie	AR
6 EPI-ORA-BEN	5	Absences	EAE	Pointes ondes généralisées à 3Hz	Normal	AR
7 EPI-ORA-BEE	15	Focales complexes	EFLT	Pointes ondes temporo-pariétales	Normal	AD
8 EPI-ORA-BEZ	11	Myocloniques	EMJ	Polypointes ondes généralisées	Normal	XR? AD avec pénétrance réduite?
9 EPI-ORA-BER	11	Myocloniques	EMP1	Pointes et polypointes diffuses	Ataxie cérébelleuse,	AR
10 EPI-ORA-BEB	2	Myocloniques	EGCF+	Photosensibilité	Normal	AD pénétrance réduite? AR?
11 EPI-ORA-BOB	3	Tonico-cloniques généralisées	EGCF+	Pointes ondes généralisées	Normal	AD
12 EPI-ORA-BOU	4	Inconnues	EGCF+	Pointes ondes temporo-pariétales	Normal	AR
13 EPI-ORA-BOG	5	Myocloniques	EMJ	Polypointes généralisées	Normal	AR
14 EPI-ORA-BOS	11	Tonico-cloniques généralisées	Inconnu	Normal	Cécité, surdité, DI	AR
15 EPI-ORA-DJE	5	Focales complexes	EGCF+	Pointes ondes pariéto-occipitales	Normal	AD pénétrance réduite
16 EPI-ORA-DRI	16	Focales complexes	EFLT	Pointes temporo-pariétales	Normal	AD pénétrance réduite
17 EPI-ORA-FEL	1	Tonico-cloniques généralisées	EGCF+	Anomalies multifocales	Paraplégie spastique, DI	AD
18 EPI-ORA-FRI	1	Focales simples	EFLT	Pointes fronto-temporales	Normal	AD
19 EPI-ORA-GHA	1	Tonico-cloniques généralisées	EGCF+	Pointes ondes temporo-pariétales	Normal	AD? AR?
20 EPI-ORA-KAD	12	Focales complexes	EGCF+	Pointes ondes temporales	Normal	AD
21 EPI-ORA-KHE	17	Myocloniques	EMJ	Polypointes généralisées	Normal	AR
22 EPI-ORA-KHO	17	Myocloniques	EMJ	Polypointes généralisées	Normal	AR

23 EPI-ORA-GOM	16	Focales complexes	EFLT	Pointes temporo-occipitales	Cécité	AD
24 EPI-ORA-MAH	6	Myocloniques	EMP1	Polypointes généralisées	Dysarthrie, ataxie, DI	AR
25 EPI-ORA-MAZ	9	Myocloniques	EMJ	Polypointes généralisées	Normal	AR
26 EPI-ORA-MEL	22	Inconnues	Inconnu	Normal	Normal	AD
27 EPI-ORA-MOU	9	Myocloniques	EMJ	Polypointes généralisées	Normal	AD pénétrance réduite? AR?
28 EPI-ORA-RAH	15	Focales complexes	Inconnu	Ondes lentes occipitales	Normal	AD pénétrance réduite? AR?
29 EPI-ORA-SEH	3	Focales complexes	EFLT	Pointes ondes temporales	Normal	AD?
30 EPI-ORA-SIA	10	Focales complexes	EFLT	Pointes fronto-temporales	Normal	XR ? AR ?
31 EPI-ORA-SLI	1	Focales simples	EGCF+	Pointes ondes généralisées	Normal	AR
32 EPI-ORA-YAK	8	Myocloniques	EMJ	Pointes ondes frontales	Normal	AD pénétrance variable
33 EPI-ORA-YSS	1	Myocloniques	EMJ	Polypointes généralisées	Normal	AD
34 EPI-ORA-ZEL	12	Partielles complexes	EFLT	Pointes temporales	Normal	AD? AR?
35 EPI-ORA-SAI	4	Inconnues	EFLT	Normal	Normal	AD pénétrance variable
36 EPI-ORA-SIN	15	Tonicocloniques généralisées	EFLT	Normal	Normal	AD
37 EPI-ORA-BEC	19	Focales simples	EFLT	Pointes temporales	Normal	AD
38 EPI-ORA-FEG	0.3	Inconnues	Inconnu	Pointes multifocales	Microcéphalie DI	AD pénétrance variable
39 EPI-ORA-BOL	4	Focales complexes	EFLT	Pointes temporales et occipitales	Normal	AD
40 EPI-ORA-KEB	14	Focales complexes	EGCF+	Foyer frontal	Normal	AD

AD: autosomique dominant, AR: autosomique récessif, XR: récessif lié à l'X, EAE: épilepsie absence de l'enfant, EMJ: épilepsie myoclonique juvénile, EMP1: épilepsie myoclonique progressive de type 1, EGCF+: épilepsie génétique avec convulsions fébriles Plus, EFLT: épilepsie familiale du lobe temporal, DI : déficience intellectuelle.

3.3. Résultats de l'analyse des modes de transmission

En tenant compte de l'analyse des pedigrees, l'épilepsie était transmise sur un mode AD avec ou sans pénétrance réduite dans 18 familles (45%). Dans 14 familles (35%), une TAR était suggérée, alors qu'une transmission récessive liée à l'X n'a été observée que dans une seule famille. Chez les familles restantes, l'analyse généalogique n'était pas concluante ou suggérait plus d'un mode de transmission (**Figures 11 et 12**).

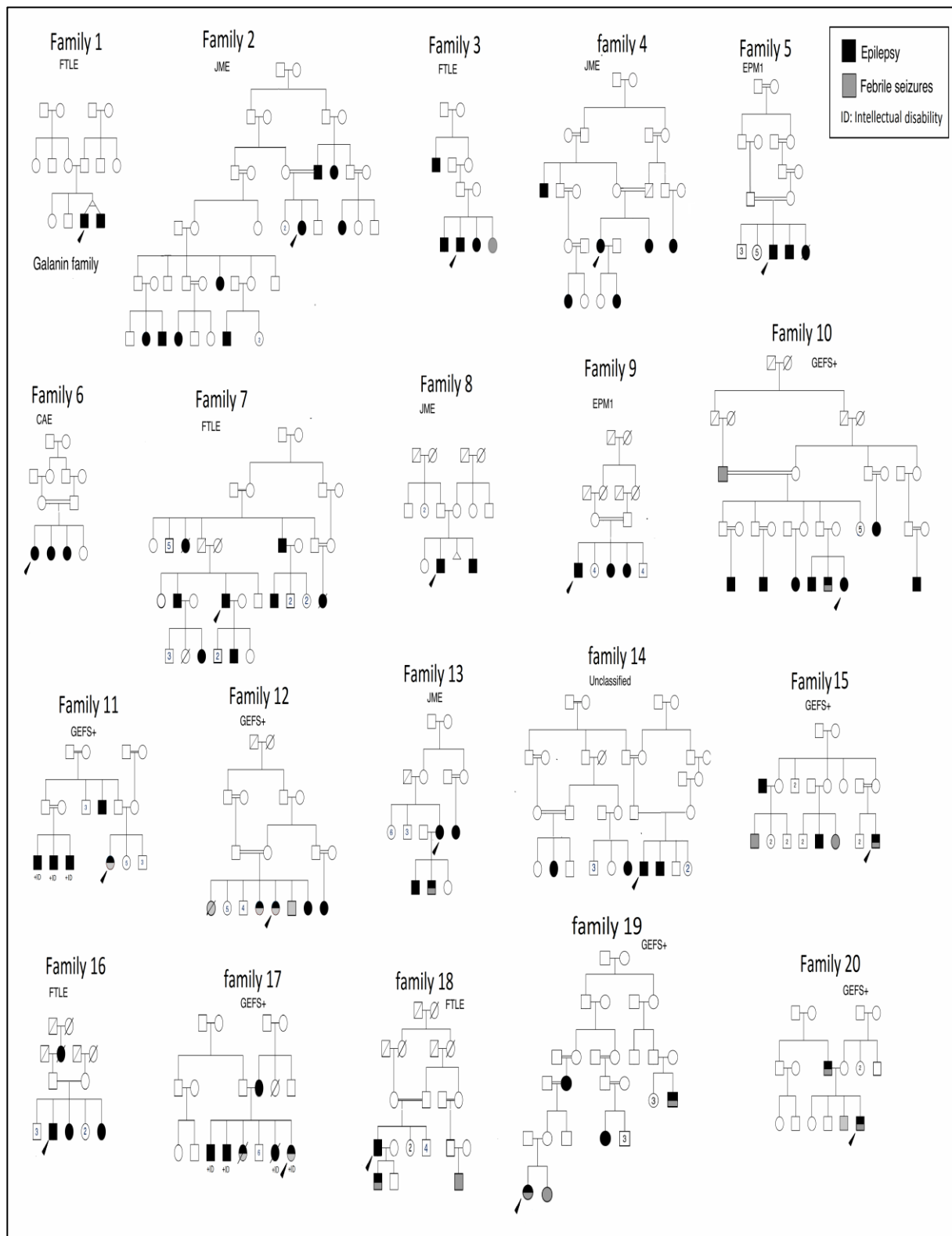


Figure 11: Pedigrees des familles 1 à 20

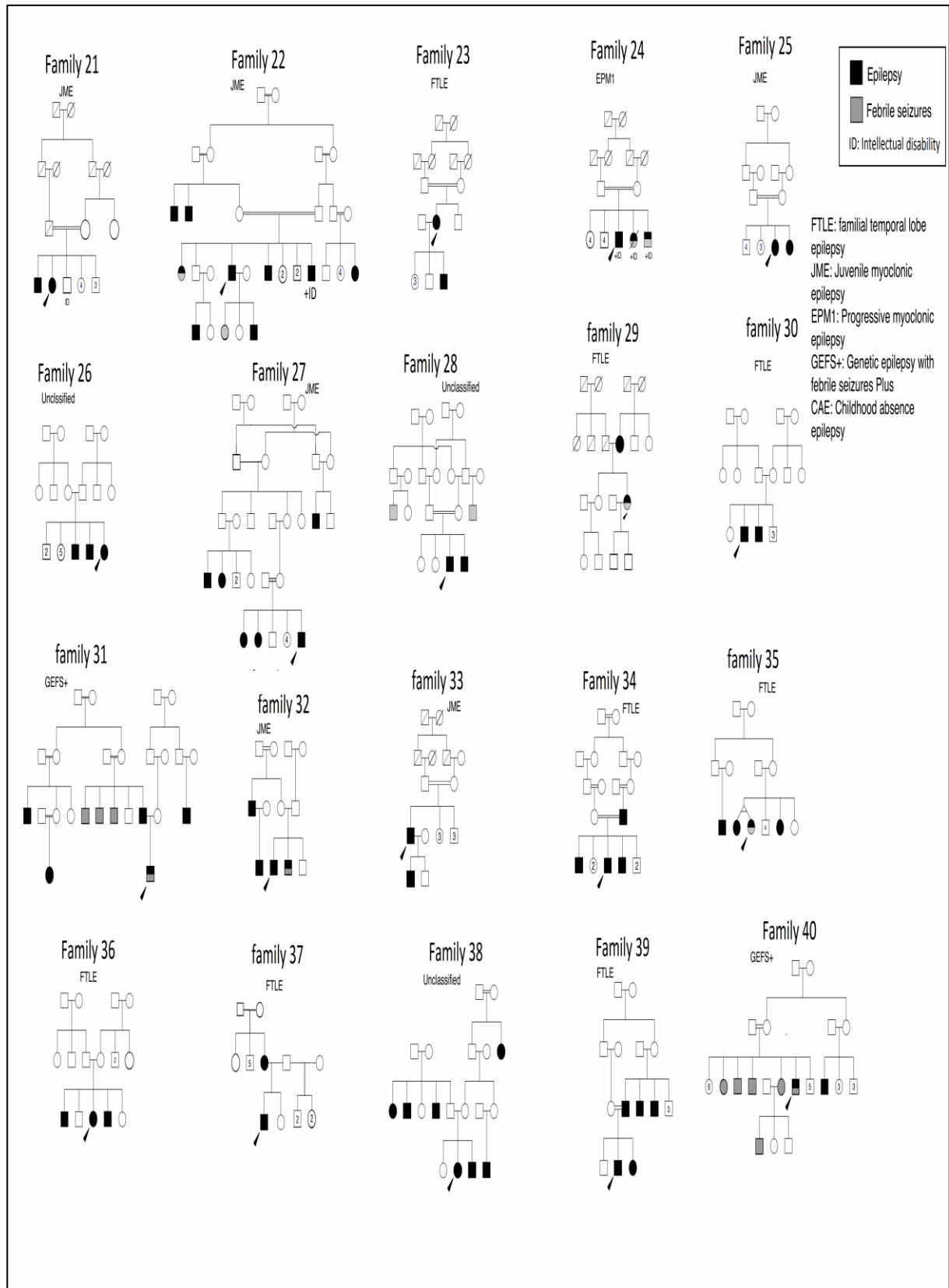


Figure 12: Pedigrees des familles 21 à 40

4. Discussion

4.1. Discussion des caractéristiques cliniques des 40 familles

L'épilepsie familiale comprend différents syndromes qui sont généralement diagnostiqués à travers les caractéristiques cliniques des membres affectés. La disponibilité de données généalogiques étendues permet d'établir de larges pedigrees, potentiellement très informatifs pour l'analyse génétique.

Dans notre étude, les familles vivent à Oran, une région où le taux de mariages consanguins est estimé à 18% selon les données de la Fondation Nationale pour la Promotion de la Santé et le Développement de la Recherche en 2007¹⁴. Des études antérieures ont mis en évidence un taux élevé de mariages endogames à Tlemcen (34%), une région à 150 km d'Oran [220]. Compte tenu de la ségrégation du phénotype épileptique dans de larges familles multigénérationnelles comptant plusieurs membres atteints, les Oranais semblent être une population intéressante pour la recherche en génétique des épilepsies.

Dans notre cohorte, le taux de consanguinité estimé à 50% était bien plus élevé que ce qui est attendu dans la population générale. Des résultats similaires ont été rapportés dans des populations pratiquant l'endogamie. En effet, dans leur cohorte jordanienne de 31 familles épileptiques, Masri et al ont rapporté un taux de consanguinité de 61.3%, suggérant que cette dernière jouerait un rôle dans le déterminisme de certaines formes d'épilepsie [221]. Ainsi, cette constatation nous a incités à mener une autre étude épidémiologique dans la même région géographique, visant à étudier la relation entre la consanguinité et l'épilepsie, et à identifier les autres facteurs de risque associés à l'épilepsie [53]. Cette étude sera abordée dans le chapitre suivant.

Dans notre échantillon, l'épilepsie était plus fréquente parmi les apparentés au premier degré que ceux du deuxième ou troisième degré. Ces résultats rejoignent les données de la littérature. En effet, dans une large cohorte de 3098 épileptiques originaires de Turquie, 9.5% des sujets de l'étude avaient au moins un apparenté épileptique ; les membres apparentés au premier degré étant deux fois plus nombreux

¹⁴ www.forem.dz. Mise à jour le 07/01/2016

que ceux du deuxième degré (202 vs. 94) [222]. Ceci rejoint les résultats d'études menées en Iran [51], en Jordanie [223], en Tanzanie [224], au Kenya [225] et en Inde [226, 227]. Ces résultats suggèrent l'existence d'une composante génétique dans l'épilepsie, mais n'écartent pas l'implication de facteurs environnementaux partagés par les membres d'une même famille.

La plupart des familles (62.5%) étaient phénotypiquement concordantes alors que dans les quinze familles restantes une grande variabilité phénotypique intrafamiliale était observée. Ce phénomène peut être expliqué par deux hypothèses :

- La première est celle du pléiotropisme génétique. En effet, certains gènes codent pour plusieurs traits phénotypiques à la fois. Par conséquent, une seule et même mutation peut s'exprimer par un large spectre phénotypique. C'est ce qu'on appelle « l'effet pléiotropique d'un gène ».
- La deuxième hypothèse qui a fait l'unanimité dans la communauté scientifique est celle de l'exposition à des facteurs épigénétiques qui vont moduler l'expression des gènes sans pour autant modifier la séquence d'ADN ni l'ordre d'enchaînement des bases azotées. Ces facteurs sont représentés essentiellement par la méthylation des segments d'ADN riches en îlots CpG, et par la désacétylation des histones. Ces deux mécanismes vont entraîner une compaction de la chromatine avec enclavement et séquestration du gène à l'intérieur des replis. Le gène n'étant plus accessible au complexe de transcription, il ne sera pas transcrit, et sera donc réduit au silence. C'est ce qu'on appelle dans le jargon génétique « le silençage génique ».

4.2. Discussion des caractéristiques cliniques des 40 probants

Parmi nos 40 cas-index, il y avait une légère prédominance masculine (23 hommes/17 femmes). La plupart des études épidémiologiques sur l'épilepsie montrent que les hommes sont plus fréquemment atteints que les femmes, cependant la différence est rarement statistiquement significative [228].

L'âge moyen de début des crises était de 9.5 ans, probablement à cause de la prédominance dans notre échantillon, de syndromes épileptiques qui ont la particularité de s'exprimer à l'adolescence ou un peu plus tard, tels que l'épilepsie myoclonique juvénile [229], l'épilepsie myoclonique progressive [230, 231] et l'épilepsie familiale du lobe temporal [232].

Les crises généralisées étaient légèrement plus fréquentes que les crises focale (50% vs. 40%). Ce résultat concorde avec ceux des études menées dans certains pays Arabes [31, 233], en Asie [234] et en Afrique sub-Saharienne [235]. En outre, dans une cohorte Américaine incluant 1994 individus épileptiques, Abou Khalil a constaté que les individus présentant des crises généralisées avaient plus d'apparentés au premier et second degré atteints d'épilepsie que ceux présentant des crises focale (40.2% versus 31.2%, $p = 0.001$) [236]. Une autre étude plus récente menée en Israël et qui a inclus 211 familles multiplex, a rapporté une prédominance des crises généralisées qui étaient trois fois plus fréquentes que les crises focales [237]. En effet, malgré l'existence d'une part génétique indéniable dans certaines formes familiales d'épilepsie focale, la contribution de ces facteurs reste relativement modeste par rapport à ce qui est rapporté dans les épilepsies généralisées [102].

Onze probants (27.5%) avaient des antécédents personnels de convulsions fébriles (CF) et 75% d'entre eux avaient une histoire familiale de CF. Ces résultats concordent avec ceux d'Abou Khalil qui a constaté que les patients épileptiques ayant des antécédents personnels de CF étaient plus susceptibles d'avoir une histoire familiale de CF que ceux n'en ayant pas ($p < 10^{-6}$) [236]. De manière intéressante, Hwang et al. ont identifié l'histoire familiale d'épilepsie comme facteur prédictif de survenue de crises non provoquées chez les enfants qui ont présenté leur première CF après l'âge de trois ans ($p = 0.019$) [238].

Soixante dix pour cent de nos cas-index étaient libres de crises durant les trois mois précédant l'enquête, alors que 30% continuaient à présenter des crises. Ceci peut être en partie expliqué par la fréquence non négligeable de syndromes épileptiques myocloniques dans notre cohorte (EMJ ou EMP1), connus pour être pharmaco-résistants ou pharmacodépendants. En effet, dans une étude récente que nous avons menée au service de neurologie du CHU d'Oran, et qui avait pour objectifs d'identifier les facteurs prédictifs précoces d'épilepsie réfractaire, les crises myocloniques étaient significativement prédictives de pharmacorésistance. Les autres facteurs identifiés étaient la fréquence élevée des crises en début d'évolution, un état de mal inaugural, et l'étiologie de l'épilepsie (**Annexe 1**) [239]. Par ailleurs, la persistance des crises pourrait refléter une mauvaise observance thérapeutique de certains patients faisant face à des difficultés financières et à un niveau socio-économique très bas.

Des comorbidités psychiatriques étaient présentes chez 12 probants (30%). Plusieurs études récentes ont montré un lien étroit entre l'épilepsie et divers troubles neuropsychiatriques chez l'adulte et même chez l'enfant [240-247]. Les troubles de l'humeur se voient chez 25 à 48% des épileptiques et les troubles anxieux dans 14 à 31% des cas [248-250]. Par ailleurs, il existe une relation bidirectionnelle entre l'épilepsie et la dépression [251]. En effet, les épisodes dépressifs majeurs chez les épileptiques varient entre 11 et 62% versus 3.7 à 6.7% dans la population générale [252]. En outre, le pourcentage de décès par suicide chez les patients épileptiques varie de 11 à 33%, avec une moyenne générale de 11,5% [253]. L'association avec la psychose est également surprenante; la prévalence de la psychose interictale chez les épileptiques est estimée à 19.4% dans les épilepsies généralisées et à 15.2% dans l'épilepsie du lobe temporal [254]. Il est indispensable de dépister ces comorbidités chez les patients épileptiques au moyen d'échelles standardisées et de questionnaires validés afin d'améliorer et de personnaliser la prise en charge de ces malades [255-260].

Il est actuellement admis que certains désordres psychiatriques partagent des variants génétiques communs avec l'épilepsie [261]. En effet, les études génétiques de recherche de variations en nombre de copies d'ADN (CNV), ont montré que dans certains cas, le même CNV se voit dans les affections psychiatriques et dans l'épilepsie [262]. Plusieurs études ont démontré une association entre des CNV récurrents rares avec l'épilepsie, l'autisme, la schizophrénie, le retard mental et le trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH) [263, 264]. Plus intéressante encore est l'observation qu'un même CNV peut contribuer au développement de plus d'un type de troubles neuropsychiatriques [265]. Cela a conduit à suggérer que la schizophrénie, l'autisme et la déficience intellectuelle sont plutôt des phénotypes chevauchants d'une anomalie commune du développement neural [266, 267].

4.3. Discussion des modes de transmission

Notre cohorte comprenait 13 familles avec épilepsie du lobe temporal (ELT): sept familles présentaient des caractéristiques compatibles avec une épilepsie mésiale du lobe temporal (crises focales simples avec des impressions de déjà-vu parfois associées à des vertiges ou des nausées, crises focales complexes avec suspension de la conscience) et six familles ont été diagnostiquées avec une épilepsie autosomique dominante avec crises à symptomatologie auditive (*autosomal dominant temporal lobe*

epilepsy with auditory features ADEAF). Nous avons conclu à une transmission autosomique dominante (AD) dans 76.9% de ces familles (**Tableau 11**). En effet, il est communément admis que ADEAF suit un mode d'hérédité AD avec pénétrance incomplète. Ainsi, en analysant les données provenant de 24 familles avec ADEAF et mutations du gène leucine-riche glioma inactivé (*LGI*), Rosanoff et Ottman ont constaté que la pénétrance globale de la maladie était de 67% et qu'elle ne variait pas en fonction du type de mutation ou de sa localisation dans le gène [268]. Hedera et al. ont décrit une famille caucasienne de quatre générations, dans laquelle onze individus présentaient des caractéristiques compatibles avec une épilepsie mésiale. Trois individus indemnes avaient des descendants présentant le phénotype, suggérant une transmission AD avec pénétrance incomplète [269].

L'épilepsie myoclonique juvénile (EMJ) a été diagnostiquée dans neuf familles. Les pedigrees étaient compatibles avec une transmission AD probable dans trois familles et autosomique récessive (AR) dans quatre familles. Dans les deux familles restantes, l'analyse des pedigrees suggérait la possibilité de plus d'un mode de transmission. A ce jour, le mode exact de transmission de l'EMJ n'est pas connu [270]; les rares études familiales et génétiques menées ont abouti à des résultats plutôt contradictoires : transmission AD, AR, maternelle ou complexe [229].

Nous avons posé le diagnostic d'épilepsie myoclonique progressive de type 1 (EMP1) chez trois familles avec une transmission sur un mode AR. EMP1 ou maladie d'Unverricht-Lundborg (*Unverricht-Lundborg Disease* ULD) est une maladie neurodégénérative AR, caractérisée par des myoclonies d'action, des crises tonico-cloniques, une ataxie cérébelleuse progressive et une préservation de la cognition [271]. Des mutations dans le gène codant pour la cystatine B (*CSTB*), un inhibiteur de la cystéine protéase, sont responsables de l'anomalie génétique sous-tendant l'EMP1 [272].

Dans notre population d'étude, il y avait 9 familles avec phénotypes compatibles avec une épilepsie génétique avec convulsions fébriles Plus (EGCF+), une épilepsie à expressivité extrêmement variable au sein d'une même famille. Le mode de transmission semblait AD dans cinq d'entre elles, et AR dans deux autres. À notre connaissance, toutes les familles EGCF+ décrites dans la base de données OMIM¹⁵, suivent un mode de transmission exclusivement AD [273]. Récemment, Belhedi et al. ont

¹⁵ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> mise à jour le 10/01/2016

décrit la première famille Tunisienne consanguine présentant une EGCF+ avec un mode de transmission AR. L'étude de liaison a permis d'identifier un nouveau locus sur le chromosome 22q13.31 [274]. Une autre famille d'origine Marocaine avec transmission AR de la maladie a également été décrite avec liaison en 8q12.1-q13.2 [275].

Le phénotype d'épilepsie absence de l'enfant à transmission AR a été identifié chez une seule famille consanguine avec trois enfants atteints. Une forme familiale d'épilepsie absence de l'enfant avec un mode de transmission AR a également été rapportée dans cinq familles tunisiennes consanguines [276].

Deux de nos familles (5%) avaient une épilepsie syndromique avec une transmission AR probable, pointant vers le rôle important de la consanguinité dans l'expression de variants récessifs rares.

5. Limites de l'étude

Notre étude a plusieurs limites notamment la taille relativement petite de l'échantillon. Elle a porté sur une population recrutée dans un Centre Hospitalier, pouvant ne pas être représentative du large spectre des épilepsies familiales, ce qui constitue un biais de sélection. De plus, l'absence de réalisation des tests de QI pour l'appréciation du degré du retard mental et la difficulté de recueil des informations concernant le développement psychomoteur des patients, représentent des biais d'information supplémentaires.

6. Conclusion

Notre étude a révélé l'existence de larges familles algériennes multiplex avec plusieurs individus atteints d'épilepsie, confortant la composante génétique de cette maladie. Dans la majorité des cas, le mode de transmission est autosomique dominant avec pénétrance réduite, ou autosomique récessif. Le taux non négligeable d'unions endogames dans cette cohorte nous a incités à mener une autre étude analytique visant à investiguer la relation entre la consanguinité et l'épilepsie et à rechercher une agrégation familiale de cette affection dans une population d'origine Algérienne. Cette étude est rapportée dans le chapitre qui suit.

CHAPITRE III : Consanguinité et agrégation familiale de l'épilepsie

Résumé

Introduction : Le rôle important attribué à la consanguinité dans le développement de certaines maladies à déterminisme génétique est bien documenté ; cependant son association à l'épilepsie a été suggérée par certaines études et réfutée par d'autres. La présente étude cas-témoins a pour objectifs d'étudier la relation entre l'épilepsie et la consanguinité, de rechercher une agrégation familiale de l'épilepsie, et d'identifier les facteurs de risque associés à l'épilepsie dans une population de l'ouest Algérien.

Matériels et méthodes : Ont été inclus des épileptiques non apparentés âgés de plus de 16 ans, suivis au service de neurologie du CHU d'Oran et consultant entre Octobre 2013 et Mars 2014. Des témoins appariés au sexe et à l'âge ont été sélectionnés parmi les patients suivis au même service pour une autre pathologie neurologique. Les variables étudiées étaient : la consanguinité parentale, l'histoire familiale d'épilepsie, le retard mental, le déficit neurologique, les antécédents de convulsions fébriles, de traumatisme crânien sévère, de pathologie cérébro-vasculaire, de complications périnatales, d'infection du système nerveux central et l'alcoolisme chronique.

Résultats : 101 cas et 202 témoins ont participé à l'étude. L'analyse multivariée par régression logistique a retenu cinq facteurs significativement associés à l'épilepsie dans le modèle final: la consanguinité parentale au premier degré ($p=0.029$), une histoire familiale d'épilepsie chez un apparenté au premier degré ($p<10^{-4}$), des antécédents de convulsions fébriles ($p=0.005$), de traumatisme crânien sévère ($p=0.020$), et le retard mental ($p=0.006$).

Conclusion : Cette étude a permis d'identifier les facteurs de risque associés à l'épilepsie et de démontrer une agrégation familiale de l'épilepsie dans une population de l'ouest algérien. La mise en place d'une stratégie de prévention et de sensibilisation de la population sur l'impact des mariages consanguins s'avère nécessaire.

Mots clés : Consanguinité, épilepsie, facteurs de risque, Algérie.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans « Epilepsy Research » **(Annexe 1)**.

CHAPTER III: Consanguinity and familial aggregation of epilepsy

Abstract

Purpose: The role attributed to inbreeding in the development of genetically determined diseases has been well documented. However, its association with epilepsy has been suggested by some studies and refuted by others. The goal of this case-control study was to identify the significance of consanguinity and other risk factors of epilepsy, and to seek familial aggregation of epilepsy in a population of western Algeria.

Materials and methods: Unrelated epileptic patients upwards of 16 years, who attended the Neurology Department between October 2013 and March 2014, were included in the study. Controls matched for age and sex, were selected among non-epileptic patients attending the same department during the same period for another neurological disorder. The risk factors evaluated were: consanguinity, family history of epilepsy, perinatal complications, infection of the central nervous system, mental retardation, neurological impairment, history of febrile seizures, severe head trauma, cerebrovascular diseases, and addiction.

Results: 101 cases and 202 controls participated in the study. Multivariate logistic regression identified five factors significantly associated with epilepsy: first-degree of consanguinity ($p=0.029$), history of epilepsy in first-degree relatives ($p<10^{-4}$), antecedent of febrile seizures ($p=0.005$), severe head injury ($p=0.020$) and mental retardation ($p=0.006$).

Conclusion: This case-control study identified risk factors associated with epilepsy, and demonstrated familial aggregation of epilepsy in a population of western Algeria. The implementation of a strategy for prevention and awareness of the impact of consanguineous marriages as well as genetic counselling for couples with a family history of epilepsy are needed.

Key words: Consanguinity, epilepsy, risk factors, Algeria.

This study has been published in « Epilepsy Research » **(Appendix 1)**.

1. Introduction

La consanguinité est une relation entre deux personnes qui partagent un ancêtre commun. En d'autres termes, les mariages consanguins se réfèrent à des unions contractées entre des individus biologiquement liés [277]. Ces unions demeurent largement répandues notamment au Moyen Orient et au Maghreb où elles sont favorisées par les traditions et les habitudes culturelles (**Figure 13**) [278, 279]. La consanguinité est associée à une augmentation du taux de malformations congénitales et de mortalité périnatale [280]. En outre, les enfants issus d'unions consanguines sont à risque accru de maladies récessives en raison de l'expression de mutations génétiques autosomiques récessives héritées d'un ancêtre commun. Plus la relation biologique entre les parents est forte, plus grande est la probabilité que leur descendance hérite de copies identiques d'un ou plusieurs gènes récessifs pathogènes [281].

Au cours des trois dernières décennies, plusieurs études cas-témoins visant à rechercher les facteurs de risque de l'épilepsie ont été menées [28, 48, 50, 282]. Bien que ces études aient identifié une série de facteurs, les résultats étaient souvent mitigés. Alors que les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et les traumatismes crâniens ont été incriminés chez l'adulte dans les pays industrialisés [283, 284], l'épilepsie a été associée aux maladies parasitaires, aux complications périnatales et aux infections du système nerveux central (SNC) dans les pays en voie de développement [51, 282, 285].

L'association à la consanguinité a été très peu étudiée dans les pays développés probablement en raison de la rareté de l'endogamie dans ces populations (0,2% aux USA- 0,8% en France- 1,1% en Italie et 0,2% en Australie) [286, 287]. Dans le monde arabe où les mariages consanguins au premier degré représentent plus de 50% de l'ensemble des unions [288-291], l'association à l'épilepsie a été suggérée par certaines études [292-296], et réfutée par d'autres [223, 297-299].

En Algérie où la prévalence de l'épilepsie est estimée à 8.32/1000 [31] et le taux de consanguinité à 38%¹⁶, très peu d'études épidémiologiques sur l'épilepsie ont été publiées et aucune n'a évalué l'association à des facteurs de risque.

¹⁶ www.forem.dz. Mise à jour le 07/01/2016

Compte tenu du rôle important attribué à la consanguinité dans le développement de malformations congénitales et de maladies à déterminisme génétique telles que les hémoglobinopathies, la perte héréditaire de l'audition, le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (*G6PD*), les encéphalopathies et la schizophrénie [214]; et du fait de l'hétérogénéité des données disponibles, il nous est apparu nécessaire de réaliser une enquête épidémiologique visant à investiguer la relation entre la consanguinité et l'épilepsie, à rechercher une agrégation familiale de l'épilepsie, et à identifier les autres facteurs de risque associés à l'épilepsie dans une population de l'ouest Algérien.

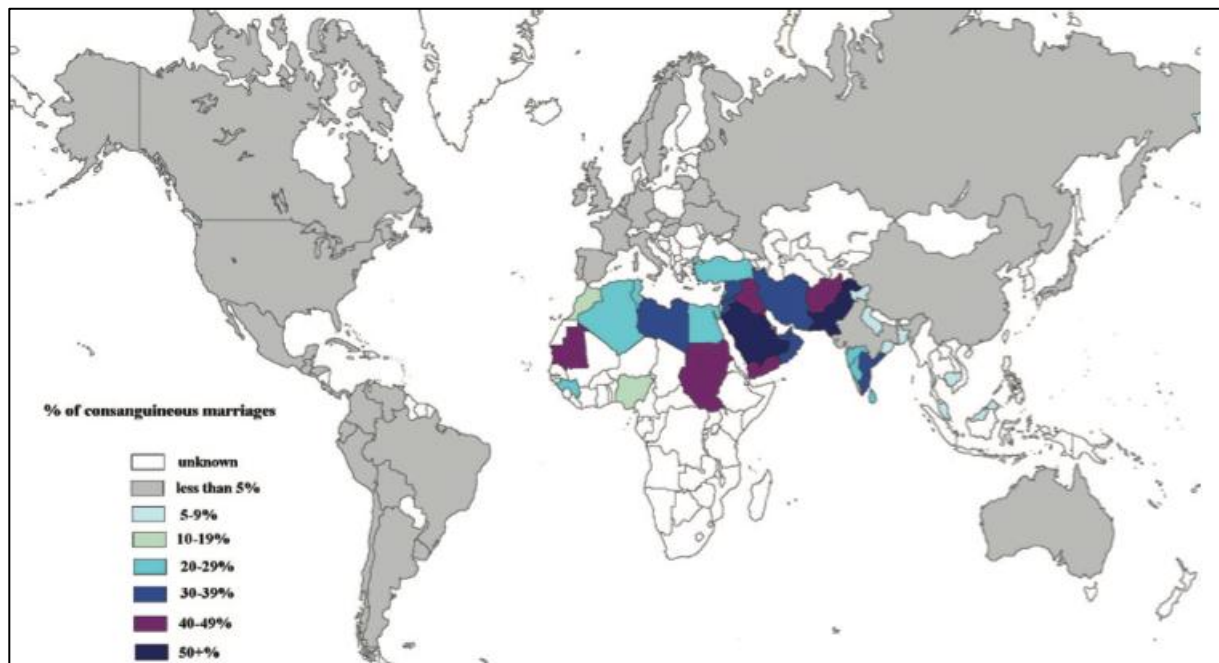


Figure 13: Carte géographique représentant la répartition du taux de consanguinité dans le monde [281]

2. Matériels et méthodes

2.1. Type d'enquête

Il s'agit d'une étude analytique, rétrospective, de type cas-témoins menée au service de Neurologie du CHU d'Oran du 1^{er} Octobre 2013 au 31 Mars 2014.

2.2. Population d'étude

Le choix de la population d'étude s'est porté sur les sujets non apparentés âgés de plus de 16 ans, suivis entre 1989 et 2014 pour maladie épileptique. N'ont pas été inclus les sujets présentant uniquement des convulsions fébriles, les sujets adoptés et ceux présentant des troubles mnésiques.

Des témoins sans antécédents personnels d'épilepsie, appariés selon l'âge et le sexe ont été sélectionnés parmi les malades suivis au même service et durant la même période, pour une autre maladie neurologique.

Le nombre de sujets nécessaires (deux témoins par cas) a été calculé par le logiciel BiostaTGV pour un risque de première espèce à 5%, une puissance à 80%, en prenant comme référence un Odds Ratio (OR) de 2.11 rapporté par une étude Indienne et un pourcentage de consanguinité à Oran de 18% selon les données de la Fondation Nationale pour la Promotion de la Santé et le Développement de la Recherche en 2007.

L'enquête a été réalisée au moyen d'un questionnaire validé par l'Institut d'Epidémiologie neurologique et de Neurologie Tropicale de Limoges, soutenu par la Ligue Internationale Contre l'Epilepsie (**Annexe 2**) [203]. Les données ont été recueillies à travers plusieurs consultations et un examen des dossiers.

2.3. Définitions

- Les syndromes et les crises épileptiques ont été définis selon les critères de la LICE 2010 [74].
- L'âge de début de la maladie a été défini comme l'âge où le patient ou sa famille ont remarqué la survenue de la première crise.
- La consanguinité, l'histoire familiale d'épilepsie, les convulsions fébriles et le retard mental ont déjà été définis dans le chapitre II.
- Un traumatisme crânien a été considéré comme sévère s'il s'est accompagné d'une perte de connaissance durant plus de 24 heures, d'un hématome sous dural ou de contusions cérébrales [300].
- Le diagnostic d'AVC s'est basé sur l'interrogatoire, l'examen neurologique et les résultats de l'imagerie cérébrale.
- La notion d'infection du SNC a été confirmée par les données de l'étude du liquide cébro-spinal et les résultats de l'imagerie cérébrale figurant sur le dossier.

- Les complications périnatales incluaient la notion de survenue d'une détresse respiratoire à la naissance, ou de séjour en réanimation.
- La notion d'alcoolisme chronique a été définie par une consommation d'au moins trois verres de boisson alcoolisée par jour depuis au moins un an.
- La notion de consommation de drogues illicites a été rapportée selon les dires du sujet enquêté.

Un formulaire de consentement a été préparé avant l'enquête, et chaque sujet a été informé sur les modalités de l'étude et les différentes évaluations prévues.

2.4. Plan d'analyse

Les données collectées ont été codées et saisies sur logiciel SPSS version 21.0 pour Mac OS X. Nous avons d'abord procédé à une analyse descriptive des cas, faisant appel au calcul des moyennes et des écarts-types pour les variables quantitatives et des pourcentages pour les variables qualitatives. Dans l'analyse univariée, les rapports des cotes (OR) et leur intervalle de confiance (IC) à 95% ont été calculés par le Chi2 de Pearson et le test de Fisher pour un seuil de significativité correspondant à $p=0.05$.

Afin d'identifier les facteurs de risque associés à l'épilepsie, une analyse par régression logistique a été réalisée en choisissant comme variable résultat, la variable dichotomique « être épileptique ». Le modèle initial incluait l'ensemble des facteurs statistiquement liés à l'épilepsie au seuil de 20 %. La sélection des variables restant dans le modèle final a été faite selon une stratégie descendante de Wald. Les différents facteurs ont été retenus au seuil de 5%.

3. Résultats

Au total, 303 sujets dont 101 cas et 202 témoins ont été inclus dans cette étude. L'âge moyen était de 37 ans et six mois \pm 14 ans avec des extrêmes allant de 16 à 67 ans. Trente huit sujets (9.2%) étaient âgés de moins de 20 ans, et vingt trois (7.6%) de plus de 60 ans. Le sexe masculin était le plus représenté (57%) avec un ratio de 1.29. La durée moyenne de suivi était de 7 ans et 4 mois \pm 4 ans, avec un minimum de deux ans et une durée de suivi maximale de 25 ans. Le taux de consanguinité parentale était estimé à 36.6% chez les cas et 17.3% dans le groupe des témoins. Le test du Chi2 a

révélé une différence statistiquement significative entre les cas et les témoins quant au pourcentage d'apparentés au premier degrés atteints d'épilepsie ($p < 10^{-4}$).

3.1. Résultats de l'analyse descriptive des cas

L'âge moyen de survenue de la première crise était de 17 ± 9 ans avec des extrêmes allant de 6 à 62 ans. **La figure 14** illustre la répartition des types de crises chez les cas.

La répartition de nos patients en fonction de la classification électro-clinique des syndromes épileptiques est résumée dans le **tableau 10**.

Tableau 10: Classification syndromique des cas et évolution sous traitement

	M	F	total	Pourcentage
Classification syndromique				
Génétique	10	8	18	17.82
Epilepsie familiale du lobe temporal	2	2	4	3.96
Epilepsie myoclonique progressive	2	2	4	3.96
Epilepsie génétique avec convulsions fébriles Plus	2	1	3	2.97
Epilepsie myoclonique juvénile	3	1	4	3.96
Epilepsie absence de l'adolescent	1	2	3	2.97
Structurelle/métabolique	19	16	35	34.65
Origine inconnue	19	22	48	47.52
Nombre de médicaments en cours				
Aucun (sevrage)	2	2	4	4
Monothérapie	39	31	70	69.3
Bithérapie	13	10	23	22.7
Polythérapie	2	2	4	4
Médicaments les plus prescrits				
Valproate®	15	17	32	31.5
Carbamazépine®	16	8	24	23.6
Phénobarbital®	7	7	14	13.6
Lévétiracétam®	12	9	21	21.5
Lamotrigine®	8	2	10	9.8
Evolution				
Crises quotidiennes	4	3	7	6.9
Hebdomadaires	6	5	11	10.9
Mensuelles	22	18	40	39.6
Trimestrielles	10	9	19	18.8
Libre de crises depuis au moins six mois	13	11	24	23.8
Etat de mal épileptique	6	2	8	7.9
Premier EEG				
Normal	10	16	26	25.6
Anomalies intercritiques	52	23	75	74.4
IRM				
Normale	40	34	74	73.3
Anormale	19	8	27	26.7

M : masculin, F : féminin, EEG : électroencéphalographie, IRM : imagerie par résonance magnétique.

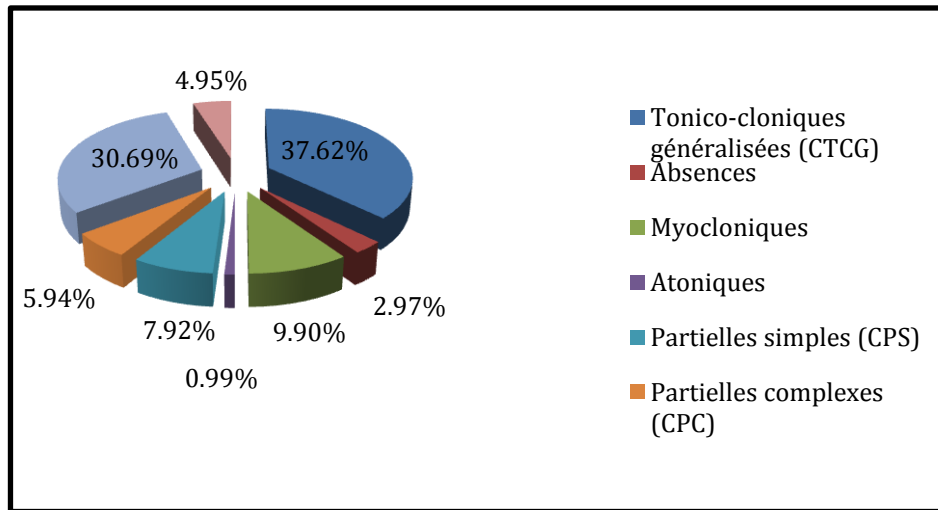


Figure 14: Répartition des types de crises chez les cas

3.2. Résultats de l'analyse univariée

L'analyse univariée a retenu six co-variables associées à l'épilepsie : la consanguinité parentale au premier et au second degré, une histoire familiale d'épilepsie chez les apparentés au premier et au second degré, des antécédents de convulsions fébriles, des antécédents d'infection du SNC, de traumatisme crânien sévère, et le retard mental (**Tableau 11**). Ces facteurs ont été introduits dans des modèles de régression logistique multiple avec une probabilité d'entrée fixée à 0.05, et de sortie à 0.10.

Tableau 11: Résultats de l'analyse univariée par régression logistique

Variables avec p<20%	OR bruts	IC 95%	P
Sexe			
Féminin	1	-	
Masculin	1.20	[0.74-1.93]	NS
Consanguinité			
Non	1	-	
1^{er} degré	2.71	[1.48-4.94]	0.001
2^{ème} degré	2.93	[1.08-7.94]	0.034
Histoire familiale d'épilepsie			
Non	1	-	
Apparenté au 1^{er} degré	5.37	[2.64-10.91]	< 0.000
Apparenté au 2^{ème} degré	3.87	[1.27-11.81]	0.017
Apparenté au 3 ^{ème} degré	1.77	[0.68-4.74]	NS
Complications périnatales			
Non	1	-	
Oui	1.60	[0,58-4,42]	NS
Maladie cérébro-vasculaire			
Non	1	-	
Oui	1.18	[0.45-3.10]	NS
Convulsions fébriles			
Non	1	-	
Oui	4.81	[1.62-14.27]	0.005
Infection du SNC			
Non	1	-	
Oui	5.21	[1.21-27.33]	0.051
Traumatisme crânien sévère			
Non	1	-	
Oui	2.56	[1.10-5.95]	0.028
Retard mental			
Non	1	-	
Oui	14.62	[3.23-66.20]	< 0.000
Anomalies à l'examen neurologique			
Non	1	-	
Oui	1.10	[0.53-2.25]	NS
Alcoolisme chronique			
Non	1	-	
Oui	0.28	[0.03-1.81]	NS
Consommation de drogues illicites			
Non	1	-	
Oui	6.15	[0.63-59.91]	0.19

Les résultats significatifs sont présentés en gras.

SNC : système nerveux central ; NS : non significatif.

3.3. Résultats de l'analyse multivariée

L'analyse multivariée a retenu cinq facteurs significativement associés à l'épilepsie dans le modèle final : la consanguinité au premier degré, avoir un apparenté au premier degré atteint d'épilepsie, avoir des antécédents personnels de convulsions fébriles, de traumatisme crânien sévère, et être atteint d'un retard mental (**Tableau 12**).

Tableau 12: Résultats de l'analyse multivariée par régression logistique

Variables avec p<5%	OR ajusté	IC 95%	p
Consanguinité			
Non	1	-	
1^{er} degré	2.15	[1.08-4.30]	0.029
2 ^{ème} degré	2.31	[0.77-6.91]	NS
Histoire familiale d'épilepsie			
Non	1	-	
Apparenté au 1^{er} degré	4.03	[1.88-8.66]	< 0.000
Apparenté au 2 ^{ème} degré	2.90	[0.91-9.25]	NS
Apparenté au 3 ^{ème} degré	1.20	[0.40-3.61]	NS
Convulsions fébriles			
Non	1	-	
Oui	5.38	[1.65-17.56]	0.005
Traumatisme crânien sévère			
Non	1	-	
Oui	2.94	[1.18-7.27]	0.020
Retard mental			
Non	1	-	
Oui	9.32	[1.91-45.5]	0.006

Les résultats significatifs sont présentés en gras.

NS : non significatif.

4. Discussion

La détermination de facteurs de risque de l'épilepsie propres à chaque population peut contribuer à lutter contre cette affection et à adapter la prise en charge des patients.

Dans la présente étude, le sex-ratio est de 1.29. Une prédominance masculine similaire a déjà été rapportée par des études menées en Tunisie et en Arabie Saoudite [301, 302]. Nous pensons que cette prédominance est en rapport avec des notions culturelles, surtout en milieux rural, qui font que les garçons plus valorisés que les filles, ont plus facilement accès aux soins.

Les études antérieures qui ont investigué la relation entre la consanguinité et l'épilepsie ont abouti à des résultats divergents. Ainsi en Iran, il a été démontré que le

risque d'épilepsie était multiplié par un facteur 2.2 si les parents étaient cousins au premier degré, et par 3.8 s'ils l'étaient au second degré [51]. Au Liban, Choueiri et al. ont comparé les taux de consanguinité dans trois groupes différents : le premier consistait en des individus avec crises occasionnelles, le deuxième incluait des sujets avec convulsions fébriles et le dernier comportait des patients épileptiques. Les taux de consanguinité parentale étaient estimés à 0%, 4% et 19.5% respectivement [295]. Une autre étude menée en Malaisie a également démontré une augmentation du risque d'épilepsie idiopathique ($p=0.02$) et cryptogénique ($p=0.001$) en cas de consanguinité parentale [303]. Ces résultats sont en contraste avec ceux de Daoud et al. qui n'ont retrouvé aucune association significative dans la population Jordanienne [223]. La variabilité des méthodes d'échantillonnage, des critères d'inclusion et des stratégies d'analyses statistiques pourrait expliquer ces résultats controversés.

Dans notre étude, la consanguinité parentale au premier degré semble augmenter le risque de développer une épilepsie mono- ou polygénique et ceci pour plusieurs raisons :

- D'abord, certains syndromes épileptiques dans notre cohorte sont probablement monogéniques et transmis selon un mode autosomique récessif. En effet, il est communément admis que les unions endogames augmentent le taux d'homozygotie selon le principe d'identité par descendance (*identical by descent* IBD) [304].
- D'autre part, les progrès récents dans le domaine de la génétique ont démontré que les épilepsies monogéniques étaient rares, ne représentant que 1 à 2% de toutes les épilepsies génétiques, alors que les épilepsies polygéniques telles que l'épilepsie absence de l'enfant et de l'adolescent et l'épilepsie myoclonique juvénile, sont de loin les plus fréquentes [305-307]. Même dans ces formes d'épilepsie, la consanguinité pourrait jouer un rôle important. En effet, de nombreuses études ont démontré l'effet de l'endogamie sur plusieurs traits à composante polygénique tels que la résistance aux infections (tuberculose et hépatite B), la régulation de la pression artérielle ainsi que certaines maladies génétiques à déclaration tardive [308]. Cet effet serait plus important si les allèles mis en cause sont récessifs et rares [280].

Ceci dit, le taux élevé de consanguinité parentale retrouvé dans le groupe des cas (36.6%) par rapport aux témoins (17.3%) pourrait être interprété autrement. En effet, nos résultats pourraient refléter la stigmatisation sociale des épileptiques en Algérie, rendant plus pratique de contracter des unions intrafamiliales.

Dans notre étude, l'épilepsie était plus fréquente chez les apparentés au premier degré dans le groupe des cas (parents, fratrie, enfants) que chez les apparentés au premier degré de témoins (Chi² de Pearson, $p < 10^{-4}$). Ces résultats confortent l'hypothèse d'une agrégation familiale de l'épilepsie dans la population d'Oran.

Par ailleurs, la susceptibilité génétique à l'épilepsie a été bien documentée [95, 98, 167] et peut expliquer la forte association que nous avons retrouvée avec l'histoire familiale d'épilepsie et qui rejoint les résultats d'études menées en Iran [51], en Jordanie [223], en Tanzanie [224], au Kenya [225] et en Inde [226, 227]. Cependant, il est communément admis que les épilepsies sont des maladies multifactorielles, et par conséquent, les membres de la même famille pourraient partager d'autres facteurs non génétiques tels que le niveau socio-économique, l'exposition aux maladies infectieuses, la malnutrition et la consommation d'alcool ou de drogues [309, 310].

Nous avons également retrouvé une forte association entre les antécédents de convulsions fébriles et le risque de développer une épilepsie, ce qui concorde avec les résultats de la littérature [223, 297, 311, 312]. Cette association ne reflète pas forcément une relation de cause à effet, mais peut signifier que les convulsions fébriles représentent une expression précoce d'un seuil épileptogène bas chez des sujets génétiquement prédisposés à l'épilepsie. En effet, les convulsions fébriles peuvent constituer la porte d'entrée de plusieurs syndromes épileptiques d'ordre génétique tels que l'épilepsie génétique avec convulsions fébriles plus (EGCF+) [313], l'épilepsie myoclonique sévère du nourrisson ou syndrome de Dravet [314, 315], et l'épilepsie du lobe temporal [236, 316].

Les résultats de la présente étude concernant l'association fortement positive du retard mental (RM) à l'épilepsie ($p = 0.006$) confirment les données de la littérature qui rapportent une relation bidirectionnelle entre ces deux affections. En effet, plusieurs études ont rapporté une augmentation de la prévalence de l'épilepsie parmi les sujets présentant un RM par rapport à la population générale avec des taux allant de 14 à 44% [317]. D'autres études ont montré une augmentation du taux de RM chez les enfants

épileptiques par rapport aux enfants sains [318, 319]. Cette forte association peut être expliquée par l'existence de facteurs génétiques favorisant la vulnérabilité à ces deux conditions simultanément. En effet, les entités syndromiques avec formes monogéniques d'épilepsie et RM représentent des situations caractéristiques de cette comorbidité [320]. Par ailleurs, le déclin cognitif observé chez certains sujets épileptiques pourrait être attribué aux polythérapies antiépileptiques administrées à un âge précoce [321], aux traumatismes crâniens répétés, et aux épisodes anoxiques lors des états de mal épileptiques [236, 322, 323].

L'incidence de l'épilepsie après un traumatisme crânien a été étudiée chez l'adulte mais aussi chez l'enfant [300, 324-327]. Ces études rapportent un risque élevé d'épilepsie après un traumatisme crânien sévère. De même, dans notre étude, les sujets ayant des antécédents de traumatisme crânien sévère ont un risque accru de développer l'épilepsie comparativement au groupe contrôle ($p=0.02$). Nos résultats sont en contradiction avec ceux de Yemadje et al., qui n'ont pas trouvé d'association significative. Cependant, ils ont défini la notion de traumatisme crânien comme des blessures crâniennes après accident de la route ou de la guerre, avec ou sans coma. Cette définition large pourrait expliquer la divergence des résultats [299].

Contrairement à ce qui a été rapporté par des études antérieures [223, 226], nous n'avons pas retrouvé d'association significative entre l'épilepsie et les complications périnatales. Dans notre étude 66.3% des cas et 68.3% des témoins sont nés dans des structures sanitaires adaptées qu'elle soient privées ou publiques, ce qui pourrait justifier nos résultats.

Les crises d'épilepsie d'origine vasculaire ne sont pas exceptionnelles et représentent même la première cause d'épilepsie débutant après l'âge de 60 ans [328]. La notion d'épilepsie vasculaire fut conceptualisée par John Hughlings Jackson en 1864 et William Gowers en 1885, ce dernier ayant rapporté une série de 66 cas de ce qu'il baptisa «*l'épilepsie post-hémiplégique*» [329]. Depuis les travaux de ces pionniers, plusieurs études épidémiologiques ont démontré que les AVC étaient la principale cause d'épilepsie débutant après l'âge de 60 ans [330, 331]. Hors, tout comme Ogguniyi et al., nous n'avons pas constaté de différence significative entre les deux groupes quant aux maladies cérébro-vasculaires [49]. Nous incriminons le fait que l'effectif de la tranche d'âge « 60 ans et plus » ne représente que 7.4% de notre population d'étude. Il serait

intéressant de mener des études portant sur des sujets avec épilepsie tardive pour apprécier la part de responsabilité des AVC dans la survenue de l'épilepsie.

Yemadje et al ont retrouvé une forte association entre l'épilepsie et les infections du SNC mais comme l'a souligné l'auteur, le Bénin est une zone d'endémie et la population est exposée à une automédication inappropriée [299]. Annegers et coll. ont rapporté une augmentation du risque d'épilepsie de cinq fois en cas de méningite bactérienne; ce risque n'était pas augmenté en cas de méningite aseptique [332]. Par ailleurs, dans leur analyse multivariée, Cansu et al. ont retrouvé une association significative ($p=0.045$) entre l'épilepsie et les infections du SNC, la méningite aseptique n'étant pas incluse [297]. Dans notre étude, malgré que l'infection du SNC était cinq fois plus fréquente chez les cas que chez les témoins, l'association n'était pas statistiquement significative. Ceci est probablement dû au fait que tous les types de méningite (bactérienne et virale) aient été inclus.

Nous n'avons pas retrouvé d'association entre l'alcoolisme chronique, la consommation de drogues illicites et l'épilepsie. Nous pensons que dans notre échantillon, le pourcentage d'addictes à l'alcool et aux drogues récréatives est largement sous-estimé ; le sujet étant encore considéré tabou dans notre société.

Contrairement à ce qui a été rapporté par d'autres études [297], nous n'avons pas retrouvé d'association entre le déficit neurologique et l'épilepsie. Ceci est probablement dû au fait que les témoins n'étaient pas des sujets sains. En effet, ils ont été recrutés dans un service de neurologie, où ils étaient déjà suivis pour des maladies chroniques pourvoyeuses de déficit neurologique.

5. Limites de l'étude

Les limites de notre étude doivent être soulignées. Cette étude a été menée dans une structure sanitaire hospitalière et était donc sujette à un biais de sélection. Elle était rétrospective, et était donc exposée à des biais dans la collecte des données. Bien que nous ayons fourni tous les efforts pour compléter et contre-vérifier l'exactitude des informations recueillies auprès des patients et de leur entourage, avec les informations mentionnées sur les dossiers médicaux, il a été notoirement difficile d'obtenir l'historique des naissances, en particulier chez les patients âgés, ce qui a exposé l'étude à un biais de mémorisation.

6. Conclusion

La consanguinité parentale au premier degré, les antécédents familiaux d'épilepsie, les antécédents de convulsions fébriles, le traumatisme crânien sévère et le retard mental sont des facteurs de risque de l'épilepsie chez les patients fréquentant le service de neurologie du CHU d'Oran. Nos résultats confortent l'hypothèse d'une interaction entre une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux acquis dans la pathogenèse de l'épilepsie. Ils mettent également en évidence une agrégation familiale de l'épilepsie dans la population de l'ouest Algérien. Ces résultats méritent une attention particulière et nécessitent la mise en œuvre d'une stratégie de prévention et de sensibilisation sur l'impact des mariages consanguins. De même, le conseil génétique pour les couples ayant des antécédents familiaux d'épilepsie est primordial. Une telle stratégie a été adoptée en Iran pour les familles à haut risque de Béta-Thalassémie, et a permis une diminution du taux d'unions endogames de 16.4% en 22 ans [333].

Sur la base des résultats de cette étude, nous avons mis en place un programme de recherche visant à identifier les variants génétiques de vulnérabilité à l'épilepsie, principalement chez des familles consanguines où plusieurs membres sont atteints. L'identification de ces polymorphismes génétiques peut mener à une meilleure compréhension des mécanismes de l'épileptogénèse, et à un diagnostic plus précoce. Les résultats des études génétiques sont présentés dans les chapitres suivants.

CHAPITRE IV : Mutation du gène *GAL* et épilepsie du lobe temporal

Résumé

L'épilepsie du lobe temporal (ELT) est un syndrome épileptique commun aux étiologies complexes. En dépit de la mise en évidence d'une participation de facteurs génétiques, les bases génétiques de l'ELT demeurent inconnues. Le rôle du neuropeptide galanine (*GAL*) dans la régulation du processus d'épileptogénèse a été démontré il y a plus de deux décennies sur des modèles animaux, mais à ce jour, aucune mutation pathogène du gène *GAL* n'a été décrite chez l'Homme. Dans la présente étude, nous rapportons une famille composée de jumeaux monozygotes atteints d'ELT, et de deux collatéraux sains, nés de parents indemnes. Le séquençage exonique a identifié une mutation de novo (p.A39E) dans le gène *GAL* chez les jumeaux. Les analyses fonctionnelles ont révélé que le peptide muté p.A39E avait une activité antagoniste du récepteur GalR1, et une affinité réduite pour les récepteurs GalR2. Ces résultats suggèrent que le mutant p.A39E pourrait altérer le signal *GAL* dans l'hippocampe, aboutissant à une augmentation de l'excitabilité neuronale glutamatergique à l'origine de l'ELT. Le dépistage de mutations du gène *GAL* dans une cohorte de 582 épileptiques n'a identifié aucune mutation pathogénique, ce qui laisse penser que les mutations *GAL* sont des causes rares d'ELT. L'identification d'une nouvelle mutation de ce gène candidat, couplée à la preuve fonctionnelle que la protéine mutée perturbe le signal *GAL*, appuie fortement l'hypothèse de causalité de ce gène dans le phénotype épileptique de cette famille. En raison de la disponibilité de molécules agonistes du peptide *GAL*, nos résultats pourraient avoir des retombées directes sur le développement de traitements antiépileptiques.

Mots clés : Galanine, mutation, épilepsie du lobe temporal.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue « *Human Molecular Genetics* » (**Annexe 01**), et dans la base de données OMIM (<http://omim.org/entry/616461>).

CHAPTER IV: Galanin mutation in temporal lobe epilepsy

Abstract

Temporal lobe epilepsy (TLE) is a common epilepsy syndrome with a complex aetiology. Despite evidence for the participation of genetic factors, the genetic basis of TLE remains largely unknown. A role for the galanin neuropeptide in the regulation of epileptic seizures has been established in animal models more than two decades ago. However, until now there was no report of pathogenic mutations in *GAL*, the galanin-encoding gene, and therefore its role in human epilepsy was not established. Here, we studied a family with a pair of monozygotic twins affected by TLE and two unaffected siblings born to healthy parents. Exome sequencing revealed that both twins carried a novel de novo mutation (p.A39E) in the *GAL* gene. Functional analysis revealed that the p.A39E mutant showed antagonistic activity against galanin receptor 1 (GalR1)-mediated response, and decreased binding affinity and reduced agonist properties for GalR2. These findings suggest that the p.A39E mutant could impair galanin signalling in the hippocampus, leading to increased glutamatergic excitation and ultimately to TLE. In a cohort of 582 cases, we did not observe any pathogenic mutations indicating that mutations in *GAL* are a rare cause of TLE. The identification of a novel de novo mutation in a biologically relevant candidate gene, coupled with functional evidence that the mutant protein disrupts galanin signalling, strongly supports *GAL* as the causal gene for TLE in this family. Given the availability of galanin agonists, which inhibit seizures, our findings could potentially have direct implications for the development of anti-epileptic treatment.

Key words: Galanin, mutation, temporal lobe epilepsy.

This study has been published in « *Human Molecular Genetics* » (**Appendix 1**) and in OMIM database (<http://omim.org/entry/616461>).

1. Introduction

L'épilepsie du lobe temporal (ELT) est la plus fréquente des épilepsies focales chez l'adulte [334]. Longtemps considérée comme une pathologie acquise, la part génétique de cette affection a été démontrée par les études de jumeaux et les études familiales [335, 336]. A ce jour, deux gènes ont été identifiés dans les épilepsies familiales du lobe temporal. Le premier est le gène Leucin-rich, glioma inactivated 1 (*LGII*) dont les mutations ont été identifiées dans l'épilepsie autosomique dominante du lobe temporal. Ces mutations sont responsables d'un défaut de recapture du glutamate responsable d'une activation des récepteurs NMDA dans les cellules pyramidales, déclenchant ainsi les crises épileptiques [337, 338]. Le deuxième gène, dishvelled, Egl-10 and pleckstrin domain-containing protein 5 (*DEPDC5*) a été identifié dans des familles avec épilepsie focale à foyers variables [339, 340]. *DEPDC5* semble jouer un rôle important dans la signalisation au sein des cellules [341, 342].

Le neuropeptide galanine qui joue un rôle dans la contraction des muscles lisses et la régulation de la glycémie, a été découvert il y a plus de 30 ans [343]. Il s'agit d'un peptide de 30 acides aminés, qui provient du clivage d'une protéine précurseur de 123-acides aminés, codée par le gène galanin/GMAP (galanin message-associated peptide GAL; NM_015973.3) [344]. Ce gène est localisé sur le bras long du chromosome 11 (11q13.2), il comporte 5 exons codants, dont les exons 2 et 3 codent pour le neuropeptide galanine (**Figure 15**). Ce dernier agit en tant que messenger cellulaire dans le système nerveux central et périphérique, modulant diverses fonctions physiologiques [345].

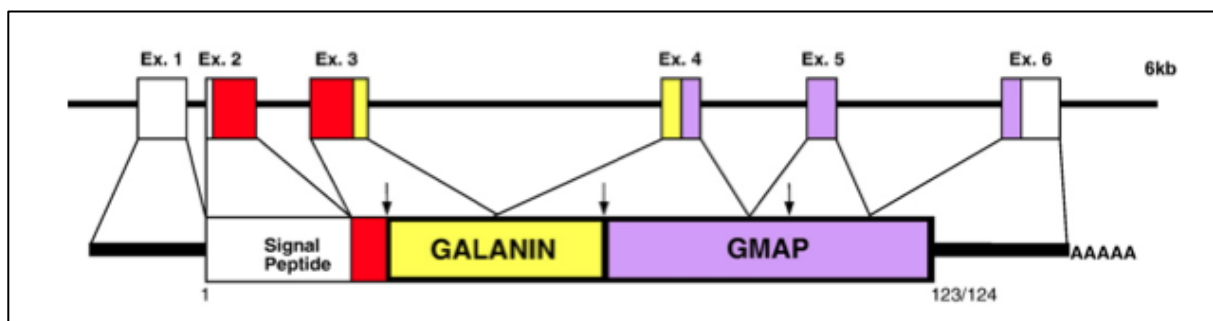


Figure 15: Organisation du gène Galanin/GMAP [344]

En 1992, Mazarati et coll. furent les premiers à démontrer l'activité anticonvulsivante de GAL chez le rat [346]. Par la suite, plusieurs travaux ont démontré que ce neuropeptide essentiellement exprimé dans l'hippocampe, exerce un effet inhibiteur sur la transmission glutamatergique via l'activation des récepteurs GalR1 et GalR2, conduisant à l'inhibition des crises épileptiques [347]. C'est ainsi que les propriétés anticonvulsivantes de la galanine ont séduit l'industrie du génie génétique, et ont incité le développement de cellules encapsulées produisant ce neuropeptide, dans la perspective de concevoir une stratégie antiépileptique à base de galanine [348].

En dépit de toutes ces avancées dans la compréhension des effets anticonvulsivants de la galanine, à ce jour, aucune mutation pathogénique du gène *GAL* en rapport avec un phénotype épileptique n'a encore été décrite chez l'Homme.

A travers cette étude, nous rapportons une mutation faux-sens (p.A39E) dans l'exon 2 du gène *GAL* chez des jumeaux monozygotes atteints d'ELT. Dans un second temps, nous démontrons le lien de causalité entre cette mutation et le phénotype épileptique dans cette famille à travers des analyses *in silico*.

2. Matériels et méthodes

En l'absence d'une histoire familiale d'épilepsie ou de toute autre manifestation neurologique, nous avons émis l'hypothèse que les jumeaux monozygotes affectés étaient des cas sporadiques. Dans cette optique, une étude du trio (parents-enfant) a été réalisée et des mutations pathogéniques *de novo* ont été recherchées uniquement chez l'un des jumeaux (individu II-3, **Figure 16**) étant donné qu'ils sont monozygotes et arborent donc le même patrimoine génétique.

2.1. Prélèvements sanguins

Les membres consentant de la famille nucléaire codée EPI-ORA-AFF ont été prélevés au service de Neurologie du CHU d'Oran. Les prélèvements de sang veineux ont été collectés dans des tubes d'Éthylène Diamine Tétracétique (EDTA) et conservés dans un congélateur avant d'être envoyés par voie Express (UPS-Fedex) au Laboratoire de Médecine Génétique et Développement de l'Université de Genève, où s'est déroulée toute la partie de recherche génétique de ce travail.

2.2. Analyse de séquençage exomique complet

La capture des séquences a été effectuée chez les parents et un des jumeaux (individus I-1, I-2 et II-3, **Figure 16**), sur 2 µg d'ADN génomique extrait du sang, à l'aide de SureSelect Human ALL Exon v5 kit (Agilent Technologies).

Un séquençage à haut débit a été réalisé à l'aide de l'instrument « Illumina GAIIx / HiSeq 2000 » (Illumina, San Diego, CA) disponible au département de médecine génétique de la faculté de médecine de Genève. Le démultiplexage des exons a été obtenu pour chaque échantillon en utilisant le logiciel CASAVA v1.8.2, et traité par pipeline "in-house" du Centre Vital-IT pour le calcul haute performance de l'Institut Suisse de Bioinformatique¹⁷. L'alignement des *reads* et la dénomination des variants nucléotidiques simples et des petits *indels* ont été effectués à l'aide de Burrows–Wheeler Aligner (BWA) [349]. Les données ont ensuite été analysées sur la base des séquences du génome humain, en utilisant la base de données du Centre national pour l'information biotechnologique (NCBI Build GRCh37/hg19)¹⁸.

Le logiciel Samtools a été utilisé pour supprimer les doublons. Les variants nucléotidiques simples (SNV) et des petites insertions et délétions (INDELs) ont été détectés à l'aide la dernière version des logiciels bcftools et Pindel 0.2.4, respectivement. Seuls les variants génétiques ayant un haut score de qualité ont été investigués. Le nombre minimal de lectures requises a été fixé à huit. L'annotation fonctionnelle des variants a été effectuée en utilisant le logiciel ANNOVAR package.

2.3. Identification de variants pathogènes

Les variants potentiellement pathogéniques *de novo* ou récessifs ont été identifiés grâce à VariantMaster [350]. Ont été retenus pour des analyses subséquentes, les variants détectés chez le probant avec Samtools et PINDEL, qui ont des scores de qualité de plus de 150 et plus de 600, respectivement. Ces variants ont ensuite été filtrés afin d'exclure les variants localisés en dehors des exons ou des sites d'épissage (à ±2 paires de bases) et les variants avec un minimum de fréquence allélique (MAF) supérieur à 0.02 dans les bases de données *Database of Single Nucleotide Polymorphism* (dbSNPv138) et/ou the *Exome Variant Server* (EVS). Le logiciel VariantMaster a utilisé les données brutes

¹⁷ <http://www.vital-it.ch>

¹⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mise> à jour le 11/01/2016

(=BAM files) afin d'estimer robustement la probabilité que les variants restant soient présents chez les parents et les enfants. Les variants ont été classés comme *de novo* seulement si les parents étaient homozygotes pour l'allèle de référence (l'allèle wild-type, non pathogénique). Les variants homozygotes ou hétérozygotes composites chez le probant, qui ont été prédits comme délétères « *damaging* » par au moins 2 des 3 algorithmes utilisés (SIFT, Polyphen2 et Mutation Taster), n'ont été classés comme récessifs, que si les deux parents étaient porteurs et que le génotype de la sœur indemne était différent de celui du probant. Tous les variants classés comme *de novo* ou récessifs par VariantMaster ont été par la suite visuellement inspectés par le logiciel SAMtools text alignment viewer. Le reste des variants candidats ont été validés par séquençage Sanger grâce à l'appareil ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

2.4. Recrutement d'individus épileptiques pour le dépistage de mutations *GAL*

Afin d'apprécier la fréquence des mutations *GAL* chez les individus avec ELT, un dépistage de ces mutations a été effectué par séquençage de 582 épileptiques de diverses ethnicités :

- Cent quatre-vingt-un individus non apparentés atteints de différentes formes d'épilepsie focale, ont été recrutés à l'Hôpital Universitaire de Montpellier (France).
- Quatorze patients non apparentés atteints d'ELT pharmacorésistante ont été recrutés à Lyon, 18 à Strasbourg et cinq autres à Clermont-Ferrand. Ce recrutement s'est effectué à travers un projet de recherche multicentrique¹⁹.
- Cent trente et un individus adultes non apparentés d'ascendance européenne atteints d'ELT, ont été recrutés au Centre suisse de l'épilepsie à Zurich (Suisse).
- Cent cinquante-neuf patients atteints d'ELT sporadique ont été recrutés au CNR-Institut de Neurosciences, Section de Padua, Padova, Italie, dans le cadre d'une étude collaborative soutenue par la Commission de génétique de la Ligue Italienne contre l'épilepsie.
- Soixante-quatre patients non apparentés atteints d'épilepsie focale ont été recrutés au Département de neurologie et épileptologie de Tübingen, et au Département de Neuropédiatrie de Kiel (Allemagne).

¹⁹ Projet Hospitalier Clinique de Recherche 2007-A00481-52 du ministère français de la santé, coordinateur Dr Philippe Ryvlin.

- Quarante-neuf individus caucasiens non apparentés (principalement d'origine allemande) avec épilepsie mésiale du lobe temporal ont été recrutés dans le cadre des études génétiques et pharmacogénétiques au Département de neurologie et épileptologie de l'Université de Tübingen.

Tous ces patients ont bénéficié d'examen neurologiques et d'enregistrements EEG selon le système international 10-20. Chaque patient a bénéficié d'une IRM encéphalique de haute résolution. Tous les patients ont été informés des modalités de l'étude et ont donné leur consentement écrit avant l'inclusion.

2.5. Analyses fonctionnelles

2.5.1. Synthèse de peptides

Le peptide sauvage (non pathogénique) : Human galanin1–30 wild type [hGal(WT)]: GWTLNSAGYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS, et le peptide muté : Human galanin A39E [hGal(A39E)]: GWTLNSEG YLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS) ont été synthétisés au Département de Neurochimie (Laboratoires de neurosciences, Arrhenius), à l'université de Stockholm en Suède. Les peptides ont été synthétisés à 0,1 mmol sur un synthétiseur de peptides automatisé (Biotage® Initiator + Alstra™). Le premier acide aminé a été fixé à la résine par l'anhydride. Toutes les autres réactions ont été effectuées à l'aide de OxymaPure/DIC DMF. Le clivage final a été effectué en utilisant le protocole standard (95% TFA/2.5% TIS/2.5% H₂O). Les peptides ont été purifiés en phase inverse HPLC à l'aide de BioBasic C-8 column (Thermo Scientific, Sweden) et un gradient de 20–80% acéto-nitrile/eau contenant 0.1% TFA. L'identité des peptides a été analysée par MALDI-TOF mass spectrométrie Voyager-DE STR (Applied Biosystems) en mode linéaire positif, par l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique comme matrice.

2.5.2. Analyse de liaison des récepteurs par la méthode de déplacement

Les expériences de déplacement -ou de compétition- permettent de déterminer l'affinité d'un ligand non radioactif, et d'étudier de nombreuses molécules non radiomarquées et de les comparer entre elles dans des conditions expérimentales strictement identiques. Les expériences de compétition sont réalisées en présence d'une concentration fixe de ligand radioactif et de concentrations croissantes du ligand non radioactif à étudier. Ce type d'expérience permet de déterminer l'IC₅₀ et la constante d'inhibition K_i, par l'équation de Cheng-Prusoff [351]: $K_i = IC_{50} / ([L^*]/KD)$, avec :

- K_i : concentration en compétiteur froid, non radioactif, qui se lie à 50% des sites de liaison. Elle permet d'apprécier l'affinité de liaison de l'inhibiteur.
- IC_{50} : concentration du ligand non radioactif nécessaire pour déplacer 50% de la fixation totale du ligand radioactif.
- $[L^*]$ = concentration du radioligand libre ;
- K_D : constante de dissociation du radioligand des récepteurs.

Plus K_i est faible plus l'affinité du ligand non radioactif pour le récepteur est élevée.

Dans notre étude, les affinités de liaison des peptides galanine (sauvage et mutant) ont été comparées aux trois récepteurs membranaires GalR1, GalR2 et GalR3. Cette analyse a été effectuée sur un volume final de 200 μ l contenant 0.15 nM du ligand radiomarqué ^{125}I -galanin (2200 Ci/mmol; Perkin-Elmer Life Science, Boston, MA, USA), 30 μ g de membranes cellulaires et différentes concentrations du peptide non radioactif (10^{-5} , 10^{-9} M). Les solutions de peptides ont été mises dans des tampons supplémentés en 0.3% d'albumine sérique bovine (BSA). Les échantillons ont été vortexés à 37°C pendant 30 min et trempés dans une solution de polyéthylénimine à 0.3% puis filtrés par MultiScreen-FB filter plate (Millipore, Billerica, MA, USA). Les filtres ont été lavés trois fois avec un tampon et la radioactivité retenue a été déterminée par un compteur gamm (Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer, model 2500 TR; Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA) en utilisant le cocktail OptiPhase Supermix (Perkin-Elmer Life Science, Boston, MA, USA) comme liquide de scintillation (**Figure 16**). Les valeurs de IC_{50} des peptides ont été calculées à l'aide du logiciel Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) et converties en valeurs K_i par l'équation de Cheng-Prusoff [351].

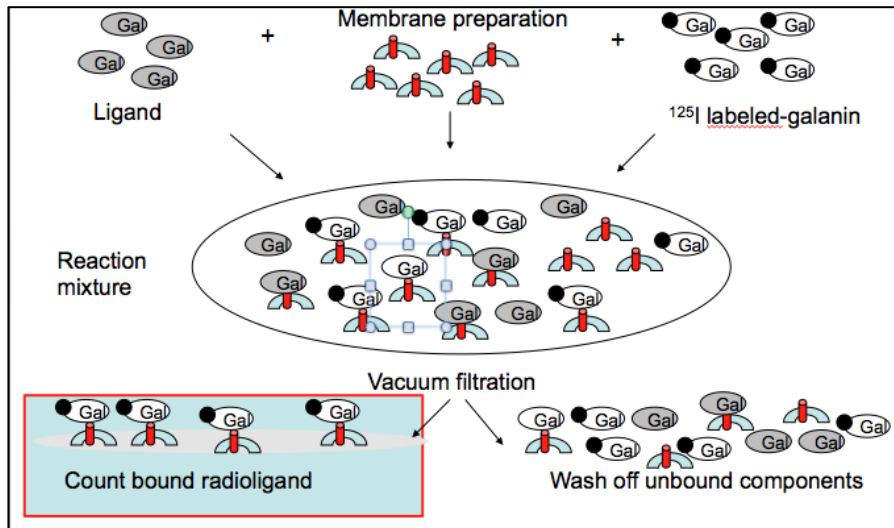


Figure 16: Protocole d'analyse de liaison des récepteurs Gal par la méthode de déplacement [219]

2.5.3. Analyse de la transduction du signal

La transduction du signal désigne le mécanisme par lequel une cellule répond à l'information qu'elle reçoit par des agents chimiques ou autres signaux, afin de réguler des phénomènes tels que la prolifération cellulaire, la différenciation ou l'apoptose. Les principales voies de transduction du signal au sein des cellules sont : la voie des MAP kinases (mitogen-activated protein kinase, MAPK), la voie PI3 kinase (phosphatidyl inositol-3 kinase), la voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) et la voie d'activation du facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor kappa B). Dans cette étude, la transduction du signal a été étudiée en évaluant l'aptitude à stimuler la production d'inositols phosphates (IPs) dans des cellules CHO²⁰ exprimant le récepteur humain hGalR2.

2.5.4. Test xCELLigence d'impédance cellulaire

La technologie xCELLigence permet de suivre l'activité cellulaire en temps réel et en continu sans marquage préalable. Alliance de la microélectronique et de la biologie cellulaire, cette technologie permet la mesure d'impédance électrique cellulaire, c'est à dire l'opposition exercée par un tapis cellulaire au passage d'un courant alternatif sinusoïdal. Elle est mesurée dans des puits de culture dédiés, dans lesquels le fond est

²⁰ Lignée cellulaire issue d'ovaires de hamster de Chine.

recouvert de microélectrodes d'or, en modifiant le flux électrique. Le spectre d'applications les plus développées sur ce système concerne l'étude de la prolifération, la viabilité, la différenciation, l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaire, en passant par l'étude des changements de morphologie cellulaire ou l'analyse fonctionnelle de récepteurs. Dans notre étude, le système xCELLigence a été utilisé pour mesurer les changements de l'impédance cellulaire après stimulation du ligand. Pour cela, les cellules exprimant le récepteur hGalR1 ont été incubées à 20.000 cellules par puits sur une plaque de 96 puits (ACEA Biosciences Inc.) et placées dans la plateforme xCELLigence Cell Analyzer (Roche Applied Science) en temps réel à 37° et 5% de CO₂. Après 24h d'incubation, les milieux de culture ont été remplacés par un tampon d'essai (HBSS contenant 0.1% BSA). Trois heures plus tard, le peptide hGal A39E a été ajouté à concentrations croissantes (de 0.1 nM à 10 µM) durant une heure, avant d'être stimulé par 100 nM de peptide sauvage hGal(WT). L'indice cellulaire a été contrôlé avant et après l'addition des peptides. Les relations dose-réponse ont été tracées à l'aide des valeurs moyennes de quatre répliques. Les valeurs d'indices cellulaires ont été étalonnées en divisant l'indice cellulaire au moment de l'addition du ligand. L'analyse des données a été effectuée par le logiciel built-in xCELLigence System et les résultats ont été présentés par GraphPad Prism.

2.5.5. Test d'accumulation d'inositols phosphates (IPs)

Les cellules CHO exprimant de manière stable le récepteur humain GalR2 ont été cultivées dans des plaques à 12 puits jusqu'à confluence. Les cellules ont ensuite été incubées durant 24 h avec 1 µCi de [3H] -myo-inositol dans le milieu M-199 contenant 100 U ml⁻¹ de pénicilline et 100 µg ml⁻¹ de streptomycine. Ces cellules ont été lavées deux fois avec le tampon HEPES Krebs Ringer (HKR) (5 mmol/l HEPES, 137 mmol/l NaCl, 2,68 mmol/l KCl, 2,05 mmol/l MgCl₂, 1,8 mmol/l CaCl₂, 1 g/l de glucose, pH 7,4) suivie de 10 min de pré-incubation dans 800 µl de tampon HKR avec 10 mmol/l de LiCl à 37 °C. Le peptide hGal (A39E) (10⁻⁵, 10⁻⁸ M) avec ou sans hGal (WT) (10⁻⁷ M) a été ajouté à un volume final de 1000 µl et incubé pendant 60 min à 37°C. La réaction a été arrêtée par addition de 200 µl d'acide perchlorique à 20% pendant 10 min suivie par l'addition de 1,5 M KOH / 75 mmol/l HEPES (pH 7). La chromatographie par échange d'anions a été réalisée sur 1 cm 50:50 Dowex (AG 1-X8 Resin, 200- 400 mesh formate; BioRad, Hercules, CA, USA). Les colonnes ont été lavées avec 5 ml d'eau distillée, avant l'élution

des IPs par 5 ml d'acide formique 0,1M/ 1,2M formate d'ammonium. La radioactivité de l'éluat a été déterminée par un β -compteur (Tri-Carb scintillation liquide Analyseur Modèle 2500 TR, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA) en utilisant Utima Flo AF (Perkin-Elmer Life Science, Boston, MA, USA) comme fluide de scintillation. Chaque échantillon a été étalonné par rapport au nombre total obtenu avant la Chromatographie d'échange d'anions.

3. Résultats

3.1. Résultats de l'analyse phénotypique de la famille EPI-ORA-AFF

Il s'agit de la première famille identifiée dans cette étude. Cette famille est originaire de d'El-Bayadh, une ville de l'ouest algérien. Elle compte des jumeaux monozygotes atteints d'épilepsie du lobe temporal, issus d'un mariage non consanguin (**Figure 17**).

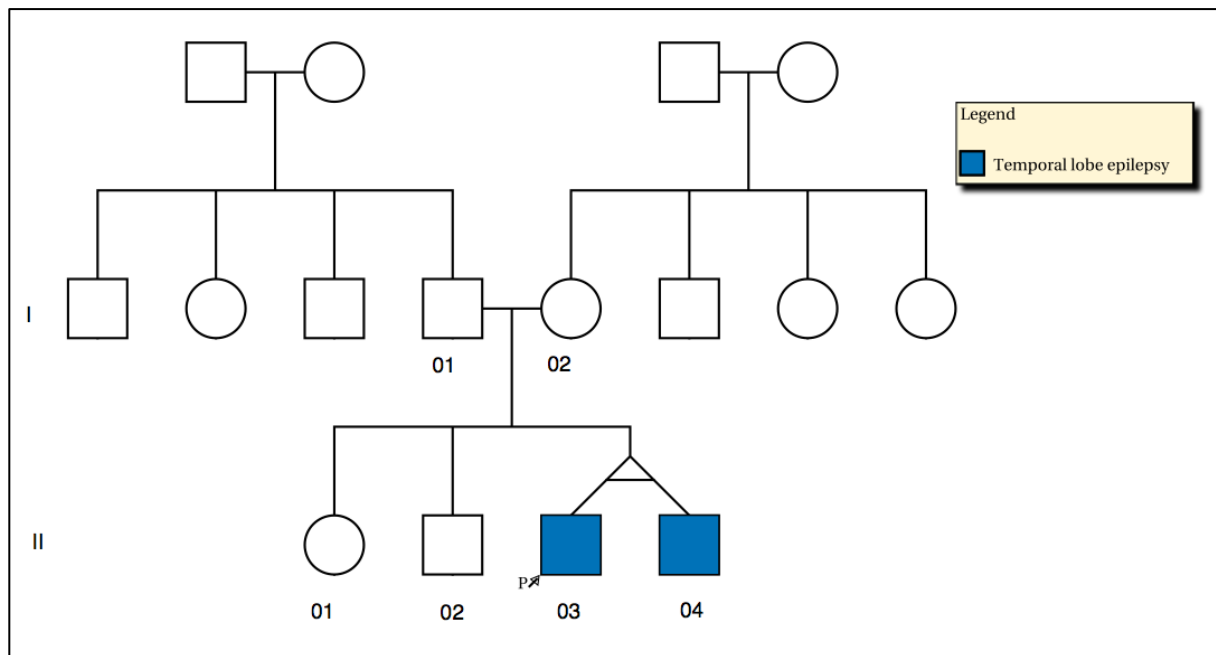


Figure 17: Pedigree de la famille EPI-ORA-AFF

I-01, le père des jumeaux, est né en 1930 à El-Bayadh. Ancien technicien supérieur en bâtiment, il est actuellement à la retraite. Il s'est marié à l'âge de 40 ans et a eu 04 enfants. Il est suivi pour hypertension artérielle depuis l'âge de 65 ans sous monothérapie, et pour diabète de type 2 depuis 1986. Il présente également une surdité

bilatérale datant d'une année. Son examen neurologique et son enregistrement EEG sont normaux.

I-02, la mère des jumeaux est née le 11/07/1951 à Béchar de parents sains, non apparentés. Elle a été scolarisée jusqu'au moyen et a travaillé comme secrétaire avant de se marier en 1970. Elle ne présente aucune pathologie chronique. Par ailleurs, son examen neurologique est sans particularités, de même que son tracé EEG.

II-1 est née le 29/08/1971 à Béchar. Sans aucun antécédent médico-chirurgical, elle a un diplôme universitaire et travaille en tant que journaliste. Elle est divorcée et a une fille de 17 ans en bon état de santé. Elle aussi a bénéficié d'examen neurologique et d'enregistrement électroencéphalographique qui se sont révélés normaux.

II-2 est né le 28/11/1973. Il présente un asthme bronchique évoluant depuis la naissance. Ingénieur d'état, il s'est marié en 2012, et a une fille saine de deux ans. Son examen neurologique ne retrouve aucune anomalie de même que son EEG.

II-3 est le probant de l'étude. Il est né le 21/12/1984 à Oran. Il a un niveau de 3^{ème} année secondaire et occupe un poste de vendeur dans un centre commercial. Tabagique depuis l'âge de 12 ans à raison d'un paquet par jour, il présente également une hypothyroïdie traitée par Lévothyroxine® à raison de 75µg/j. Après un développement psychomoteur normal, sans antécédents de convulsions fébriles ni d'infections du SNC, il présente depuis l'âge de 13 ans des crises focales d'allure temporale.

Ces crises se résument à des accès de douleurs abdominales, palpitations, flou visuel et parfois propos incohérent durant 1 à 2 minutes. Au début, les crises se répétaient une dizaine de fois par jour. Il n'a consulté qu'une année plus tard, à l'occasion d'une crise focale secondairement généralisée.

L'examen neurologique était sans particularités et l'évaluation psychiatrique ne retrouvait aucun élément orientant vers une affection psychiatrique. Son premier EEG mettait en évidence des décharges de pointes ondes (PO) au niveau de la région temporo-occipitale gauche. Ces anomalies étaient bloquées dès l'ouverture des yeux, puis réapparaissaient à un degré moindre à la fermeture des yeux (**Figure 18**).

L'IRM cérébrale avec injection de gadolinium était normale, ne retrouvant notamment pas de sclérose hippocampique. Le patient a été mis sous Carbamazépine® à raison de 600 mg/j avec une bonne réponse durant les premières années, puis recrudescence des crises, justifiant l'augmentation de la dose à 800 mg/j puis association d'un deuxième antiépileptique (Phénobarbital 50mg/j).

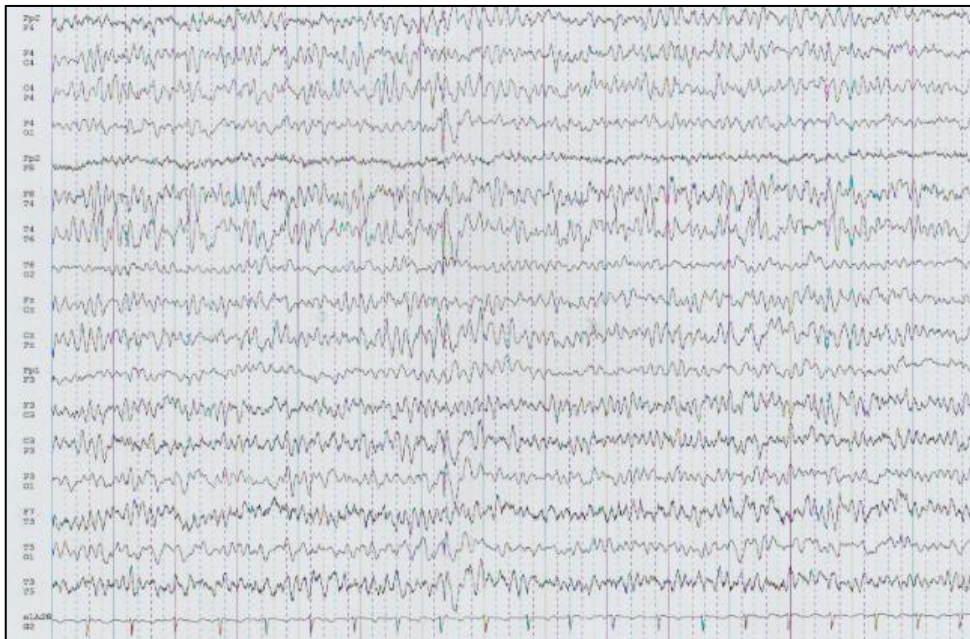


Figure 18: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-AFF-II-03

II-4 est le frère jumeau, lui aussi est suivi pour ELT évoluant depuis l'âge de 13 ans. La description de ses crises suggère une origine temporale (hallucinations auditives, lenteur de l'idéation, pensées forcées et impression de déjà-vu). Les crises étaient fréquentes au début (une dizaine de crises par jour, durant chacune moins d'une minute) et la généralisation exceptionnelle.

L'examen neurologique était strictement normal. Son EEG montrait un foyer fronto-temporal droit avec photosensibilité (**Figure 19**). Son IRM cérébrale était normale, ne retrouvant notamment pas de sclérose hippocampique. Il a été traité par Acide Valproïque® à doses optimales en vain, justifiant le changement de monothérapie (Carbamazépine® 800 mg/j), puis une bithérapie fut proposée (Carbamazépine® 800mg/j et Lévétiracétam® 1500mg/j) avec diminution considérable de la fréquence des crises.

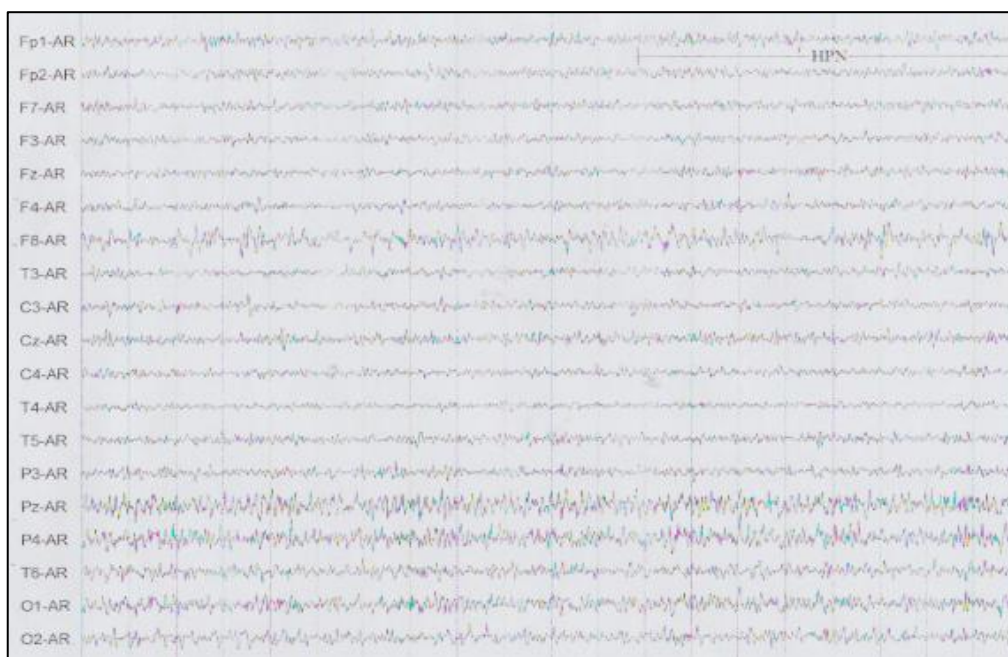


Figure 19: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-AFF-II-04

3.2. Résultats du séquençage exomique

Un séquençage exomique au niveau du génome entier (WES pour Whole Exome Sequencing) a été effectué chez le trio parents-enfant (individus I-1, I-2 et II-3 ; **Figure 17**). En moyenne, 27.412 (± 210) variants ont été détectés par individu. Le **tableau 13** résume les résultats du séquençage d'exome du trio parents-enfant.

Tableau 13: Résultats du séquençage d'exome du trio parents-enfant

Individu	Nombre total de reads	Nombre total de reads proprement appariés	%*	rmdup	%**	Reads dans la cible	% 8x	Nombre de Variants exoniques
I-1	262.003.554	255.032.086	97.34	229.671.204	87.66	163.692.219	97.48	27.751
I-2	272.338.546	263.850.258	96.88	243.258.243	89.32	171.156.305	97.4	27.348
II-3	253.731.084	246.162.192	97.02	228.308.905	89.98	160.730.645	97.42	27.446

%*: Pourcentage du nombre de reads proprement appariés

rmdup: Nombre total de reads proprement appariés qui restent après avoir éliminé les clusters dupliqués.

%**: Pourcentage de reads proprement appariés qui restent après avoir éliminé les clusters dupliqués.

Reads dans la cible : nombre de reads qui couvrent la partie codante des gènes RefSeq.

% 8x: Pourcentage de la partie codante des gènes RefSeq qui sont au moins couverts 8 fois.

3.3. Résultats de la recherche de variants génétiques par VariantMaster

Cet algorithme a permis de valider deux SNV (Single Nucleotide Variants) (**Tableau 14**). Le premier SNV a engendré une substitution de l'alanine en acide glutamique en position 39 du gène galanin(*GAL*) (c.C116A→p.A39E). Le second variant a abouti à la substitution d'un acide aspartique en glycine en position 137 (c.A410G→p.D137G) dans le gène cysteine-rich secretory protein, lcl domain-containing, 2 (*CRISPLD2*) localisé en 16q24.1. Ces deux variants n'avaient jamais été décrits dans les bases de données dbSNPv138²¹ et Exome Aggregation Consortium (ExAC)²², qui donnent les fréquences alléliques des SNV. De plus, ils ont été classés comme pathogènes par les programmes prédictifs SIFT²³ Polyphen2²⁴ et Mutation Taster²⁵.

Tableau 14: Liste des variants de novo validés

Chr	Position	Gene (Acc. number)	Nucl. change	AA change	Cov. ^a	SIFT	PP2	MT	GERP
11	68'453'096	GAL (NM_015973.3)	c.C116A	p.A39E	370	0	0.93	0.98	2.45
16	84'883'042	CRISPLD2 (NM_031476.3)	c.A410G	p.D137G	140	0.02	0.99	0.99	5.03

Couverture*: Nombre de reads après avoir éliminé les doublons qui couvrent cette position ; SIFT :Sorting Intolerant from Tolerant algorithm ; PP2= Polyphen2 ; MT = Mutation Taster ; GERP = Genomic Evolutionary Rate Profiling score

A ce jour, le gène *CRISPLD2* n'a jamais été associé à l'épilepsie, mais aux fentes labiales non syndromiques avec ou sans fente palatine [352, 353]. La sœur indemne (II-1) ne présentait pas ce variant. Toutefois, comme aucun des jumeaux ne présentait ce phénotype, ce gène a été exclu pour la suite de l'analyse.

Nous avons également évoqué la possibilité d'un modèle récessif et recherché des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites chez les jumeaux. Ainsi, des

²¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> mise à jour le 11/01/2016

²² <http://exac.broadinstitute.org/> mise à jour le 11/01/2016

²³ <http://sift.jcvi.org/> mise à jour le 11/01/2016, cutoff ≤ 0.05

²⁴ <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> mise à jour le 11/01/2016, cut-off ≥ 0.447

²⁵ <http://www.mutationtaster.org/>, cutoff: prédiction qualitative de pathogénicité

variants dans trois gènes différents ont été identifiés : le gène breakpoint cluster region (*BCR*), le gène *MYOSIN IXA (MYO9A)* et le gène SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1 (*SH3TC1*). Ces variants sont compatibles avec un mode de transmission autosomique récessif (**Tableau 15**). Cependant, à ce jour aucun de ces gènes n'a été lié à l'épilepsie. En effet, le gène *BCR* est incriminé dans la leucémie myéloïde chronique et la leucémie lymphoïde aiguë [354]. Le gène *MYO9A* a été associé à l'hydrocéphalie [355] et *SH3TC1* n'a pour l'instant jamais été associé à un trouble particulier. Par conséquent, ces gènes ont été écartés de notre étude.

Tableau 15: Autres variants identifiés dans la famille EPI-ORA-AFF

Chr	Gène	Changement de nucléotide	Changement d'acide aminé	ExAC	SIFT	PP2	MT	I-1	I-2	II-1	II-3	II-4
22	<i>BCR</i> (NM_004327)	c.C760T	p.R254C	1/122.679	0	0.65	0.94	ND	Het.	Het.	Het.	Het.
22	<i>BCR</i> (NM_004327)	c.T1088G	p.F363C	6/122.964	0.02	0.33	1.00	Het.	ND	ND	Het.	Het.
15	<i>MYO9A</i> (NM_006901)	c.G3257A	p.R1086H	55/122.912	0	0.13	0.99	Het.	ND	Het.	Het.	Het.
15	<i>MYO9A</i> (NM_006901)	c.G2837A	p.R946Q	15/122.957	0.01	1.00	0.99	ND	Het.	ND	Het.	Het.
4	<i>SH3TC1</i> (NM_018986)	c.G3812A	p.G1271D	89/122.883	NA	0.86	0.99	Het.	Het.	Het.	Hom	Hom

Chr : chromosome ; ExAC: fréquence du variant dans la base de données Exac ; SIFT :Sorting Intolerant from Tolerant algorithm; PP2 : Polyphen2 ; MT : MutationTaster ; Het: Hétérozygote; Hom: homozygote; ND: non détecté ; I-1, I-2, II-1, II-3 et II-4 : individus de la famille EPI-ORA-AFF pour lesquels un séquençage a été effectué.

Par la suite, tous les membres disponibles et consentant de cette famille ont été génotypés pour la mutation p.A39E du gène *GAL* par séquençage Sanger. Ce dernier a confirmé la présence de l'allèle sauvage (WT : Wild Type) chez les deux parents et la sœur indemne, ainsi que la présence de l'allèle muté sous forme homozygote chez les jumeaux malades (**Figure 20**).

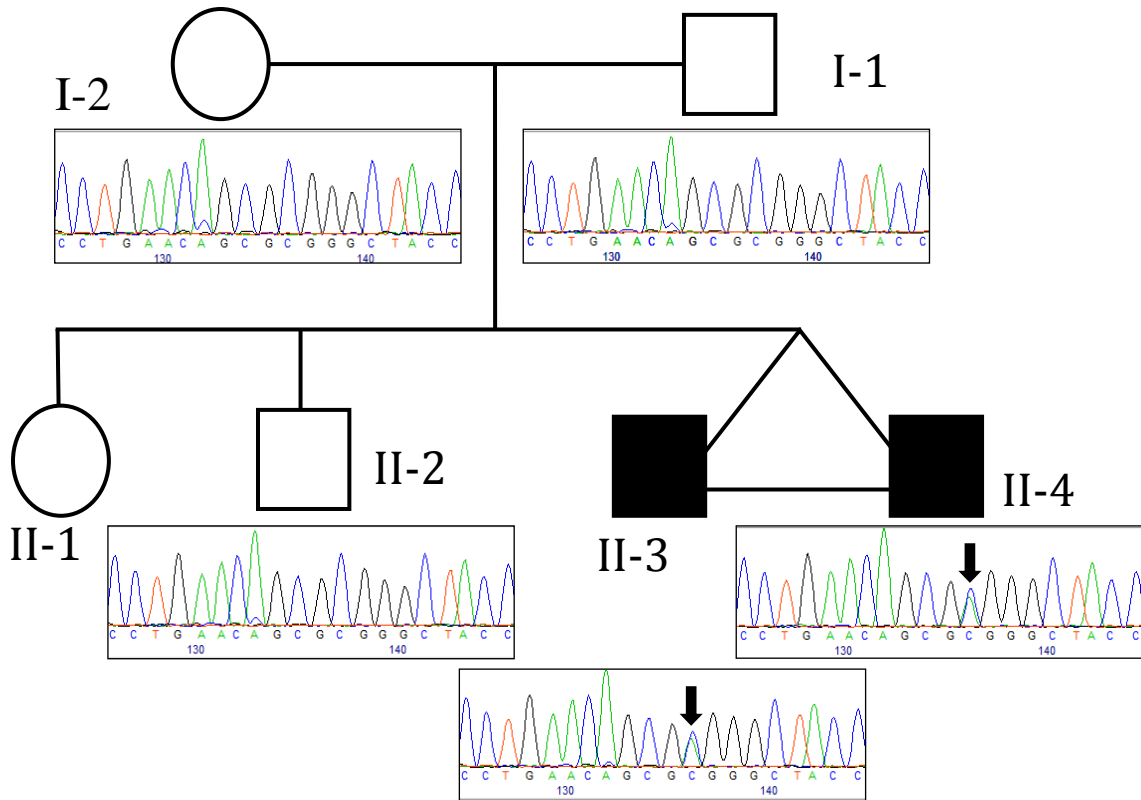


Figure 20: Résultats du séquençage par la méthode Sanger

3.4. Résultats du dépistage des mutations du gène *GAL* dans la cohorte de patients présentant une épilepsie focale

Afin de mieux apprécier la contribution de la mutation du gène *GAL* à l'épilepsie focale chez l'Homme, et de voir éventuellement si d'autres variants ou mutations de ce gène étaient présents chez des individus avec épilepsie focale, un séquençage des exons 2 et 3 ainsi que des sites d'épissage du gène *GAL* a été effectué chez 530 individus de descendance européenne avec ELT, et 52 patients atteints de différents types d'épilepsies focales (l'exon 1 n'a pas été séquençé chez les individus de cette cohorte puisqu'il est non-codant).

Aucune mutation potentiellement pathogène n'a été retrouvée dans cette cohorte de patients épileptiques, ce qui nous laisse supposer que les mutations du gène *GAL* sont extrêmement rares chez les individus atteints d'épilepsie focale.

3.5. Résultats de l'analyse fonctionnelle de la mutation p.A39E

3.5.1. Résultats de l'analyse de l'affinité des récepteurs de galanine

En le comparant au peptide sauvage (*human Galanin wild type* hGal-WT), le peptide muté hGal(A39E) avait des affinités de liaison similaires pour les récepteurs de la galanine hGalR1 (P-value=0.25) et pour les récepteurs hGalR3 (P-value=0.10), mais des affinités significativement diminuées pour les récepteurs hGalR2 (P-value=0.03) (**Figure 21, Tableau 16**). Le peptide hGal (A39E) a également montré une affinité à hGalR1 huit fois supérieure à celle de hGalR2 et 259 fois supérieure à celle de hGalR3 (**Tableau 16**).

Tableau 16: Valeurs K_i de hGal(WT) et hGal(A39E) vis-à-vis des récepteurs de la galanine 1, 2 et 3 (GalR1, 2 et 3)

Ki (nM; mean \pm SEM) Ligand	GalR1	GalR2	GalR3	Ki GalR2/ Ki GalR1	Ki GalR3/ Ki GalR1
hGal(WT)	6.071 \pm 2.134	1.789 \pm 0.684	80.90 \pm 27.08	0.29	13.32
hGal(A39E)	3.001 \pm 0.848	24.90 \pm 7.01	780 \pm 337	8.29	259.91
P-value (t-test)	0.252	0.03	0.1		

Ki : concentration du ligand non radioactif qui se lie à 50 % des récepteurs. hGal(WT) : peptide galanine de type sauvage. hGal(A39E) : peptide galanine mutant. GalR1 : récepteur GAL type 1. GalR2 : récepteur GAL type 2. GalR3 : récepteur GAL type 3.

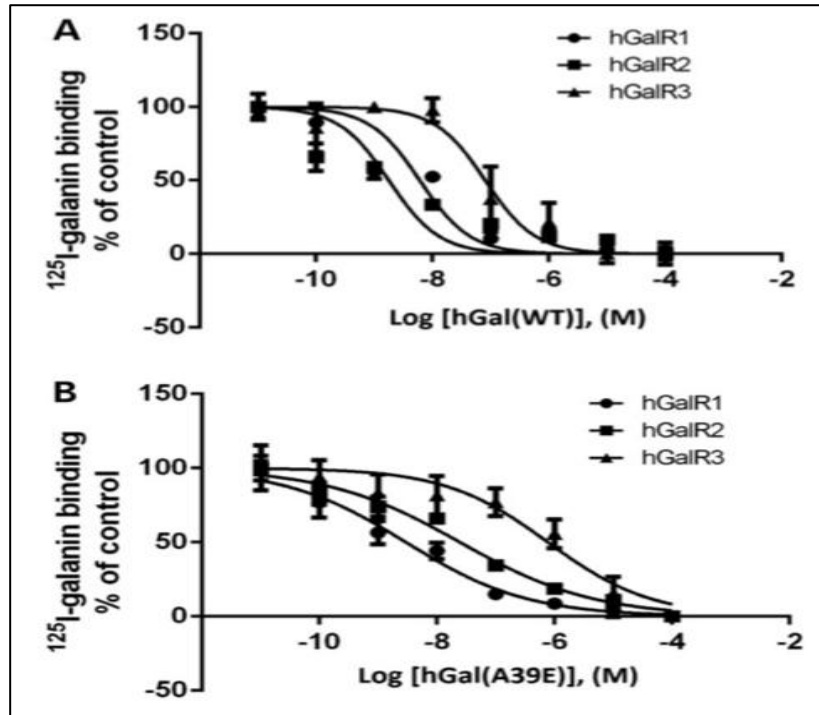


Figure 21: Résultats de l'étude de liaison aux récepteurs galanine

3.5.2. Résultats de l'analyse du signal Galanine

Les cellules exprimant les récepteurs hGalR1 ont été pré-incubées avec des doses croissantes du peptide mutant hGal (A39E) (de 0.1 nmol/l à 10 $\mu\text{mol/l}$) durant une heure et stimulées avec 100 nmol/l de hGal (WT). L'indice cellulaire a été mesuré avant et après addition des peptides. Le peptide hGal (WT) a montré une valeur de concentration efficace médiane (EC50) de 22.4 ± 2.56 nmol/l. Le peptide mutant hGal (A39E) a inhibé la réponse du peptide hGal (WT) de façon dose-dépendante, avec $\text{IC}_{50} = 486.5 \pm 12.46$ nmol/l, suggérant que le mutant hGal (A39E) agit comme antagoniste de la signalisation médiée par le récepteur GalR1 (**Figure 22**).

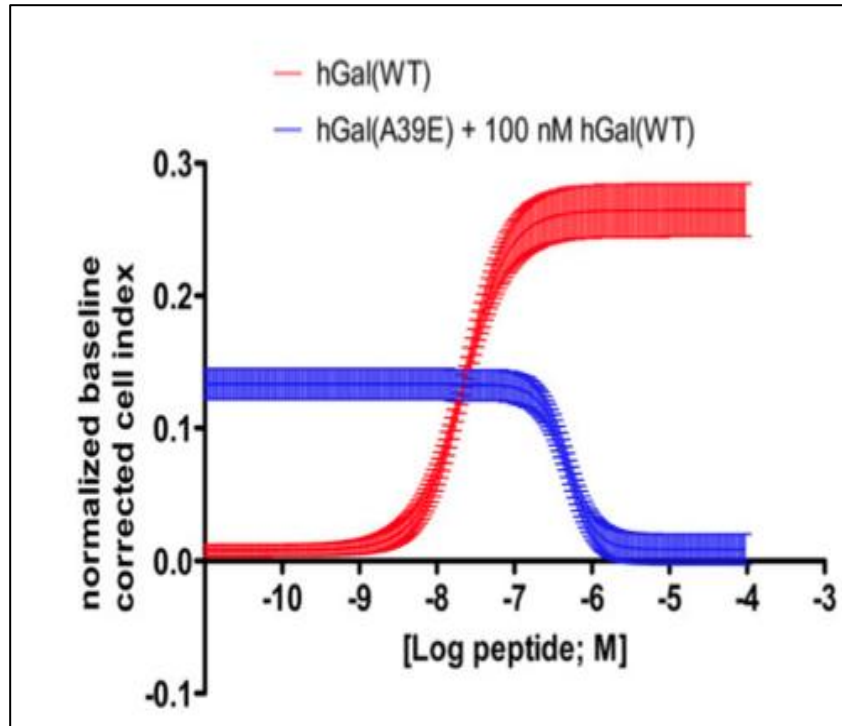


Figure 22: Inhibition de la stimulation de hGal (WT) par le peptide hGal (A39E)

La transduction du signal a été étudiée en évaluant l'aptitude à stimuler la production de phosphate d'inositol (PI) dans des cellules CHO exprimant les récepteurs hGalR2. Les deux peptides hGal (WT) et hGal (A39E) ont stimulé la production de PI à des concentrations différentes. hGal (WT) a stimulé la production de PI à une concentration de 171 ± 9.37 nmol/l, alors que hGal(A39E) a stimulé la production de PI à des valeurs significativement plus élevées 1243 ± 103 nmol/l (P-value = 0.0005) indiquant que ce mutant est un activateur moins puissant de hGalR2 (**Figure 23**).

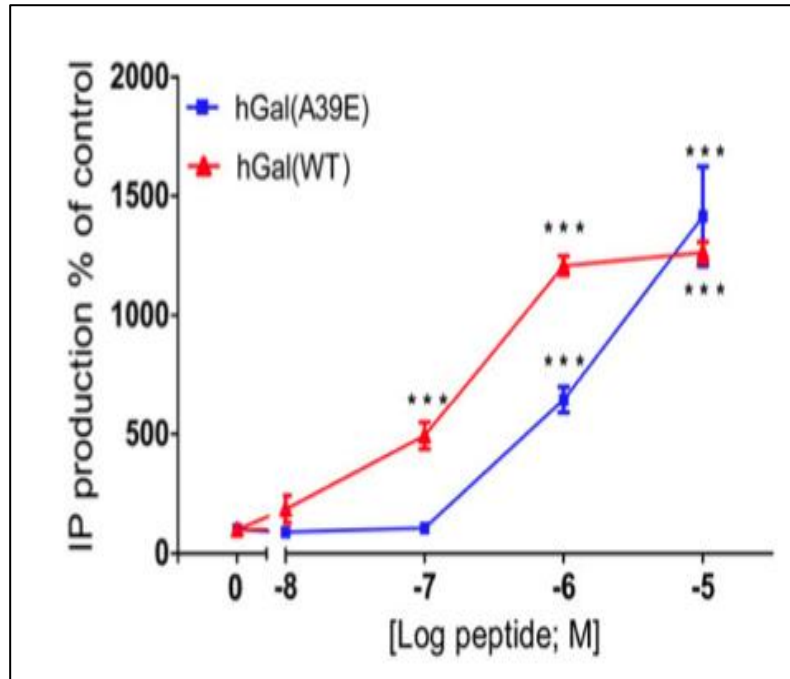


Figure 23: Production de Phosphates Inositols dans les cellules CHO exprimant hGalR2²⁶

L'effet additif de différentes concentrations de hGal (A39E) sur la production de PI obtenu avec 100 nmol/l de hGal (WT) a également été étudié (**Figure 24**). Le peptide muté hGal (A39E) a montré un effet additif statistiquement significatif à partir d'une concentration de 1 $\mu\text{mol/l}$ (P-value < 0.001). En effet, une augmentation de la production de PI a été observée lorsque les cellules CHO étaient co-stimulées avec hGal (WT) et hGal (A39E) à comparer avec la stimulation avec hGal (WT) seul, suggérant que hGal (A39E) agit comme agoniste des récepteurs hGalR2. A des concentrations inférieures à 1 $\mu\text{mol/l}$, hGal (A39E) n'a pas montré d'effet synergique significatif sur la production de PI induite par 100 nmol/l de hGAL (WT).

²⁶ Les données sont exprimées en pourcentages de contrôles et moyennes \pm écart-type de trois expériences répétées. Niveau significatif par rapport aux témoins : ***P < 0.001; tests de comparaison : ANOVA et Tukey HSD.

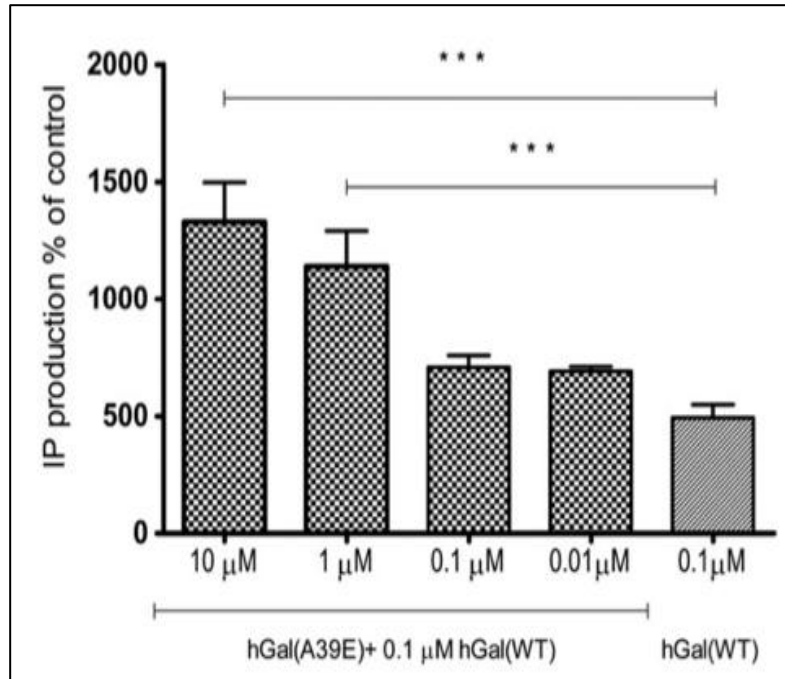


Figure 24: Production de Phosphates Inositols dans les cellules CHO exprimant *hGalR2*²⁷

4. Discussion

Dans cette famille, une mutation *de novo* p.A39E dans le gène qui code pour la galanine (*GAL*) a été identifiée chez les jumeaux monozygotes présentent une ELT.

La galanine est un neuropeptide de 30 acides aminés, localisé en position 33 à 62 du prépropeptide galanine/GMAP (*galanin message-associated peptide*) [356]. Il comprend une extrémité N-terminale cruciale pour ses activités biologiques, et une extrémité C-terminale qui jouerait un rôle protecteur contre sa protéolyse [344, 357]. La mutation p.A39E affecte l'alanine en position 39 du précurseur de la galanine qui correspond au septième résidu du peptide galanine mature (30 acides aminés).

Les 15 premiers résidus de la galanine sont hautement conservés au cours de son évolution alors que les 15 derniers sont moins conservés et manquent d'affinités pour les récepteurs [358, 359] (**Figure 25**).

²⁷ Les résultats sont exprimés en pourcentages de témoins et moyennes \pm écart-type de trois expériences répétées. ***P < 0.001; one-way ANOVA, Tukey HSD post hoc comparison test.

Human	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Gibbon	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Baboon	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Marmoset	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFSDKLGLTS
Gorilla	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Squirrel_monkey	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFSDKHGLTG
Crab-eating_macaque	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Lesser_Egyptian_jerboa	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFHEKHGLAG
Chinese_tree_shrew	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSLHEKHGLAG
Mouse	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFSDKHGLTG
Rat	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Chinese_hamster	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFSDKHGLTG
Cape_golden_mole	GWTMNS A GYLLGPDAMDKHRPLQEKQDLAG
Guinea_pig	GWTLNS A GYLLGPHYAVGNHRSFSDKHGLAG
Chinchilla	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFSDKHGLAG
Prairie_vole	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFNDKHGLTG
Pika	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFNDKHGLAG
Squirrel	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSPDQSSLAG
Pig	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSLSDKHGLAG
White_rhinoceros	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFHDKHGLAG
Alpaca	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFQDKHGLAG
Bactrian_camel	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFQDKHGLAG
Dolphin	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFNDKHGLTG
Killer_whale	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFHDKHGFTG
Cat	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFQEKPLTG
Dog	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFHEKPGLTG
Cow	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFQDKHGLAG
Ferret	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSLHEKPGLAG
Pacific_walrus	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFQEKPLTG
Sheep	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFNDKHGFSG
Domestic_goat	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFHDKHGLAG
Weddell_seal	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFHEKPGLTG
David's_myotis_bat	GWTLNS V GYLLGPKAVDNLRSFHDKHGLAG
Microbat	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFHDKHGLAG
Big_brown_bat	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFHDKHSLAG
Tibetan_antelope	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSLHDKHGLAG
Horse	GWTLNS A GYLLGPHAVGNHRSFHDKHGLAG

Figure 25: Alignement des séquences d'acides aminés prédites du peptide galanine chez plusieurs espèces²⁸

²⁸ Galaxy : <https://usegalaxy.org/mise> à jour le 12/01/2016

Le neuropeptide galanine est impliqué dans la régulation de différentes fonctions physiologiques telles que l'humeur, la sensation de faim, ainsi que les capacités d'apprentissage et de mémorisation (**Tableau 17**). La galanine est essentielle pour la survie et la croissance de certaines populations neuronales au cours du développement [360]. Elle possède des propriétés anti-nociceptives, neuroprotectrices et anticonvulsivantes [361-363].

Tableau 17: Implication des récepteurs de galanine dans différentes fonctions physiologiques et pathologiques

Effets physiologiques et pathologiques	Récepteurs impliqués	Références
Sensation de faim	GalR1 dans l'hypothalamus.	[361, 364]
Mémoire et apprentissage	GalR1 et GalR2 dans l'hippocampe.	[365, 366]
Epilepsie	GalR1 et GalR2 dans l'hippocampe.	[367, 368]
Douleur	GalR1 et GalR2 dans la moelle épinière et le ganglion dorsal.	[344, 369-372]
Anxiété et troubles de l'humeur	GalR1, GalR2 et GalR3 dans le ganglion dorsal, l'hypothalamus, locus coeruleus et l'amygdale.	[373-379]
Tumeurs	GalR1 et GalR2.	[344, 380-382]

L'effet anticonvulsivant de la galanine a été démontré via différents modèles animaux. Ainsi, en 1992 Mazarati et al. ont constaté une diminution de la sévérité des crises chez le rat après administration de fortes doses de Galanine (2000, 1000 ng) dans le ventricule latéral et dans le noyau caudé. L'injection bilatérale de galanine (200, 100 et 50 ng) dans l'hippocampe a entraîné un effet anticonvulsivant plus spécifique et dose-dépendant par rapport aux autres régions cérébrales [346].

Quelques années plus tard, la même équipe a démontré dans un modèle murin, que la déplétion de l'hippocampe en galanine induite par l'état de mal épileptique pouvait contribuer à la pérennisation de l'activité critique ; alors que l'augmentation de la concentration en galanine favorisait la cessation de l'état de mal [383]. En outre, les souris transgéniques qui surexpriment la galanine ont montré une résistance élevée à l'induction des crises, alors que les souris déficientes en galanine ont montré une plus grande susceptibilité aux convulsions [384].

L'effet anticonvulsivant de la galanine passe par l'inhibition de la libération du glutamate [385]. La formation hippocampique qui est impliquée dans les crises d'épilepsie du lobe temporal reçoit les innervations galaninergique et glutamatergique excitatrice. Les fibres galaninergiques suppriment cette action excitatrice via l'ouverture de canaux potassiques, déclenchant ainsi une hyperpolarisation de la membrane. Elles inhibent également la libération de glutamate à partir des terminaisons présynaptiques [386].

À ce jour, 3 récepteurs de la galanine ont été identifiés. Les deux récepteurs GalR1 et GALR2 qui sont exprimés dans l'hippocampe, contribuent à l'effet anticonvulsivant de la galanine [344]. En revanche, le récepteur GalR3 principalement exprimé dans la région hypothalamique ne joue aucun rôle dans l'épilepsie [387].

En 2004, Mazarati et al. ont effectué *in vivo* chez le rat, une sous-régulation du récepteur hippocampique GalR2 afin de déterminer son rôle de modulation de l'excitabilité dans un modèle d'état de mal épileptique. Pour cela, ils ont injecté par voie stéréotaxique dans le gyrus denté droit un antisens PNA (*peptide nucleic acid*) qui mime une partie de l'ARN messenger du récepteur GalR2 conduisant à sa sous-régulation. Par cette méthode, ils obtiennent une sous-régulation de 53 % de GalR2 sans modification du nombre de sites de GalR1. Dans ce modèle, les crises étaient significativement plus sévères et plus prolongées par rapport aux témoins, suggérant que ce type de récepteur intervient durant l'état de mal épileptique. L'application d'un agoniste sélectif de ces récepteurs GalR2 a permis une diminution considérable des crises confirmant que cette action anticonvulsivante passe bien par le récepteur GalR2. Les auteurs ont également constaté dans ce même modèle, une altération de l'action neurotrophique de la galanine avec perte des interneurons du hile, secondaire aux crises [367]. Ils ont donc conclu que la galanine agissant par son récepteur GalR2 dans le gyrus denté a une action anticonvulsivante, neuroprotectrice pour les neurones du hile et une action stimulante de la neurogenèse.

Par ailleurs, McColl et al. ont élaboré chez la souris, un récepteur GalR1-/- responsable de crises spontanées. L'enregistrement EEG critique de cette souris a montré que la plupart des crises avaient un début focal avec généralisation secondaire. Le tracé intercritique était également anormal marqué par des pointes et des ondes lentes focales [388]. Par ailleurs, il a été récemment démontré chez la souris que le déficit en GalR1 exacerbat la perte neuronale hippocampique après un état de mal

épileptique [389] et que CYM2503, un modulateur allostérique de GalR2, présentait des effets anticonvulsivants dans des modèles animaux [390].

Dans notre étude, le dépistage de mutations dans le gène *GAL* chez 530 individus avec ELT et 52 patients atteints de différents types d'épilepsies focales n'a révélé aucune mutations pathogènes supplémentaires. Ce résultat indique que les mutations de *GAL* sont des causes rares d'ELT et d'épilepsies focales.

Nous avons également consulté la base de données ExAC²⁹ qui rapporte soixante deux variations faux-sens et par perte de fonction du prépropeptide de la galanine/GMAP. Parmi ces SNV, 52 sont situés à distance des exons 2 et 3 qui codent pour le neuropeptide galanine et ont donc peu de chances d'altérer sa synthèse. Les dix autres variants décrits dans cette base de données et prédits pour être pathogènes comprennent six mutations avec perte de fonction et quatre mutations faux-sens (**Tableau 18**). La signification pathogène de ces 10 variants est actuellement inconnue étant donné que : (i) il n'y a pas de données expérimentales sur leur effet potentiel sur la fonction de la galanine et (ii) le statut phénotypique des porteurs de ces mutations n'est pas disponible. Même si l'on considère qu'ils sont tous pathogènes, leur fréquence allélique cumulative a été calculée à 0.0246%, ce qui est bien en dessous de la prévalence de l'ELT estimée à 0.17% [391].

²⁹ ExAC : Exome Aggregation Consortium est une base de données internationale qui met à la disposition de la communauté scientifique biomédicale les données de séquençage de l'exome de 60.706 individus non apparentés.

Tableau 18: Liste des variants faux-sens et perte de fonction dans le gène *GAL*, rapportés par ExAC

Variant	Chr	Position	Protein Consequence	Annotation	Allele Count	Allele Number	Allele Frequency
11:68452391 G / C	11	68452391		splice acceptor	3	82358	0.00003643
11:68452398 C / T	11	68452398	p.Arg3Ter	stop gained	5	84756	0.00005899
11:68452398 C / G	11	68452398	p.Arg3Gly	missense	3	84756	0.0000354
11:68452402 G / A	11	68452402	p.Gly4Asp	missense	1	85702	0.00001167
11:68452402 G / T	11	68452402	p.Gly4Val	missense	2	85702	0.00002334
11:68452404 A / G	11	68452404	p.Ser5Gly	missense	2	86186	0.00002321
11:68452407 G / A	11	68452407	p.Ala6Thr	missense	2	86600	0.00002309
11:68452419 G / A	11	68452419	p.Ala10Thr	missense	1	86750	0.00001153
11:68452434 G / A	11	68452434	p.Ala15Thr	missense	2	81274	0.00002461
11:68452435 C / T	11	68452435	p.Ala15Val	missense	1	80870	0.00001237
11:68452435 C / A	11	68452435	p.Ala15Asp	missense	1	80870	0.00001237
11:68452438 C / T	11	68452438	p.Ala16Val	missense	728	78246	0.009304
11:68452444 T / C	11	68452444	p.Leu18Pro	missense	2	72194	0.0000277
11:68452456 C / T	11	68452456	p.Ala22Val	missense	2	63190	0.00003165
11:68452462 T / TC	11	68452462	p.Trp25LeufsTer47	frameshift	1	59364	0.00001685
11:68452468 C / T	11	68452468	p.Ser26Leu	missense	3	55540	0.00005402
11:68452471 C / G	11	68452471	p.Pro27Arg	missense	1	51692	0.00001935
11:68453063 C / G	11	68453063	p.Ala28Gly	missense	2	118832	0.00001683
11:68453068 G / C	11	68453068	p.Glu30Gln	missense	1	118862	0.000008413
11:68453068 G / T	11	68453068	p.Glu30Ter	stop gained	1	118862	0.000008413
11:68453069 A / C	11	68453069	p.Glu30Ala	missense	1	118942	0.000008407
11:68453086 C / G	11	68453086	p.Leu36Val	missense	2	118358	0.0000169
11:68453091 C / G	11	68453091	p.Asn37Lys	missense	3	118132	0.0000254
11:68453095 G / A	11	68453095	p.Ala39Thr	missense	1	117728	0.000008494
11:68453117 G / GT	11	68453117		splice donor	1	113104	0.000008841
11:68455480 A / G	11	68455480		splice acceptor	5	120900	0.00004136
11:68455485 C / T	11	68455485	p.Ala47Val	missense	3	121056	0.00002478
11:68455487 G / A	11	68455487	p.Val48Ile	missense	26	121200	0.0002145
11:68455508 A / G	11	68455508	p.Ser55Gly	missense	1	121626	0.000008222
11:68455511 G / A	11	68455511	p.Asp56Asn	missense	19	121668	0.0001562
11:68455518 A / G	11	68455518	p.Asn58Ser	missense	1	121736	0.000008214
11:68455519 T / G	11	68455519	p.Asn58Lys	missense	2	121748	0.00001643
11:68455523 C / T	11	68455523	p.Leu60Phe	missense	2	121756	0.00001643
11:68455527 C / G	11	68455527	p.Thr61Ser	missense	1	121770	0.000008212

Les variants prédits pour affecter la synthèse et/ou la fonction galanine sont en caractères gras.

Ainsi, nos résultats génétiques et fonctionnels sont en faveur d'un effet dominant négatif d'haplo-insuffisance comme mécanisme potentiel de causalité, suggérant que le variant p.A39E du gène *GAL* pourrait être impliqué dans la survenue d'une ELT. Ceci dit, nous pensons que le dépistage de mutations d'autres gènes impliqués dans la voie de signalisation de la galanine (par exemple les gènes codant les récepteurs de la galanine), est indispensable pour évaluer globalement la contribution du système galaninergique à la génétique de l'épilepsie du lobe temporal.

Nos résultats pourraient avoir des retombées directes sur le développement de nouveaux traitements antiépileptiques. En effet, les propriétés anticonvulsivantes de la galanine ont séduit l'industrie du génie génétique, et ont incité le développement de cellules encapsulées produisant ce neuropeptide [348, 390, 392]. Ces approches innovantes sont encore à l'état expérimental.

5. Conclusion

Notre étude est intéressante dans le sens où elle a mis en évidence la première mutation du gène *GAL* en rapport avec un phénotype épileptique chez l'Homme. Nos résultats pourraient avoir des implications directes dans le développement de molécules antiépileptiques à base de galanine et de traitements par thérapie génique.

CHAPITRE V : Polymorphismes du gène *RELN* et vulnérabilité à l'épilepsie et à la schizophrénie

Résumé

Les données cliniques, épidémiologiques et neuropathologiques disponibles suggèrent une forte association entre l'épilepsie et la schizophrénie [393, 394]. Cette association sous entend une vulnérabilité génétique commune à ces deux affections [395]. Parmi les gènes candidats à ces deux maladies, le gène Reelin (*RELN*, [OMIM] 600514) a été l'un des plus étudiés. Il code pour la Reelin, une gigantesque glycoprotéine impliquée dans la migration neuronale et dans différentes fonctions du développement cérébral [396, 397]. Dans la présente étude, nous rapportons une famille comportant deux frères atteints d'épilepsie du lobe temporal, avec schizophrénie chez l'un, et trouble dépressif récurrent sur personnalité de type borderline chez l'autre. Le séquençage exonique a identifié un variant du gène *RELN* (rs55689103) à l'état homozygote chez l'individu avec schizophrénie, et à l'état hétérozygote chez son frère. Ce variant pourrait donc être impliqué dans le phénotype schizophrénique dans cette famille, mais pas dans le phénotype épileptique. Le dosage sérique de la protéine Reelin ainsi que l'étude du niveau de méthylation du promoteur du gène *RELN* constituent des éléments clés pour l'interprétation des résultats de cette étude.

Mots clés : Reelin, polymorphisme, épilepsie, schizophrénie.

CHAPTER V: *RELN* gene polymorphisms and susceptibility to epilepsy and schizophrenia

Abstract

Several studies have shown a strong relationship between schizophrenia and epilepsy [393, 394]. This association implies a common genetic vulnerability for both conditions [395]. Among the candidate genes for both diseases, the Reelin gene (*RELN* [OMIM] 600514) has been one of the most studied. It encodes Reelin, a gigantic glycoprotein involved in neuronal migration and different functions of brain development [308, 309].

In this study, we report a family with two brothers suffering from temporal lobe epilepsy with schizophrenia in one, and recurrent depressive disorder in the other. Exome sequencing identified homozygous single nucleotide variant in the *RELN* gene (rs55689103) in individual with schizophrenia. His brother was heterozygous for the same variant. This variant could be involved in schizophrenic phenotype in this family, but not in the epilepsy phenotype. Further investigations of blood Reelin level and *RELN* promoter methylation are key components to interpreting the results of this study.

Key words: Reelin, polymorphism, epilepsy, schizophrenia.

1. Introduction

La schizophrénie [OMIM : 181500] est une pathologie psychiatrique sévère, affectant plus de 1% de la population mondiale [398]. Elle est caractérisée par des hallucinations, un délire, des affects plats ou inappropriés et une détérioration cognitive. La composante génétique de ce trouble est connue depuis le début de ce siècle avec une héritabilité estimée à 80-85% [399]. L'hypothèse actuellement retenue est celle d'un modèle polygénique et multifactoriel [400]. A ce jour, aucun gène n'a été formellement identifié comme facteur causal ; cependant, certains gènes sont considérés comme des candidats intéressants.

L'association de la schizophrénie à l'épilepsie a été démontrée par plusieurs études [401-403]. Ainsi, dans une étude longitudinale portant sur 87 enfants suivis pendant 10 ans pour ELT, 10% ont développé une schizophrénie [404]. Une étude plus récente a démontré une relation bidirectionnelle entre l'épilepsie et la schizophrénie avec une incidence plus élevée de l'épilepsie dans le groupe de malades schizophrènes par rapport aux sujets non schizophrènes (6.99 vs 1.19/1000 personne-années), et une incidence plus élevée de la schizophrénie dans la cohorte des épileptiques par rapport aux non épileptiques (3.53 vs 0.46/1000 personne-années) [393]. Cette association sous-entend une vulnérabilité génétique commune à ces deux affections. En effet, il a été démontré que le gène Leucine-rich glioma inactivated 1 (*LG11*) impliqué dans le développement neuronal, est associé à l'épilepsie autosomique dominante du lobe temporal avec aura auditive et à la schizophrénie [405, 406]. Par ailleurs, le gène Contactin-associated protein-like 2 (*CNTNAP2*) est considéré comme un potentiel gène candidat pour l'épilepsie, la schizophrénie et le déclin cognitif dans la population caucasienne [407, 408]. Enfin, le gène Reelin (*RELN*), qui code pour une glycoprotéine extracellulaire jouant un rôle primordial dans le développement neuronal a aussi été incriminé dans la pathogénèse de la schizophrénie et de l'épilepsie. Ce gène code pour la Reelin, une gigantesque glycoprotéine impliquée dans la migration neuronale et dans différentes fonctions du développement cérébral [396, 397]. Cette protéine est exprimée essentiellement par les interneurons GABAergiques de l'hippocampe et par les neurones glutamatergiques du cervelet [409, 410]. De plus, *RELN* joue un rôle important dans la croissance dendritique, dans la plasticité synaptique et dans la régulation des

récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) [411, 412]. Les troubles du métabolisme de la Reelin se traduisent par un défaut de lamination corticale [413] ou une lissencéphalie [414, 415]. Ainsi, les mutations *RELN* pourraient être impliquées dans la pathogénèse de troubles neuropsychiatriques tels que la maladie d'Alzheimer, la démence fronto-temporale, les troubles du spectre autistique, les troubles bipolaires, certains syndromes épileptiques et la schizophrénie [416-419]. Nous rapportons une famille avec phénotype épileptique et schizophrénique chez laquelle un polymorphisme du gène *RELN* a été identifié.

2. Matériels et méthodes

2.1. Extraction de l'ADN

Tous les membres disponibles et consentants de la famille nucléaire codée EPI-ORA-SIA ont été évalués et prélevés au service de neurologie du CHU d'Oran. L'ADN génomique a été extrait du sang veineux à partir des leucocytes ; pour cela le kit d'extraction d'ADN « Invitrogen » a été utilisé. La pureté de l'ADN a été vérifiée par la méthode de spectrophotométrie basée sur la capacité de l'ADN à absorber des rayonnements UV à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (Labtech). La concentration des ADN a été déterminée par la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 260nm «nanomètres». Un second dosage a été effectué à 280nm afin de rechercher une éventuelle contamination par les protéines ou par les sels lors de l'extraction.

2.2. Analyses par séquençage exomique

Un séquençage de l'exome entier (*Whole Exome Sequencing* WES) a été effectué chez les parents (individus I-01 et I-02), les deux enfants malades (individus II-02 et II-03) et deux enfants sains (individus II-01 et II-06) (**Figure 26**). Le protocole de cette technique a déjà été décrit dans le chapitre précédent.

Les variants potentiellement pathogéniques ont été identifiés grâce à VariantMaster. Ont été retenus pour des analyses subséquentes, les variants détectés chez les individus malades, avec Samtools et PINDEL, qui ont des scores de qualité supérieurs à 150 et à 600 respectivement. Les variants homozygotes ou hétérozygotes composites chez les individus malades, qui ont été prédits comme délétères « *damaging* » par au moins deux

des trois algorithmes utilisés (SIFT, Polyphen2 et Mutation Taster), n'ont été classés comme récessifs, que si les deux parents étaient porteurs et que le génotype des autres enfants indemnes était différent de celui de leurs frères malades. Tous les variants classés comme récessifs par VariantMaster ont été par la suite visuellement inspectés par le logiciel SAMtools text alignment viewer. Le reste des variants candidats ont été validés par séquençage Sanger grâce à l'appareil ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

3. Résultats

3.1. Description phénotypique de la famille EPI-ORA-SIA

Dans cette famille, tous les sujets sont d'origine Algérienne (Maghrébine- arabe) sauf la grand-mère maternelle des individus malades qui est originaire du Maroc (Ville de Oudjda, frontalière à l'Algérie). Les parents sont sains et ne présentent aucun lien de parenté (**Figure 26**).

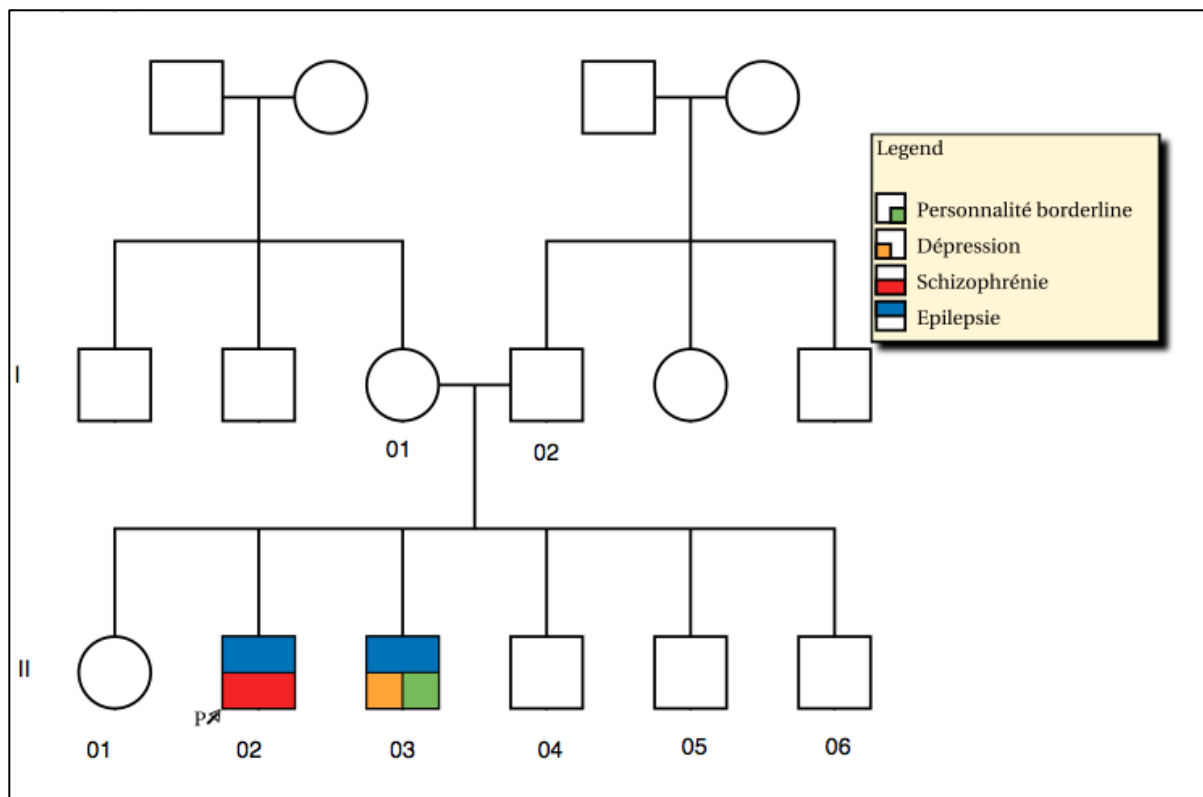


Figure 26: Pedigree de la famille EPI-ORA-SIA

L'individu II-02 est le cas index de cette famille. Il est né le 19 juillet 1979 à Oran. Célibataire, son niveau scolaire est de 6 années d'études ; il n'a jamais suivi de formation professionnelle et n'a jamais travaillé.

Il est suivi pour épilepsie du lobe temporal depuis l'âge de 10 ans. Ses crises se résument à des sensations d'angoisse avec palpitations et impression de déjà-vu durant moins d'une minute et se répétant 1 à 2 fois par jour. Ces épisodes sont parfois suivis de crises tonico-cloniques généralisées avec morsure de la langue et émission d'urines.

L'examen neurologique est normal et l'EEG met en évidence un rythme alpha postérieur avec bonne réaction d'arrêt visuel, des pointes lentes en frontal gauche avec diffusion vers les régions temporales. A la stimulation lumineuse intermittente (SLI), on note une réponse photo paroxystique localisée en fronto-temporal gauche aux fréquences comprises entre 6 et 20 cycles/seconde (**Figure 27**).

L'IRM cérébrale avec injection de gadolinium est normale, ne retrouvant ni sclérose hippocampique ni malformation vasculaire. Il est traité par Phénobarbital® 200 mg/j et Carbamazépine® 400 mg/j avec une nette diminution de la fréquence des crises focales (une crise tous les 3-4 mois) sans généralisation secondaire.

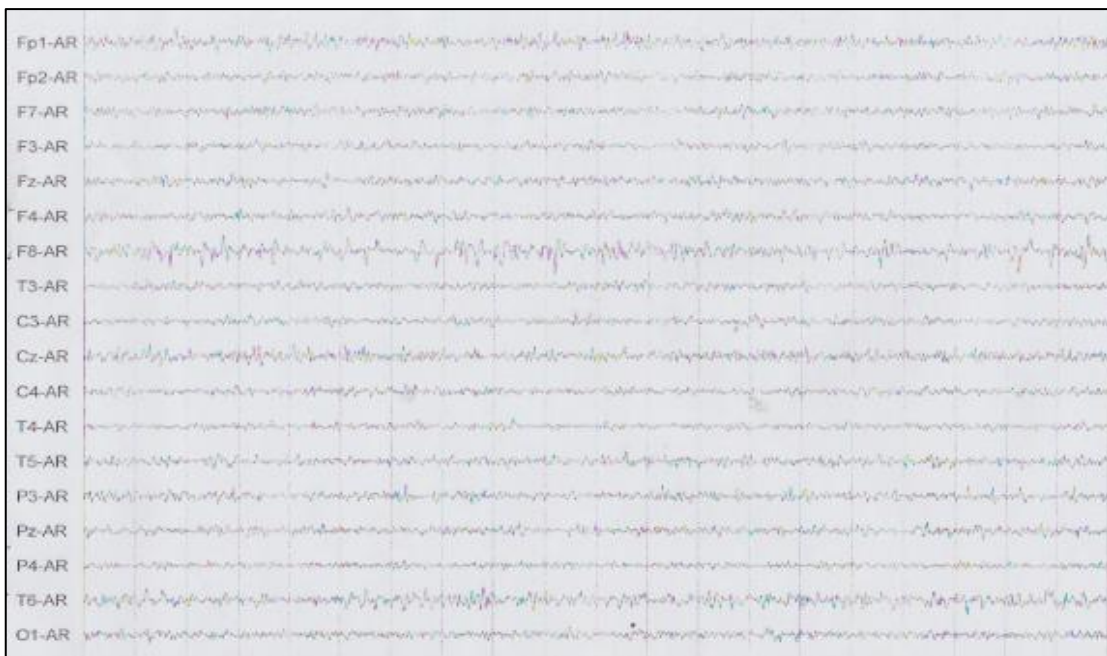


Figure 27: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-SIA-II-02

Evaluation psychiatrique par la DIGS:

Le patient décrit lui même son enfance comme étant malheureuse, sans pouvoir s'exprimer sur les raisons. Son développement psychomoteur est décrit par sa mère comme étant dans la limite de la normale, avec acquisition de la position assise à 10 mois, la marche à 15 mois, le langage à 24 mois, et le contrôle sphinctérien à 3 ans. Son autonomie est à ce jour relative. Le patient n'a pas pu poursuivre sa scolarité au delà de la 6^{ème} année primaire, compte tenu de ses mauvais résultats scolaires. Par ailleurs, il ne consomme aucun produit toxique, et ses consommations de thé et de café sont très minimales (1 verre/jour, 1 tasse/jour).

Les réponses aux questions de dépistage des troubles de l'humeur de la DIGS sont négatives, cependant celles des traits de personnalité schizotypique et de psychose reviennent positives. Le patient se décrit solitaire, isolé de sa famille et de la société, n'ayant pas d'amis. Il n'arrive pas à entreprendre une activité ménagère ou professionnelle, et présente des rituels de lavage et de collectionnisme. Ses émotions sont émoussées, ses propos inadaptés et ses croyances magiques (**Item 32-38. Traits de personnalité schizotypique - DIGS**).

A l'âge de 26 ans, sont apparus progressivement des troubles schizophréniques avec phénomènes hallucinatoires visuels persistant plusieurs semaines (**Item 23- 68-69. Psychose - DIGS**), des idées délirantes de persécution (surtout envers son père) et de référence (**Item 25. Psychose - DIGS**), des troubles du comportement à type d'instabilité psychomotrice, conduites d'errance, injures, discours désorganisé et bizarre avec quelques écholalies (**Item 72-73- 14-15- 17-18. Psychose - DIGS**). Ces symptômes ont motivé l'instauration d'un traitement médicamenteux à base de Risperidone® à raison de 8 mg/jour ensuite 12 mg/jour devant l'absence de réponse. L'évolution a été marquée par la persistance des symptômes psychotiques avec des éléments de désorganisation au premier plan ; apathie et perte de volonté, alogie et affect abrasé (**Item 32-33-47-48-62-63. Psychose - DIGS**), conduisant au diagnostic actuel de schizophrénie désorganisée. Actuellement, le patient est sous Olanzapine® 10 mg/jour et Levomepromazine® 25mg/jour avec une stabilisation partielle de ses troubles.

L'individu II-03 est né le 18/10/1980 à Oran. Célibataire et sans profession, son niveau scolaire est de 8 années d'études. Il a déjà travaillé comme jardinier pendant 2 ans, puis a été licencié à cause de difficultés relationnelles. Suivi en neurologie depuis l'âge de 12 ans pour épilepsie du lobe temporal, ses crises sont faites d'épisodes paroxystiques de dysphasie avec propos incohérents, parfois sensations abdominales « bizarres » durant moins de 3 minutes suivies d'une perte de connaissance avec crise tonico-clonique généralisée, morsure de langue, révulsion des globes oculaires et émission d'urines. Ces crises sont fréquentes se répétant 2 à 4 fois par jour. L'examen neurologique est normal. L'EEG met en évidence un rythme alpha (9 cycles/seconde) postérieur, réactif à l'ouverture des yeux. L'hyperpnée ralentit le tracé et fait apparaître des pointes ondes au niveau des régions frontales et temporales. La SLI est sans effet sur le tracé (**Figure 28**). Le scanner cérébral avec injection de produit de contraste est normal, et l'IRM cérébrale avec injection de gadolinium sans particularités. Le patient a été mis sous plusieurs associations d'antiépileptiques sans amélioration aucune de la fréquence des crises durant plusieurs années, avec cependant une mauvaise observance thérapeutique et une mauvaise hygiène de vie. Actuellement, il est sous Lamotrigine® 200 mg/j et Phénobarbital® 200 mg/j et présente des crises focales hebdomadaires sans généralisation.

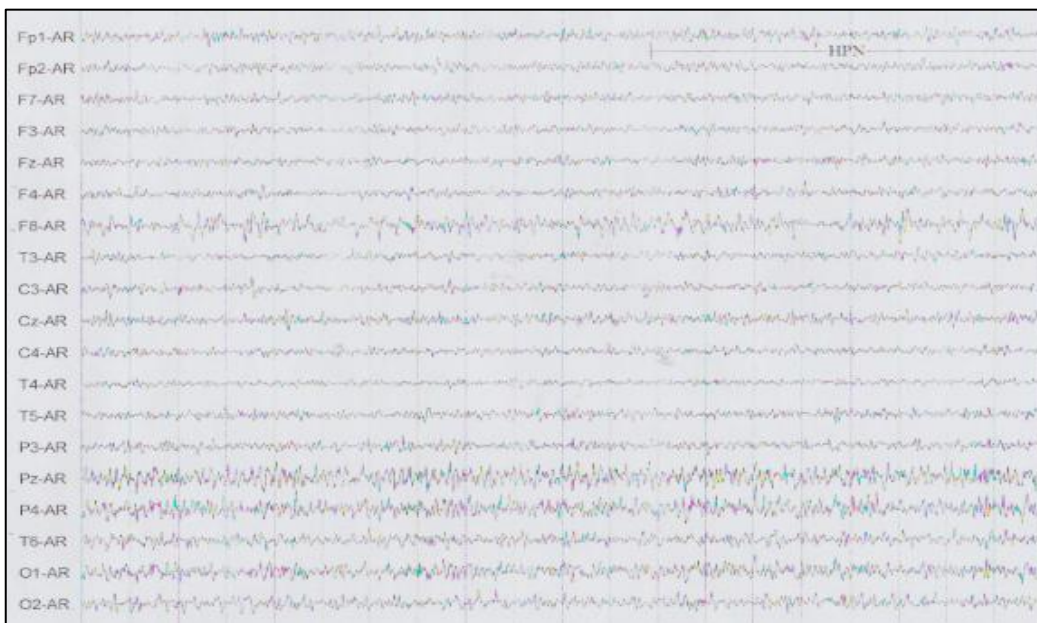


Figure 28: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-SIA-II-03

Evaluation psychiatrique par la DIGS :

Le patient est tabagique depuis l'âge de 17 ans, à raison d'un paquet/jour. Par ailleurs, il consomme régulièrement du café (1 à 2 tasses/ jour) et du thé (3 à 4 verres/ jour). Il rapporte quelques prises d'alcool occasionnelles mais pas de consommation de cannabis.

Dans sa biographie, le patient relate une enfance heureuse au sein de sa famille mais rapporte également quelques conflits conjugaux avec violence physique dans le couple de ses parents (**Item 63-65. Enfance-DIGS**).

Ses troubles psychiatriques ont commencé de manière insidieuse, sur un terrain de personnalité marquée par le retrait, l'introversion, avec comportements impulsifs et agressifs intermittents, faisant suite à des situations sociales de conflit et de frustration.

Le patient décrit des problèmes émotionnels, survenus pour la première fois de manière intense à la suite de la perte de son emploi, provoquant une rupture avec l'état antérieur avec incapacité de travailler ou d'assumer d'autres responsabilités, sans notion de consultation en psychiatrie (**Item 22-27. Aperçu des troubles psychiatriques -DIGS**).

Le patient répond par l'affirmative à toutes les questions de dépistage de l'épisode dépressif majeur (**Item 48-51. Episode dépressif majeur -DIGS, NDDI-E**). Il situe son premier épisode à l'âge de 29 ans, suite à des événements de stress sévère : disparition d'un frère (individu II-05) avec lequel il entretenait une relation très proche (**Item 40-41. Episode dépressif majeur -DIGS**), et licenciement (**Item 46-47**). Durant cet épisode dépressif majeur qui a duré 06 mois environ, le patient a présenté des caractéristiques de sévérité, marquées par une diminution du fonctionnement, insomnie du milieu de la nuit et du petit matin, abus d'alcool mais sans idéation suicidaire. Des caractéristiques psychotiques ont accompagné ce premier épisode à type d'idées délirantes de persécution qui ont cédé avec l'amélioration de l'état thymique. L'évolution fut marquée par la persistance d'une instabilité relationnelle, de comportements impulsifs avec angoisse omniprésente rentrant dans le cadre d'un trouble de la personnalité borderline. A l'âge de 33 ans, le patient a présenté une rechute dépressive sur le même mode, sans facteurs déclenchant significatifs à l'exception de la persistance de la situation de chômage depuis l'âge de 29 ans. Devant la récurrence de ces épisodes dépressifs

majeurs, qui évoluent sur un fond de personnalité borderline et la négativité des réponses aux questions de dépistage des autres troubles psychiatriques sur la DIGS ; le diagnostic de trouble dépressif récurrent sur personnalité de type borderline est retenu chez ce patient. Un traitement par antidépresseur (Sertraline® 50mg/jour) et anxiolytique (Prazépam® 10mg/jour) a été instauré lors du second épisode avec une réponse favorable.

Tous les autres membres disponibles et consentant de la famille nucléaire ont bénéficié d'un examen neurologique et d'une évaluation psychiatrique qui étaient sans particularités. Leurs enregistrements électroencéphalographiques se sont avérés normaux.

3.2. Résultats du séquençage exomique

Etant donné que les enfants affectés sont issus de parents indemnes, nous avons évoqué la possibilité d'un modèle récessif et recherché des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites chez les individus malades.

Un séquençage exonique a été effectué chez les parents (individus I-01 et I-02), les deux enfants malades (individus II-02 et II-03) et deux enfants sains (individus II-01 et II-06). Le **tableau 19** résume le nombre de SNV identifiés pour chaque individu.

Tableau 19: SNVs identifiés lors du séquençage exonique de la famille EPI-ORA-SIA

Échantillons	Reads	Cov 8x	SNV non synonyme	SNV synonyme
EPI-ORA-SIA-I-01	104M	97.68%	10.351	11.653
EPI-ORA-SIA-I-02	92M	97.53%	10.179	11.744
EPI-ORA-SIA-II-01	92M	97.55%	10.261	11.864
EPI-ORA-SIA-II-02	182M	98.15%	10.358	11.716
EPI-ORA-SIA-II-03	94M	97.52%	10.282	11.712
EPI-ORA-SIA-II-06	95M	97.57%	10.246	11.743

Read = nombre de paires de bases lues lors de l'exome.

Cov 8x = le pourcentage de paires de bases lues 8 fois.

SNV non synonyme = nombre de variants identifiés provoquant un changement d'acide aminé.

SNV synonyme = nombre de variants identifiés ne provoquant pas de changement d'acide aminé.

3.3. Résultats de la recherche de variants génétiques par VariantMaster

Des SNVs du gène *Centrosomal Protein 350kDa (CP350)* ont été identifiés à l'état hétérozygote chez les individus sains de cette famille « rs179983405 » et « rs35720901 ». Les deux individus atteints d'épilepsie sont porteurs de mutations hétérozygotes composites de ce même gène, compatibles avec un mode de transmission autosomique récessif (**Tableau 20**).

Un autre polymorphisme « rs59183049 » a été identifié à l'état homozygote chez les deux individus malades et à l'état hétérozygote chez les parents et le frère sain. Ce SNV est localisé au niveau du gène *EGF-like module-containing, mucin-like hormone receptor 3 (EMR3)*.

Tableau 20: SNV identifiés pour le phénotype épileptique

Gène	AA	Zyg	QS	Cov	100 0g	snp137	EVS	SIFT	PP2	I- 01	I- 02	II- 01	II- 02	II- 03	II- 06
CEP350	p.E606A	het	225	448		rs179983405	0.000		0.996	NF	het	het	het	het	NF
CEP350	p.K2735N	het	225	211	0.01	rs35720901	0.006	0.01	0.624	het	NF	NF	het	het	het
EMR3	p.L379V	hom	222	365	0.01	rs59183049	0.017	0.01	1	het	het	NF	hom	hom	het

QS : score de qualité, 225 est le score maximum ; Cov : nombre de lectures de la séquence que couvre la mutation, Minimum acceptable = 30 ; 1000g = Fréquence du variant dans la banque de données des 1000 génomes ; AA = le changement d'acide aminé provoqué par la mutation ; Zyg = si homozygote ou hétérozygote chez le proband ; Snp137 = si le SNP est déjà répertorié ; EVS = la fréquence du SNP dans population caucasienne (Exome Variant Server database) ; NF : not found ; Het = hétérozygote, Hom = homozygote.

Un dernier variant p.G1280E « rs55689103 » a été identifié à l'état homozygote chez l'individu II-02 avec phénotype schizophrénique, compatible avec un mode de transmission autosomique récessif. Ce SNV dont la fréquence allélique est de 0.01021³⁰, entraîne la substitution d'une Glycine par l'acide glutamique en position 1280 du gène *RELN* (**Tableau 21**).

La **figure 29** illustre la séquence du gène *RELN* où l'on peut voir le génotype de chaque individu de la famille. Seul le patient II-02 est porteur de la mutation (homozygote T).

³⁰ <http://exac.broadinstitute.org/variant/7-103234202-C-T> mise à jour le 13/01/2016

Tableau 21: SNV identifié pour le phénotype "schizophrénie"

Gène	AA	Zyg	QS	Cov	1000g	snp137	EVS	sift	pp2hdiv	I-01	I-02	II-01	II-02	II-03	II-06
<i>RELN</i>	p.G1280E	hom	222	373	0.01	rs55689103	0.0115	0	0.997	het	het	het	hom	het	NF

QS : score de qualité, 225 est le score maximum ; Cov : nombre de lectures de séquence que couvre la mutation, Minimum acceptable = 30 ; 1000g : Fréquence du SNP dans la banque de données des 1000 génomes ; AA = le changement d'acide aminé provoqué par la mutation ; Zyg = si homozygote ou hétérozygote chez le proband ; Snp137 = si le SNP est déjà connu ; EVS = la fréquence du SNP dans population caucasienne (Exome Variant Server database) ; Het = hétérozygote, Hom = homozygote.

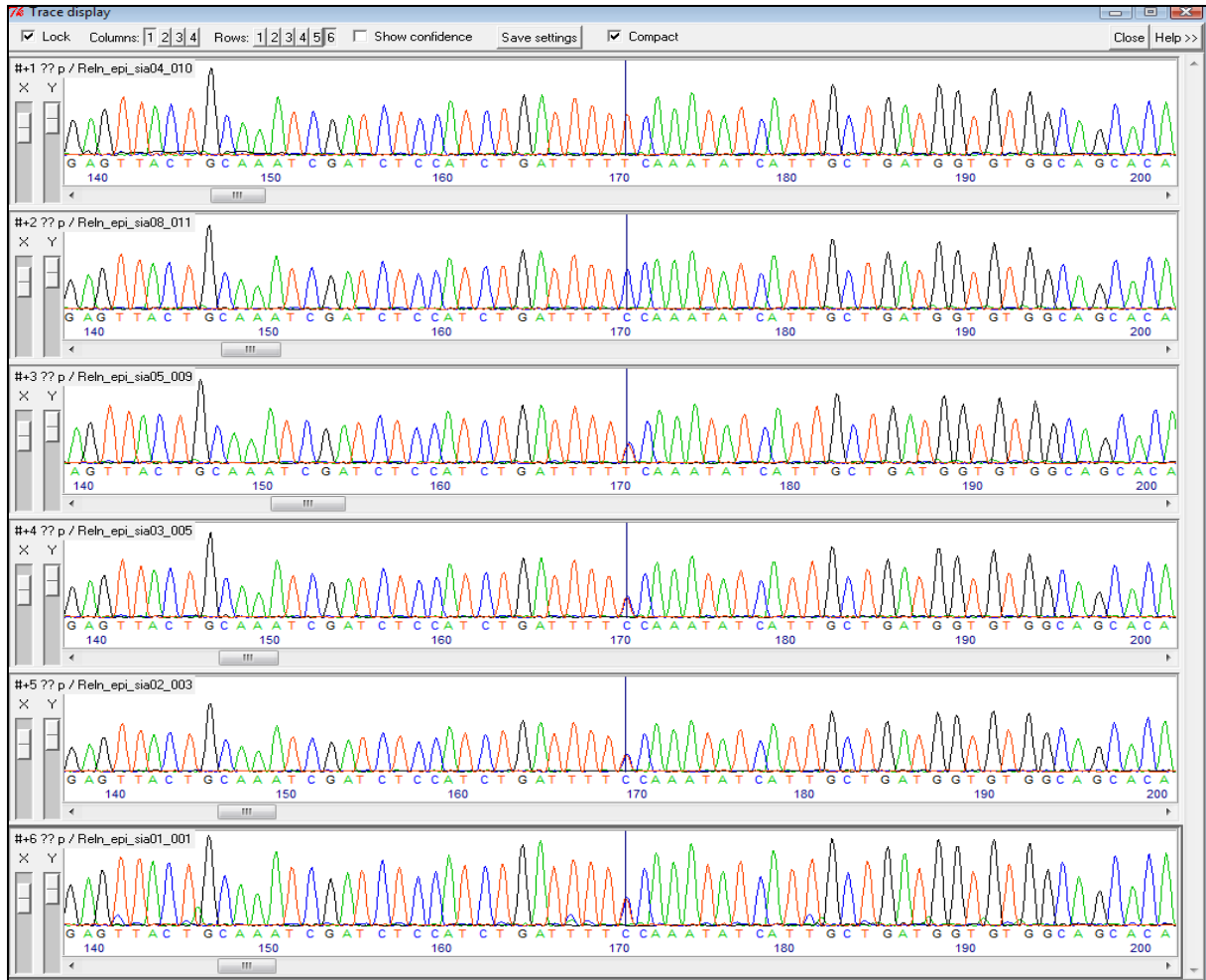


Figure 29: Chromatographe de la séquence du gène *RELN* chez les membres de la famille EPI-ORA-SIA

4. Discussion

4.1. Discussion des modes de transmission

Dans cette famille, deux modèles sont à considérer :

- Dans le premier modèle où l'on ne tient compte que du phénotype épileptique, la transmission paraît être autosomale récessive étant donné que les individus atteints sont issus de parents sains. En effet, dans ce modèle, les parents sont hétérozygotes pour les SNV des gènes *EGF-like module-containing, mucin-like hormone receptor 3 (EMR3)* et *centrosomal protein 350kDa (CEP350)* ; variants qu'ils ont transmis à leurs enfants sains hétérozygotes et aux enfants malades (II-2 et II-03) homozygotes pour le SNV *EMR3* et hétérozygotes composites pour les SNV *CEP350*, ce qui revient au même résultat qu'un SNV homozygote. Toutefois, l'on ne peut exclure une transmission autosomique dominante avec pénétrance incomplète de la maladie.
- Dans le deuxième modèle où l'on ne tient compte que du phénotype « schizophrénie », l'individu II-02 est homozygote pour le polymorphisme du gène *RELN* et II-03 est hétérozygote, au même titre que les parents et la sœur indemnes (individus I-01 et I-02 et II-01). Dans ce contexte, on considère que seule la schizophrénie est le phénotype lié à ce gène et on fait donc abstraction du phénotype épileptique.

4.2. Discussion des résultats du séquençage d'exons

4.2.1. Polymorphismes du gène *CEP350*

Le gène *CEP350* est situé sur le chromosome 1q25. Il mesure 160.108 pb, comporte 40 exons et code pour une protéine centrosomale de 350 kDa. Cette protéine dotée d'un domaine CAP-Gly, typiquement retrouvé dans les protéines associées au cytosquelette, est impliquée dans la régulation des récepteurs hormonaux localisés dans le noyau [420]. Les deux variants identifiés rs179983405 et rs35720901 sont rares, leur fréquence allélique est de l'ordre de 0.00003974 pour le premier SNV³¹, et de 0.001834

³¹ <http://exac.broadinstitute.org/variant/1-179983405-A-C> mise à jour le 15/01/2016

pour le deuxième³². De plus, ils sont prédits pour être pathogènes (damaging) par SIFT³³ et par Polyphen2³⁴.

A ce jour, aucun phénotype, maladie ou trait n'est connu pour être directement associé à ce gène. Donc, il est difficile de déterminer s'il est en cause dans le phénotype de cette famille, d'autant plus que les individus sains (II-04 et II-05) n'ont pas été génotypés pour les deux variants et l'on ne peut donc savoir s'ils présentent le même génotype que les individus malades. Par conséquent, on ne peut exclure ce gène comme étant causatif du phénotype, mais on ne peut non plus affirmer qu'il est le gène causal.

4.2.2. Polymorphisme du gène *EMR3*

Le gène *EMR3*, encore appelé *adhesion G protein-coupled receptor E3 (ADGRE3)* est situé sur le chromosome 19p13.1. Il mesure 55.633 pb et comporte 16 exons [421]. Il code pour une protéine transmembranaire exprimée essentiellement par les cellules immunitaires, jouant un rôle dans les réponses immunes et inflammatoires. Cette protéine agit aussi comme régulateur de la pression artérielle. A ce jour, il n'a jamais été rapporté de troubles neuropsychiatriques associés au gène *EMR3*. Chez nos patients, le variant retrouvé « rs59183049 » est connu et a déjà été répertorié dans la base de données Exac, qui rapporte aussi des homozygotes sains pour ce variant avec une fréquence allélique de 0.013³⁵, ce qui écarte l'hypothèse de sa pathogénicité.

4.2.3. Polymorphisme du gène *RELN*

Le gène *RELN* ([OMIM] 600514) est situé sur le bras long du chromosome 7q22.1 (**Figure 30**). Il mesure 517.733 pb, comprend 65 exons et s'exprime essentiellement dans le cerveau. Il a été identifié en 1995 par clonage positionnel [413, 422, 423]. Il code pour la Reelin, une gigantesque protéine extracellulaire de 3460 acides aminés, qui joue un rôle primordial dans le développement neuronal chez l'embryon mais aussi en post-natal [396, 397, 424]. En effet, la Reelin produite par certains neurones du système nerveux central comme les cellules de Cajal-Retzius, agit sur les cellules de la plaque

³² <http://exac.broadinstitute.org/variant/1-180063445-G-C>. mise à jour le 15/01/2016

³³ <http://sift.jcvi.org/> mise à jour le 15/01/2016, cutoff ≤ 0.05

³⁴ (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> mise à jour le 15/01/2016)

³⁵ <http://exac.broadinstitute.org/variant/19-14752344-G-C>. mise à jour le 15/01/2016

corticale en activant une cascade de phosphorylations, ce qui permet à ces cellules de s'ordonner correctement pour former le modèle architectonique radiaire typique de la plaque corticale précurseur du cortex normal [425-427].

La protéine Reelin est exprimée essentiellement par les interneurons GABAergiques de l'hippocampe et par les neurones du cervelet [409, 410]. Elle joue un rôle important dans la croissance dendritique, dans la plasticité synaptique nécessaire aux fonctions d'apprentissage et de mémoire, et dans la régulation des récepteurs N-Methyl-D-Aspartate (NMDA)[411, 412].

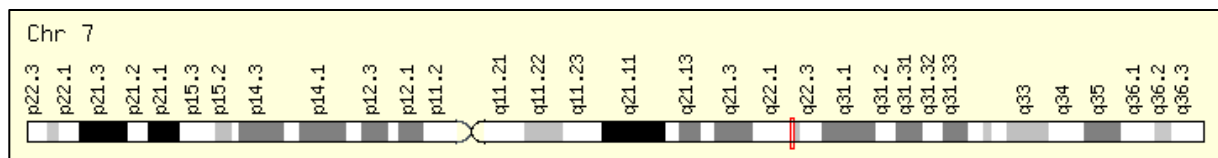


Figure 30: Position du gène *RELN* en 7q22

Reeler est une mutation autosomique récessive de la souris qui affecte le développement embryonnaire du cerveau. Elle provoque des anomalies de l'organisation cytoarchitectonique de nombreuses régions cérébrales, parmi lesquelles le néocortex, l'hippocampe et le cervelet [428, 429]. Ces anomalies, qui touchent spécifiquement la phase terminale de la mise en place des neurones au cours du développement, sont utilisées depuis longtemps comme modèle d'étude du développement cérébral [430].

Il est actuellement admis que les troubles du métabolisme de la protéine Reelin sont impliqués dans certaines affections neuropsychiatriques telles que la schizophrénie, le trouble bipolaire, l'autisme, la dépression majeure, la maladie d'Alzheimer et les défauts de migration associés à l'épilepsie du lobe temporal [419, 424, 431, 432]. Ainsi, une étude Hongroise récente a révélé une association génétique de deux polymorphismes (rs528528 T/T et rs607755 A/A) du gène *RELN* à la maladie d'Alzheimer [433]. Par ailleurs, des études post mortem de patients atteints de schizophrénie, de troubles bipolaires ou encore d'autisme, ont révélé une diminution de l'expression de la protéine Reelin dans le cortex frontal de ces individus [416, 434, 435]. De plus, les souris hétérozygotes pour la mutation *RELN* ont montré des troubles du

comportement et une diminution de la densité dendritique dans le lobe frontal, compatibles avec un tableau de schizophrénie ou d'autisme [436, 437].

Depuis une quinzaine d'années, les études de liaison et d'association ainsi que la recherche des endophénotypes dans la schizophrénie se sont considérablement développées [438, 439]. Ainsi, une étude de liaison a révélé un locus de susceptibilité sur le chromosome 7q21-32 hébergeant le gène *RELN*, et a détecté une association entre des polymorphismes de ce gène et de multiples endophénotypes neuropsychologique tels que la mémoire verbale ($P=0.000003$), la mémoire visuelle de travail ($P=0.002$), et les fonctions exécutives ($P=0.002$) [440]. Par ailleurs, le polymorphisme Val997Leu a été associé à des anomalies ventriculaires chez les patients schizophrènes [441]. Plus intéressant encore, une importante étude d'association pangénomique incluant un large échantillon (2934 cas et 7172 témoins) provenant de cinq populations différentes (Juive Ashkénaze, Chinoise, Irlandaise, Britannique et Américaine) a mis en évidence une association significative entre le polymorphisme rs7341475 du gène *RELN* et la schizophrénie chez les femmes [442]. Une autre étude plus récente a rapporté une association du polymorphisme rs362719 du gène *RELN* à la schizophrénie chez les femmes Chinoises [443].

Des CNV du gène *RELN* ont également été incriminés dans la lissencéphalie autosomique récessive avec hypoplasie cérébelleuse [444]. En effet, Hong et al ont identifié deux familles consanguines avec des réarrangements chromosomiques impliquant le gène *RELN*. Dans la première famille originaire d'Arabie Saoudite, l'analyse par RT-PCR a révélé une délétion de l'exon 36, alors que dans le deuxième pedigree d'origine Britannique, une délétion de l'exon 42 a été identifiée. Les individus porteurs de ces CNV présentaient une ataxie cérébelleuse, un lymphoedème congénital, un retard du développement psychomoteur et une épilepsie. Ces variants étaient responsables d'un taux bas, voir indétectable de protéine Reelin dans le sang. Quelques années plus tard, Chang et al ont décrit le même phénotype dans une famille originaire de Turquie, dans laquelle plusieurs membres étaient porteurs d'une inversion chromosomique au locus du gène *RELN* [445].

En 2007, Zaki et al ont rapporté deux frères d'origine égyptienne issus d'un mariage consanguin, au phénotype de lissencéphalie corticale avec hypoplasie cérébelleuse, épilepsie sévère, et déficience intellectuelle. L'analyse du caryotype a identifié une translocation réciproque $t(7;12)(q22;p13)$ à l'état homozygote, chez les

deux enfants. Des investigations plus poussées ont confirmé l'altération du gène *RELN* en 7q22.1 et des niveaux indétectables de la protéine [446].

Plus récemment encore, Dazzo *et al.* ont identifié sept mutations faux-sens dans le gène *RELN* dans une cohorte de sept familles non apparentées d'origine italienne avec épilepsie familiale latérale du lobe temporal. Les individus porteurs des polymorphismes p.Asp763Gly, p.His798Asn, p.Gly2783Cys, et p.Glu3176Lys ont montré une réduction (jusqu'à 50%) des taux sériques de la Reelin par rapport aux témoins, suggérant une perte de fonction [425].

Dans notre famille, le variant rs55689103 n'a été retrouvé à l'état homozygote que chez l'individu II-02 au phénotype de schizophrénie et ELT, dont l'imagerie cérébrale est normale, ne retrouvant notamment pas d'anomalies du développement cortical. De plus, cet individu ne présente ni retard mental ni ataxie cérébelleuse. Ceci suggère que ce SNV n'est pas impliqué dans le phénotype épileptique, vu qu'il n'a pas été identifié chez le frère II-03 qui souffre d'une ELT avec syndrome dépressif majeur.

Par contre, pour le phénotype « schizophrénie », ce variant pourrait être à l'origine d'un défaut d'expression de la protéine Reelin responsable du tableau psychiatrique. Cependant, nous n'avons pas effectué le dosage plasmatique de la protéine Reelin, et nous ne pouvons donc incriminer ce SNV de façon formelle dans la survenue de la schizophrénie chez notre patient. De plus, la fréquence allélique de notre variant rs55689103 est estimée à 0.01021 par la banque de données ExAc qui rapporte 10 individus homozygotes pour ce même variant³⁶. En outre, lorsque la variation est déjà connue et que sa fréquence dans la population générale est supérieure à 1%, alors il y a peu de chances pour que ce soit la mutation causant la maladie. Cependant, il est à noter que cette base de données rapporte les résultats de populations européennes, asiatiques et latinoafricaines qui ne sont pas représentatives de la population Algérienne ou Maghrébine.

En dépit de l'absence de preuves génétiques convaincantes quant à l'implication de ce polymorphisme dans le phénotype épileptique et psychiatrique de cette famille, nous ne pouvons pas exclure le gène *RELN* au niveau épigénétique. En effet, la région du promoteur du gène *RELN* est riche en îlots CpG couvrant plus de 2.000 pb et est par conséquent, susceptible d'être modifiée par les DNA méthyltransférases (DNMTs) dans

³⁶ <http://exac.broadinstitute.org/variant/7-103234202-C-T>. mise à jour le 15/01/2016

des conditions physiologiques et pathologiques [430]. Ainsi, en analysant l'état de méthylation du promoteur du gène *RELN* chez 13 patients avec ELT et 3 témoins sains, Kobow et *al.* ont constaté une augmentation significative du niveau de méthylation de ce promoteur chez les cas par rapport aux témoins ($p=0.0249$) [447]. Par ailleurs, des études sur les mécanismes de régulation de la Reelin chez l'Homme ont également été réalisées dans le cadre de la schizophrénie, révélant une réduction significative des niveaux d'ARN messenger par hyperméthylation du promoteur du gène *RELN* [448]. Nous évoquons donc la possibilité que des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN et/ou la désacétylation des histones, pourraient être impliqués dans le phénotype de cette famille, aboutissant à une répression transcriptionnelle, réduisant le gène au silence [449]. Il serait donc intéressant d'étudier le niveau de méthylation du promoteur du gène *RELN* afin de confirmer cette hypothèse, et d'adapter le traitement le cas échéant. En effet, l'impact des altérations épigénétiques sur le développement de maladies neurologiques a suscité l'élaboration de nouvelles cibles thérapeutiques et a abouti au développement d'inhibiteurs des DNMTs et des histones désacétylases (HDACs). Ces agents sont destinés à inverser le silençage épigénétique pathologique, favorisant ainsi la réactivation des gènes et leur expression [450]. C'est ainsi que l'influence du Valproate de sodium® sur les processus épigénétiques fut découverte en 2001 par Phiel et al., qui ont démontré que cet antiépileptique agissait comme inhibiteur des HDACs et inducteur de la déméthylation de l'ADN [451]. De plus, il est actuellement clairement établi que cet antiépileptique diminue la méthylation du promoteur du gène *RELN in vitro* [452].

5. Limites de l'étude et conclusion

Dans cette étude, nous n'avons pas pu identifier de façon formelle la ou les mutations causales des phénotypes épileptique et schizophrénique pour plusieurs raisons :

- D'abord, pour des raisons financières, les éléments génomiques fonctionnels autres que les gènes codant les protéines n'ont pas été explorés. Ainsi, le dosage sérique de la protéine Reelin, de même que l'étude du niveau de méthylation du promoteur du gène *RELN* constituent des éléments clés pour l'interprétation des résultats de cette étude.
- D'autre part, nos hypothèses sur les modes de transmission de l'épilepsie et de la schizophrénie pourraient être incorrectes et les individus affectés de cette famille

pourraient souffrir de désordres génétiques distincts.

Nous envisageons donc de poursuivre ce travail pour explorer les éléments génomiques fonctionnels autres que les gènes codant les protéines. Nous projetons également de dépister le polymorphisme rs55689103 dans une population d'épileptiques, de schizophrènes, et de sujets témoins d'origine Algérienne, afin de déterminer sa fréquence allélique dans notre population.

CHAPITRE VI : Mutations du gène *EPM1* et épilepsie myoclonique progressive de type 1

Résumé

Introduction : La maladie d'Unverricht-Lundborg est la forme la plus pure et la moins sévère d'épilepsie myoclonique progressive. Sans déficit cognitif progressif, l'évolution se fait généralement vers une stabilisation des symptômes à l'âge adulte, avec un degré variable de handicap lié avant tout au syndrome myoclonique. Nous rapportons les données cliniques, généalogiques, neurophysiologiques, iconographiques et génétiques de deux familles consanguines originaires de l'Ouest Algérien comptant six individus atteints d'épilepsie myoclonique progressive type 1 (EMP1).

Matériels et méthodes : Tous les membres disponibles de ces deux familles ont été évalués au service de neurologie du CHU d'Oran. Des analyses génétiques par PCR et Southern Blot ont été effectuées chez les cas-index.

Résultats : L'âge moyen de début était de 11.6 ans. Le myoclonus d'action et les crises généralisées ont été rapportés chez tous les patients (100%), et la dysarthrie et l'ataxie dans 50% des cas. Les anomalies EEG à type de décharges de pointes-ondes et de polypointes ondes ont été rapportées chez tous les patients (100%). L'imagerie cérébrale initiale était normale chez tous les individus malades (100%). L'évolution était marquée par la disparition des crises tonico-cloniques généralisées dans 83% des cas avec persistance des myoclonies à des degrés variables. L'analyse des pedigrees plaidait en faveur d'une transmission autosomique récessive et l'analyse par Southern Blot mettait en évidence une expansion de plus de 30 copies du dodécamère CCCC GCCCGCG dans le gène *EPM1*.

Conclusion : Cette étude a rapporté deux nouvelles familles Algériennes consanguines au phénotype d'épilepsie myoclonique progressive de type 1, et confirmé les caractéristiques cliniques et évolutives connues de l'affection et son lien avec l'expansion du dodécamère CCCC GCCCGCG dans le gène *EPM1*.

Mots clés : Maladie d'Unverricht-Lundborg, *EPM1*, CSTB, Southern blot.

CHAPTER VI: *EPM1* mutations and Progressive Myoclonus Epilepsy

Abstract

Background: Unverricht-Lundborg disease (ULD) is the purest and least severe type of progressive myoclonus epilepsy (PME), and is not associated with progressive cognitive deficit. Evolution is characterized by the stabilization of symptoms in adulthood, with a varying degree of disability related primarily to myoclonus. Here, We report the clinical, genealogical, neurophysiological and genetic analysis of six individuals with ULD, belonging to two consanguineous families of Algerian ancestry.

Materials and methods: All available members of both families were evaluated at the neurology department at Oran University Hospital. PCR and Southern Blotting were performed in probands.

Results: The mean age at onset was 11.6 years. Action- or stimulus-sensitive myoclonus and generalized tonic-clonic seizures were recorded in 100% of our patients, and dysarthria with ataxia in 50%. Abnormal EEG was recorded in 100% of our cohort, showing generalized polyspikes and wave discharges. Initial brain MRI was normal in all affected members. Generalized seizures tended to disappear in 83% of cases, but all of them still experiencing myoclonus. Pedigree analysis was compatible with an autosomal recessive inheritance pattern suggesting founder effect. Southern blot analysis revealed expansion of the dodecamer repeat CCCGCCCCGCG in *PME1* gene, to more than 30 copies in both families.

Conclusion: this study reported two novel consanguineous families with Unverricht-Lundborg disease, and confirmed the clinical and molecular features of this disorder.

Key words: Unverricht-Lundborg disease, *EPM1*, CSTB, Southern Blot

1. Introduction

La maladie d'Unverricht-Lundborg a été décrite pour la première en fois en 1891 par Unverricht chez des patients estoniens et secondairement par Lundborg en 1903 chez des cas suédois [453]. Cette maladie est transmise sur un mode autosomique récessif, ce qui explique sa prédominance dans certaines populations privilégiant les unions endogames (Maghreb) et dans certains isolats (Finlande, île de la Réunion) [454]. La maladie débute vers l'âge de 8-15 ans par des crises généralisées tonico-cloniques, rapidement associées à un myoclonus d'action massif et fragmentaire, avec photosensibilité et souvent ataxie [455].

L'*EMP1* est liée à un déficit en cystatine B (CSTB ou stefin), mais les mécanismes responsables des symptômes cliniques ne sont pas encore bien compris [456]. Le gène en cause *EPM1* a été cartographié en 1991 sur le chromosome 21q22.3. Il est le plus souvent porteur d'une expansion d'un dodécamère CCCC GCCCGCG, rarement de mutations ponctuelles [457, 458]. Les allèles normaux présents chez les personnes saines contiennent 2 à 3 copies [459], alors que cette répétition est présente à plus de 30 copies chez les individus atteints d'*EMP1* [460, 461]. Cette expansion peut interrompre la transcription, entraînant la réduction de l'expression de CSTB et l'inactivation de certaines protéases intracellulaires conduisant à la dégénérescence neuronale [456, 462]. Une autre variante (*EMP1B*) a été récemment rapportée dans une famille palestinienne, qui serait liée au chromosome 12 [463]. Le diagnostic d'*EMP1* repose sur la prise en compte des antécédents familiaux, de l'âge de début, du contexte ethnique, du caractère typique des symptômes, et de l'absence de détérioration cognitive et de déficits sensoriels [464]. Les examens neurophysiologiques sont évocateurs mais non spécifiques, et il n'y a pas de marqueur biologique ou histologique. Nous rapportons deux familles consanguines originaires de l'Ouest Algérien comptant six individus atteints d'*EMP1*.

2. Matériels et méthodes

Le recrutement et l'évaluation clinique des familles ont déjà été détaillés dans le chapitre II. Etant donné qu'environ 90% des allèles mutés dans l'*EMP1* sont dûs à l'expansion de la région instable CCCC GCCCGCGⁿ [459], une recherche directe de

mutations du gène *EPM1* a été effectuée chez les cas index des deux familles, par des réactions de polymérisation en chaîne (*Polymerase chain reaction* PCR), et par la technique de Southern Blot (digestion avec l'enzyme Pst1).

2.1. Extraction de l'ADN

Tous les individus disponibles et consentant des deux familles nucléaires codées EPI-ORA-BEL et EPI-ORA-BER ont été prélevés. L'ADN génomique a été extrait du sang par la technique de « *salting out* » [465]. Partant d'un prélèvement sanguin de 15 ml, les globules rouges ont été éliminés par choc thermique. Ensuite, les globules blancs ont été lysés et les protéines digérées par la protéinase K puis précipitées grâce à une forte concentration en chlorure de sodium (NaCl). Enfin, l'ADN génomique a été isolé par l'éthanol, récupéré par centrifugation, séché et solubilisé dans du tampon TE10/1(Tris/HCl: 10mM; EDTA:1mM; pH=8,0).

2.2. Analyse par PCR quantitative (qPCR)

Afin d'amplifier les séquences d'ADN extrait du sang en des millions de copies, des qPCR ont été réalisées en triplicata pour chaque échantillon, en utilisant différentes sondes TaqMan® comportant des reporters FAM duplexés à un essai TaqMan® de référence (RNase P) composé d'un reporter VIC. Les réactions ont été effectuées conformément aux instructions du fabricant dans 10 µl volume final contenant 10 ng d'ADN, 1X TaqMan® génotypage master mix, 1X TaqMan® Copy Number assay, 1X TaqMan® Copy Number reference assay. Les réactions ont été assemblées automatiquement à l'aide d'un appareil Tecan en plaques de 384 puits. Les réactions d'amplification ont eu lieu sur un appareil de PCR en temps réel ABI HT 7900 (Applied Biosystems) en utilisant les conditions thermiques suivantes: 95°C pendant 10 minutes, suivies de 40 cycles de 95°C pendant 15 secondes et 60°C pendant 60 secondes. Les courbes de fluorescence ont été chargées dans le logiciel 2.2.1 SDS (Applied Biosystems, Foster City, Californie, USA) pour définir des seuils dans la phase exponentielle du signal. Les valeurs cycle- seuil (Ct) ont ensuite été exportées en fichiers texte et analysées par le logiciel Copy Caller® version 2.0.

2.3. Analyse par Southern Blot

Le protocole utilisé est celui du laboratoire de biologie moléculaire du Pr Antonarakis, SE³⁷ [459]. L'ADN génomique a été digéré par l'enzyme de restriction Pst 1. Les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose, puis dénaturés par un traitement alcalin du gel d'électrophorèse, pour être transférés à un support souple par simple capillarité. Ces fragments ont ensuite été fixés et hybridés dans des conditions optimales de stringence avec une sonde complémentaire marquée par un radio-isotope. Après de nombreux lavages, le support solide a été mis en contact d'un film photographique pendant plusieurs jours.

3. Résultats

3.1. Résultats de l'analyse clinique et généalogique

3.1.1. Famille EPI-ORA-BEL

Cette famille est originaire de Ain Tadeles, une petite commune de la wilaya de Mostaganem, à 91km d'Oran. Elle compte 38.823 habitants³⁸ pour une superficie de 86km².

Les 5 générations d'ascendants sont natives de la même commune. La famille possède de nombreuses boucles de consanguinité qui font supposer que le trait peut être transmis de manière autosomique récessive, et déterminé par une mutation provenant d'un fondateur commun (**Figure 31**).

³⁷ Laboratoire qui a découvert l'expansion du dodécamère CCCC GCCCGCGⁿ en 1997.

³⁸ https://fr.wikipedia.org/wiki/A%C3%AFn_Tedles. mise à jour le 16/01/2016

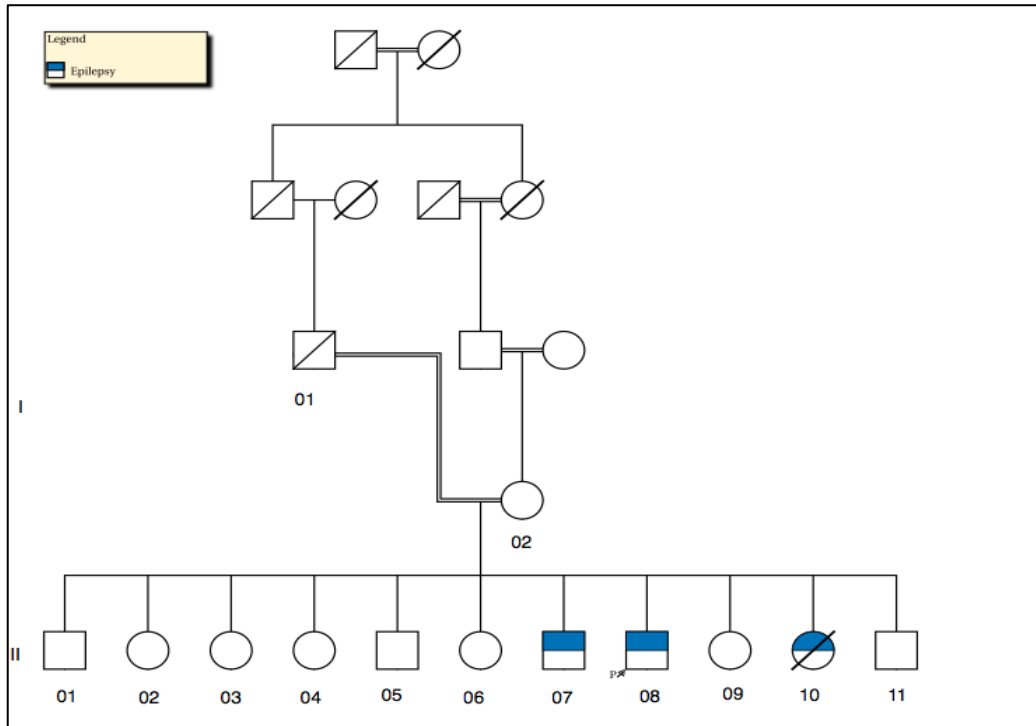


Figure 31: Pedigree de la famille EPI-ORA-BEL

L'individu II-08 est le probant de l'étude. Il est né le 15/05/1980 à Oran, issu d'un mariage consanguin au 2ème degré. Célibataire et sans profession, il a un niveau élémentaire de 6 années d'études. Un diabète de type 2 a été découvert chez lui en 2013 suite à un bilan de routine, et depuis, il est sous metformine® (1700 mg/j). Ce patient est suivi à notre niveau depuis 2007 pour épilepsie myoclonique progressive de type 1. La maladie a commencé insidieusement vers l'âge de 10 ans, avec un myoclonus d'action survenant le matin au réveil. Le patient n'a consulté que deux années plus tard, à l'occasion d'une crise morphéique tonico-clonique généralisée (TCG).

Les myoclonies, très discrètes au début, sont devenues progressivement invalidantes. Elles rendaient progressivement certains mouvements difficiles, comme le lever à partir d'une position assise ou couchée, ou les changements de direction pendant la marche, ou encore la montée et la descente des escaliers. Avec le temps, manger et boire étaient devenus difficiles. De rares absences ont été rapportées par l'entourage. En dépit d'une bithérapie à doses optimales adaptées en fonction du poids et de la tolérance (Valproate® 1500 mg/j et Clonazépam® 4mg/j), les myoclonies tendaient à être permanentes, avec cependant des fluctuations importantes dans la journée (maximum le matin au lever, et le soir à l'occasion de fatigue), ou d'une journée à l'autre.

L'examen neurologique mettait en évidence une ataxie cérébelleuse statico-cinétique avec tremblement intentionnel et une dysarthrie. Les myoclonies étaient déclenchées au moindre bruit. Les capacités cognitives étaient conservées, mais les troubles psychologiques réactionnels et l'hyperémotivité étaient constants. Il n'y avait aucune atteinte sensorielle.

Le premier EEG de veille réalisé à l'âge de 12 ans, montrait une activité de fond normale, avec peu d'éléments lents, mais un certain ralentissement était constaté avec la progression de la maladie. On enregistrait des bouffées courtes et infracliniques de pointes-ondes (PO) et polypointes ondes (PPO) généralisées avec photosensibilité clinique et électrique.

Ces anomalies électriques étaient toujours présentes sur le dernier enregistrement effectué le 03/12/2015 (**Figures 32 a et b**). Par ailleurs, son IRM cérébrale était sans particularités.



Figure 32 a et b: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-BEL-II-08

Aux dernières nouvelles (20/01/2016), le patient était sous Valproate® (1500mg/j) et Lévétiracétam® (3g/j) avec disparition des crises TCG, la dernière remontant à 2009 ; mais persistance des myoclonies rendant la marche très difficile et occasionnant des chutes fréquentes confinant le patient au fauteuil roulant. Nous avons également préconisé une kinésithérapie ainsi qu'un accompagnement psychologique du patient et de sa famille.

L'individu II-07 est né le 17/06/1978 à Oran. Célibataire et sans profession, de niveau scolaire élémentaire (7 années d'études), il a présenté en Novembre 2001 une tuberculose pulmonaire pour laquelle il a été mis sous traitement spécifique durant six mois.

A l'âge de dix ans, il a présenté exactement le même tableau clinique que le probant, a bénéficié des mêmes examens complémentaires et du même traitement, avec cependant une meilleure évolution, marquée par la disparition des crises TCG, la discrétion de l'ataxie cérébelleuse, la persistance de quelques myoclonies matinales non invalidantes et la conservation de l'autonomie dans les tâches quotidiennes.

L'EEG du 17/06/2008 montrait un rythme thêta de 6 c/sec peu structuré, polymorphe et ample de répartition diffuse sur tout le scalp. La réaction d'arrêt visuel était partielle et l'hyperpnée (HPN) ne modifiait pas considérablement le tracé. La SLI suscitait dès les basses fréquences, des décharges de pointes, PP et PPO de moyen voltage, bilatérales et synchrones (**Figures 33 a et b**). Par ailleurs, son IRM cérébrale était normale.

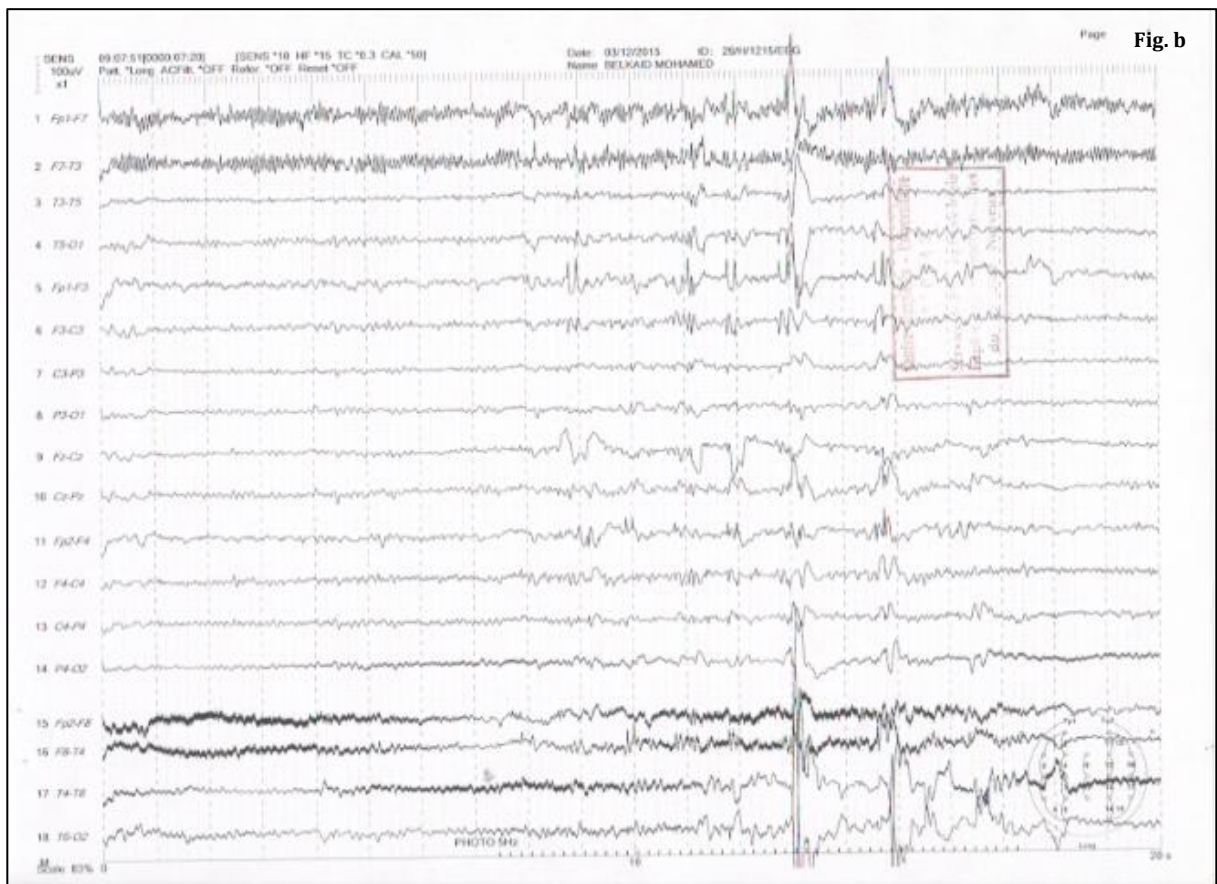
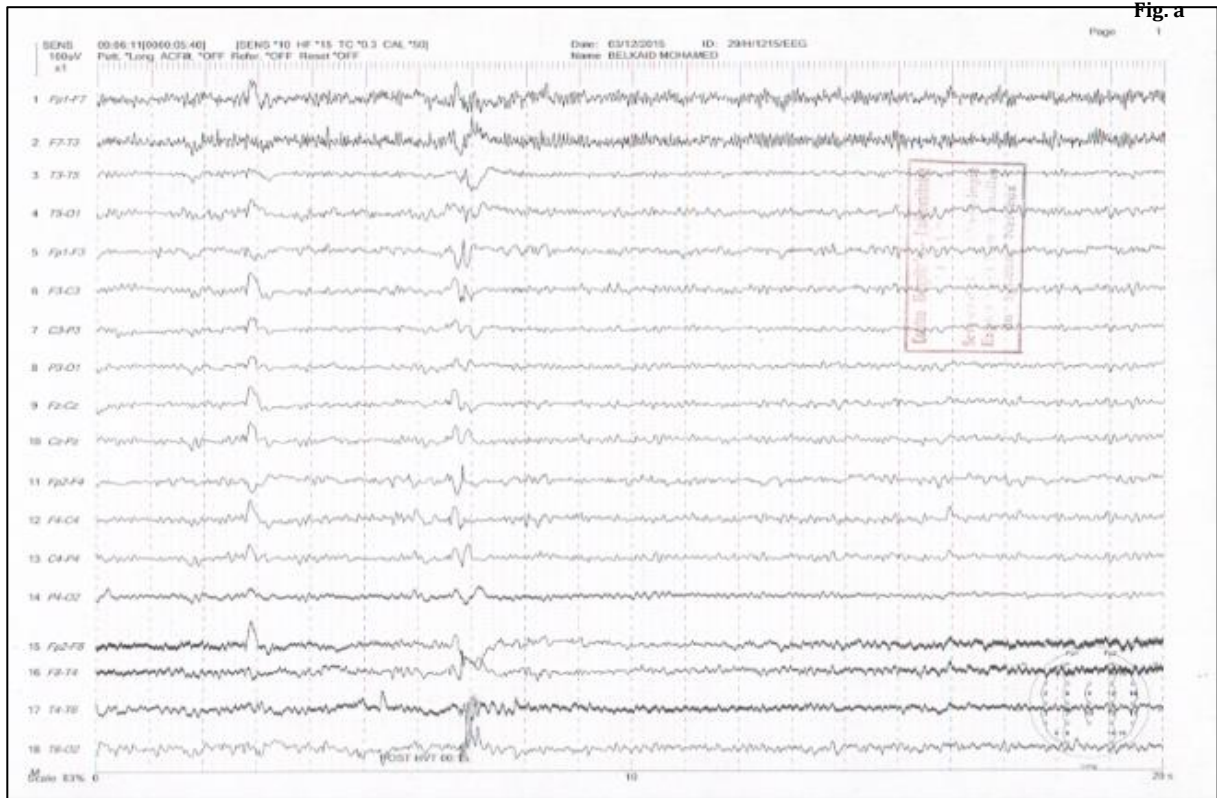


Figure 33 a et b: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-BEL-II-07

II-10 est née le 28/01/1984 à Oran. Sa mère rapporte une enfance sans problèmes de santé ni retard du développement. La maladie s'est manifestée chez elle à l'âge de neuf ans par des myoclonies massives des quatre membres occasionnant des chutes fréquentes et traumatisantes, et des crises TCG quasi-quotidiennes. Elle était suivie en pédiatrie et mise sous Valproate® et Clonazépam®. L'évolution fut marquée par la recrudescence des crises et l'installation de troubles de l'équilibre invalidants. Son enregistrement EEG intercritique était très perturbé par des décharges de PPO généralisées occupant la quasi-totalité du tracé, mais son imagerie cérébrale était normale. Elle est décédée le 23/05/1998 suite à un état de mal épileptique.

La mère ainsi que les collatéraux (individus I-02, II-01, II-02, II-03, II-04, II-05, II-06, II-09 et II-11) sont indemnes de toute pathologie. Ils ont tous bénéficié d'examen neurologique et d'enregistrements électroencéphalographiques qui se sont révélés normaux.

3.1.2. Famille EPI-ORA-BER

Cette famille est originaire de Sidi Ali, une commune de la wilaya de Mostaganem, anciennement appelée Cassaigne pendant la colonisation française. Il s'agit de la troisième commune la plus peuplée de la wilaya de Mostaganem. Selon le recensement général de la population et de l'habitat en 2008, la population de la commune de Sidi Ali est estimée à 37 230 habitants³⁹. Tous les ascendants de cette famille, jusqu'à la 7ème génération sont originaires de cette même région géographique et conservent une préférence pour les mariages consanguins (**Figure 34**). Là aussi, la transmission de la maladie est clairement autosomique récessive, étant donné que les individus atteints appartiennent à la même génération, et qu'ils sont issus de parents indemnes, apparentés au premier degré.

³⁹ https://fr.wikipedia.org/wiki/Sidi_Ali_Mostaganem. mise à jour le 16/01/2016

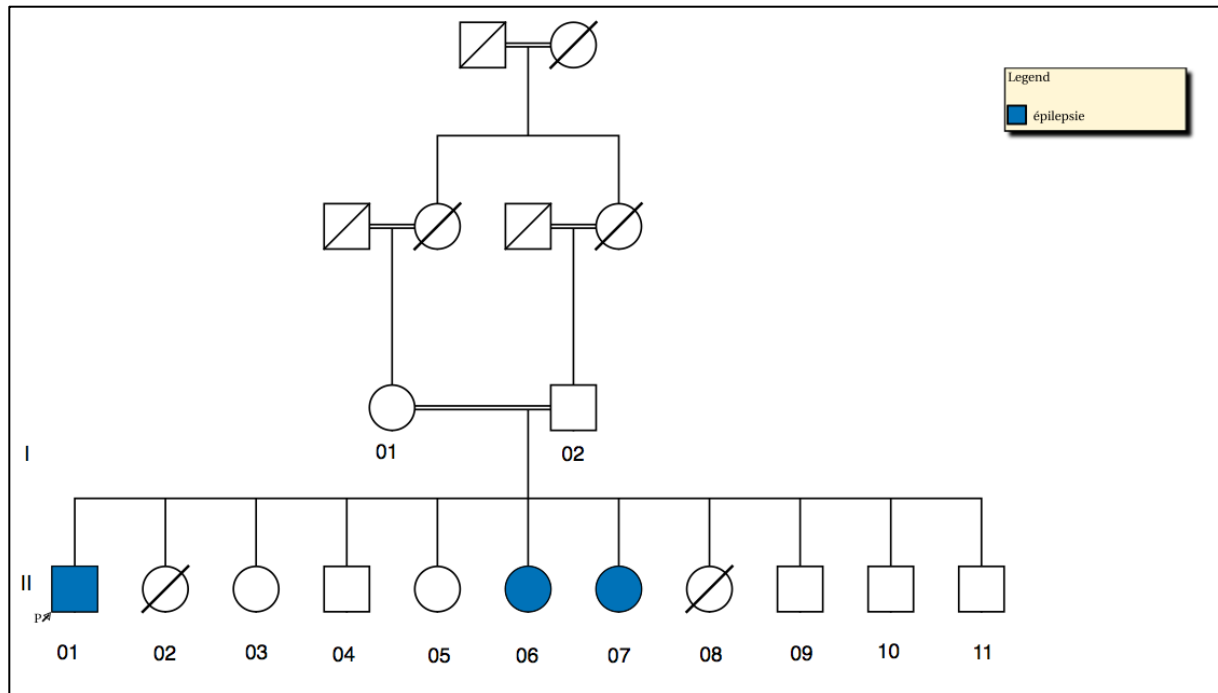


Figure 34: Pedigree de la famille EPI-ORA-BER

L'individu II-01 est le cas index. Il est né le 24/03/1982 à Oran, issu d'un mariage consanguin au 1^{er} degré. Ses parents rapportent un développement psychomoteur normal, et une enfance sans problèmes de santé. Il a quitté les bancs de l'école après 5 années d'études en raison de difficultés d'apprentissage (lecture et calcul), et est actuellement célibataire et sans profession.

Sa maladie s'est manifestée de façon insidieuse à l'âge de 11 ans par des myoclonies d'action survenant avec prédilection le matin au réveil. Ces myoclonies étaient également déclenchées par différents stimuli sensoriels. Il a présenté sa première crise TCG à l'âge de 13 ans, suivie deux années plus tard de troubles de l'équilibre. Au début, son pédiatre lui a prescrit un traitement à base de Carbamazepine® 400mg durant 03 mois avec aggravation du tableau clinique ; les crises TCG étaient devenues plus fréquentes, l'ataxie s'était accentuée occasionnant des chutes fréquentes et les myoclonies étaient quasi-permanentes.

Il s'est présenté au service de Neurologie du CHU d'Oran le 17/03/2003, adressé par son médecin de famille. L'examen retrouvait alors un syndrome cérébelleux avec dysarthrie, tremblement intentionnel gênant l'écriture, et discrète ataxie statico-cinétique.

Son premier EEG de veille datant du 30/04/2003, montrait une activité spontanée faite d'un rythme thêta de 6-7 c/sec, bien structuré, normovolté, diffusant sur tout le scalp d'une façon synchrone et symétrique ; l'HPN déclenchait quelques bouffées de PO et PPO généralisées (3-4 bouffées) brèves et de faible amplitude. Ces anomalies étaient accentuées par la SLI. Le dernier EEG du 07/12/2015: retrouvait les mêmes anomalies (**Figure 35**). Par ailleurs, son imagerie cérébrale était normale.

Il a été mis sous Clonazépan® 2mg/j et Valproate de sodium® 1000mg/j. L'évolution fut marquée par la disparition des crises TCG, la dernière remontant à 2004, avec stabilisation des myoclonies. Aux dernières nouvelles (13/01/2016), le patient était toujours autonome et menait une vie sociale normale.

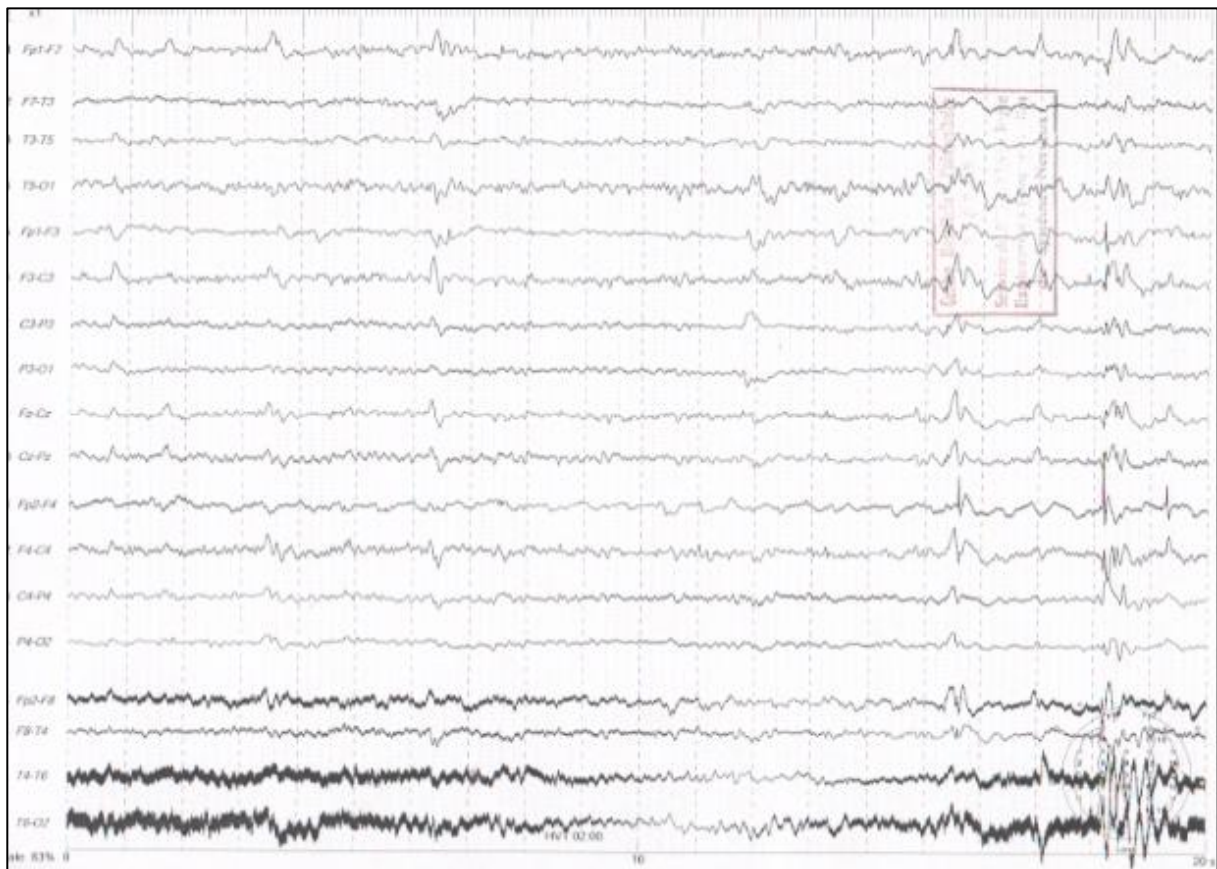


Figure 35: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-BER-II-01

II-06 est née le 16/01/1990 à Oran. Elle est célibataire, a fait 6 années d'études, et est actuellement sans profession. Son développement psychomoteur est décrit comme normal par ses parents. Le début de ses troubles remonte à l'âge de 13 ans par des myoclonies d'action quotidiennes occasionnant des chutes fréquentes avec lâchage

d'objets. Son examen neurologique est normal, ne retrouvant notamment pas de syndrome cérébelleux ni déficit sensoriel.

Le premier EEG de veille dont nous disposons date du 21/07/2008 et montre une activité de fond faite d'un rythme alpha de 8 c/sec, bien structuré, normovolté, diffus et symétrique, interrompu par de brèves bouffées de PO et PPO rapides de faible amplitude, diffuses, synchrones et symétriques. L'HPN altère beaucoup plus le tracé mais la SLI ne le modifie pas. Le dernier tracé EEG datant du 16/04/2015 ne différait pas du premier (**Figure 36**).

L'IRM cérébrale avec injection de gadolinium faite le 12/09/2013 était normale. La patiente a été mise sous Lévétiracétam® 1000 mg/j et Valproate® 500 mg/j, avec disparition des crises TCG et diminution de la fréquence des myoclonies qui ne survenaient que le matin au réveil. Cette patiente est autonome et mène une vie sociale normale.

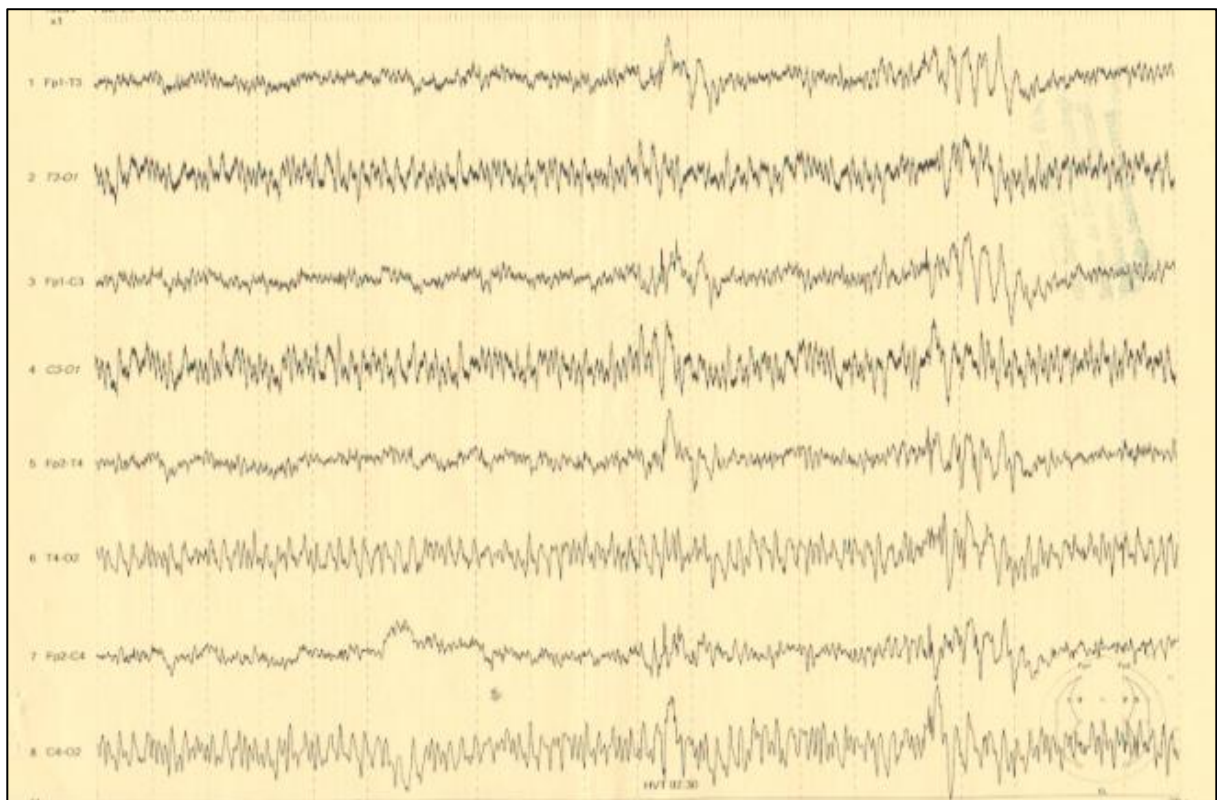


Figure 36: Tracé de l'individu EPI-ORA-BER-II-06

II-07 est née le 20/05/1991 à Oran. Elle aussi est célibataire, a fait 6 années d'études, et est actuellement sans profession. Après un bon développement psychomoteur, elle présente depuis l'âge de 13 ans des myoclonies matinales rarement suivies de crises TCG.

L'examen neurologique est normal. Le premier EEG datant du 16/04/2005 montre un tracé comportant des décharges d'ondes lentes, PO et PPO de moyen et haut voltage diffuses plus prononcées sur les régions frontales ; ces anomalies sont exacerbées par l'HPN et la SLI (**Figure 37**).

L'IRM cérébrale est sans particularités. La patiente a été traitée par Lévétiracétam® à raison de 1500 mg/j avec disparition des crises grand mal et atténuation des myoclonies.

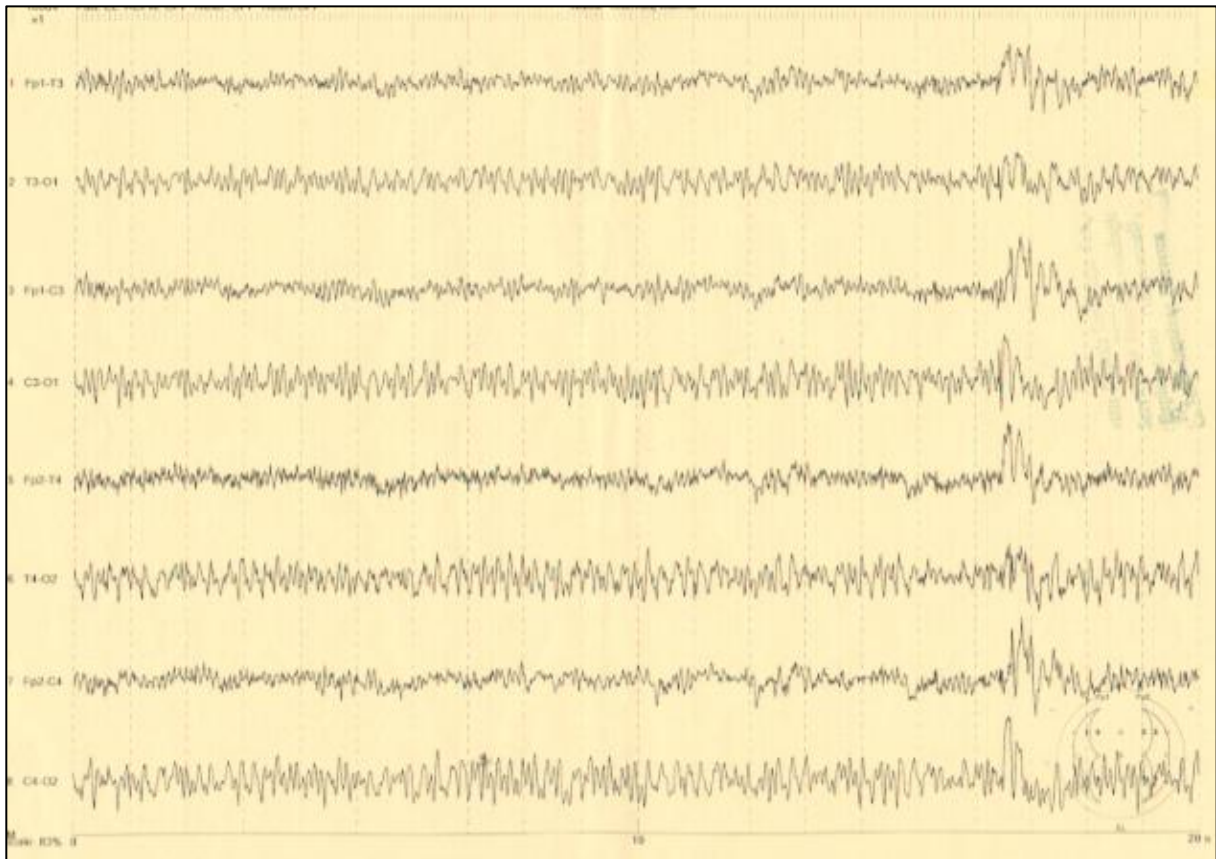


Figure 37: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-BER-II-07

Les parents ainsi que les collatéraux (individus I-01, I-02, II-02, II-03, II-04, II-05, II-09, II-10 et II-11) sont indemnes de toute pathologie. Ils ont tous bénéficié d'examen neurologique et d'enregistrements électroencéphalographiques qui se sont révélés normaux.

3.2. Résultats de l'analyse génétique par Southern Blot

Une analyse par Southern Blot a été effectuée chez les cas index des deux familles. Les résultats ont été comparés à trois témoins sains et à un témoin muté hétérozygote (**Figure 38**).

- Chez l'individu EPI-ORA-BER-II-01, une expansion homozygote pathologique de la région instable du gène *CSTB* a été identifiée (expansion d'environ 30 unités dodécamériques). Génotype : g.513685_513696[(30)];[(30)].
- Chez l'individu EPI-ORA-BEL-II-08, une expansion homozygote pathologique de la région instable du gène *CSTB* a été mise en évidence (expansion d'environ 40 unités dodécamériques). Génotype: g.513685_513696[(40)];[(40)].

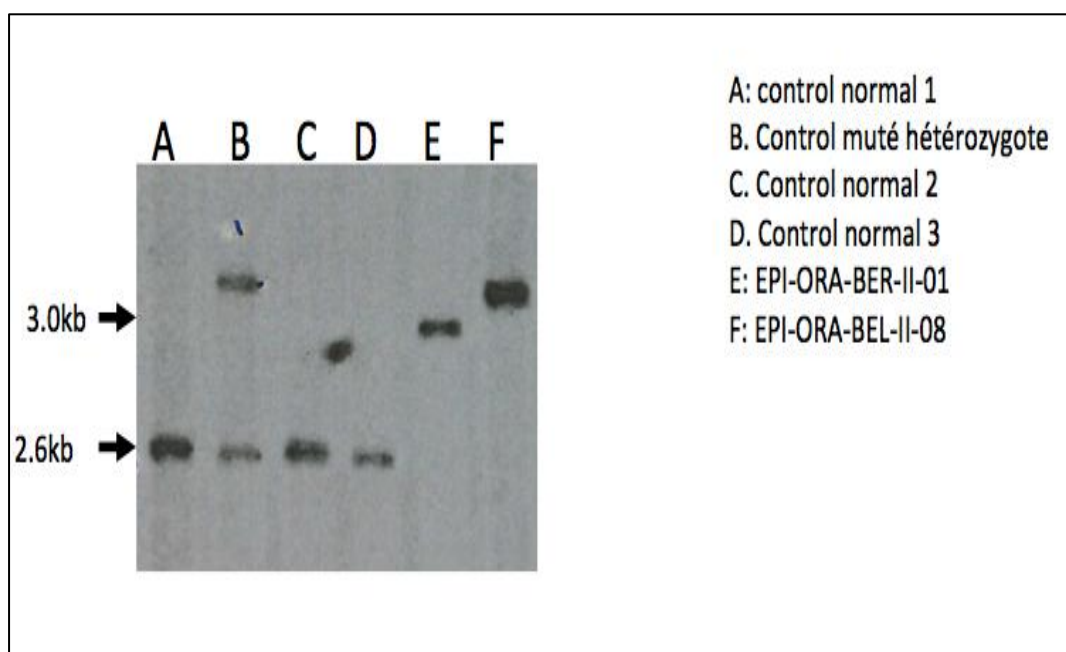


Figure 38: Résultats de l'analyse par Southern Blot

4. Discussion

4.1. Discussion des résultats cliniques, généalogiques et des modes de transmission

Les deux familles consanguines de cette étude sont originaires de deux petits villages de la ville de Mostaganem. Cette ville est bordée par le littoral du bassin méditerranéen, où l'EMP1 constitue le type le plus courant d'épilepsie myoclonique progressive. En effet, si la maladie est ubiquitaire, elle est plus fréquente dans certains isolats géographiques tels que la Finlande et l'île de la Réunion, ou dans certaines populations à forte endogamie comme celles du Maghreb [453]. Ainsi, dans un isolat avec prévalence élevée d'EMP1 et forte consanguinité à l'île de la Réunion, Moulard et al ont pu remonter à un fondateur unique, arrivé de France métropolitaine vers la moitié du XVIIIème siècle [454]. La même équipe a effectué une étude des haploypes du chromosome 21 avec expansion des répétitions du dodécamère, et a retrouvé le même haplotype chez des nord africains et des scandinaves atteints d'EMP1, suggérant un ancien effet fondateur commun dans ces deux populations, dont l'ancêtre conducteur aurait existé il y a environ 2500 ans (100 à 150 générations) [466]. Dans nos deux familles, la transmission semble suivre un modèle mendélien autosomique récessif. En

effet, les individus atteints sont issus de mariages consanguins, leurs parents ayant des ancêtres communs sont donc probablement conducteurs de l'anomalie génétique.

L'âge moyen de début est de 11.6 ans, ce qui est compatible avec la plupart des études qui rapportent un début entre 6-15 ans avec un pic dans la tranche d'âge 9-13 ans [231].

La maladie s'est manifestée de façon insidieuse par un myoclonus d'action chez tous nos patients (100%). Ces myoclonies très discrètes au début, sont devenues progressivement plus fréquentes, surtout au lever et lors des mouvements. Elles se sont stabilisées au fil du temps chez quatre patients (80%), et sont devenues invalidantes, occasionnant des chutes fréquentes, chez un seul patient (EPI-ORA-BEL-II-08), le confinant au fauteuil roulant. Les crises TCG tendaient à disparaître avec l'évolution de la maladie chez cinq patients (83%). Nos résultats rejoignent ceux rapportés dans la littérature. En effet, dans une cohorte suivie pendant 20 ans, Magauda et al, ont constaté la disparition des crises TCG après les cinq premières années et une stabilisation des myoclonies après les dix premières années [230]. La sévérité des myoclonies serait significativement associées à l'âge de début et à la durée d'évolution de la maladie [467].

L'ataxie cérébelleuse avec ou sans dysarthrie, était présente à des degrés variables chez 3 individus de notre échantillon (50%) ce qui est compatible avec les données de la littérature [230, 468]. En effet, une ataxie est généralement présente, parfois difficile à évaluer en raison de l'intensité des myoclonies, pouvant s'associer à d'autres symptômes cérébelleux, comme un tremblement intentionnel et une dysarthrie, cette dernière pouvant représenter un handicap important pour les patients [453].

Chez nos patients, après une évolution moyenne de 20 ans, nous n'avons pas constaté de troubles cognitifs sévères ou de détérioration intellectuelle significative, ni de troubles psychiatriques. En effet, et contrairement à d'autres épilepsies myocloniques progressives, l'EMP1 ne comporte pas d'atteinte corticale, ce qui peut être corrélé à l'absence d'évolution cognitive péjorative dans cette maladie [469]. En outre, si certains patients présentent une déficience intellectuelle, le plus souvent légère, cette atteinte n'est pas évolutive [453].

La sévérité du phénotype est hétérogène d'une famille à l'autre et au sein de la même famille. Ainsi, dans la famille EPI-ORA-BER, les deux sœurs malades présentent

un phénotype compatible avec une vie sociale normale (absence d'ataxie, rareté des myoclonies et disparition des crises TCG), alors que le frère II-01 présente une ataxie cérébelleuse avec dysarthrie et des myoclonies prédominant aux membres supérieurs gênant l'écriture. Par ailleurs, c'est dans la famille EPI-ORA-BEL que l'hétérogénéité clinique intrafamiliale est la plus évidente, avec un individu encore autonome, un deuxième avec ataxie invalidante et une sœur au phénotype sévère, décédée suite à un état de mal épileptique. Il peut donc y avoir au sein d'une même famille des formes mineures d'EMP1 sans la symptomatologie complète, et des cas présentant une « ataxie myoclonique progressive » invalidante et des crises tonico-cloniques généralisées fréquentes et pharmacorésistantes [470].

Le tracé EEG était perturbé chez tous nos patients (100%) ; il mettait en évidence des décharges de pointes, PP et PPO généralisées, un discret ralentissement du rythme de fond, avec ou sans photosensibilité. Ces anomalies ont été rapportées dans la plupart des séries [471].

L'imagerie cérébrale réalisée en début d'évolution était normale chez tous nos patients, ce qui concorde avec les résultats des études antérieures qui ne rapportent pas d'anomalies spécifiques à la neuroimagerie, hormis une discrète atrophie diffuse pouvant être constatée après de longues années d'évolution. Par ailleurs, une hyperostose frontale interne a également été rapportée chez des patients atteints d'EMP1 [472].

4.2. Discussion des résultats de l'analyse par Southern Blot

Chez les deux cas index testés par Southern Blot, une expansion pathologique de la région instable du gène *CSTB* a été identifiée à l'état homozygote (expansion d'environ 30 unités dodécamériques chez l'individu EPI-ORA-BER-II-01 et de 40 unités chez l'individu EPI-ORA-BEL-II-08). Ces résultats sont compatibles avec le diagnostic génétique d'épilepsie myoclonique progressive de type 1. En effet, la maladie d'Unverricht-Lundborg est liée à des mutations du gène de la cystatine B (*CSTB* : NM_000100) cartographié sur le chromosome 21q22.3. Il s'agit d'un petit gène de 3kb comportant trois exons d'une longueur de 297 pb, codant pour la cystatine B, une protéine de 98 acides aminés dont le rôle principal est l'inhibition des cystéine-protéases. Ce gène a été identifié en 1997 par l'équipe du Pr Stylianos Antonarakis, avec laquelle nous avons collaboré pour l'étude génétique de nos familles [459, 473].

La liaison de l'EMP1 au gène *CSTB* a été confirmée chez des patients d'origine méditerranéenne, française et maghrébine [474]. Le gène a été appelé *EPM1* en tant que premier gène identifié dans une EMP. L'anomalie la plus fréquente est une expansion d'un dodécamère (5'-CCCCGCCCCGCG-3') dans la région promotrice de *CSTB* [459, 460, 475]. Les individus sains présentent un polymorphisme avec 2 ou 3 copies, alors que ceux avec phénotype EMP1 sont porteurs d'allèles contenant au moins 30 répétitions. L'expansion à l'état homozygote est constatée dans environ 90% des allèles, surtout en présence d'un effet fondateur [454, 460].

À l'instar de la plupart des maladies avec expansion de triplets comme la maladie de Huntington, il n'a pas été constaté de corrélation significative entre le nombre d'expansions et l'âge de début ou la sévérité de la maladie [460, 476, 477]. Ces caractéristiques cliniques pourraient donc être influencées par des gènes modificateurs et/ou des facteurs environnementaux.

Les mutations ponctuelles sont beaucoup plus rares : une mutation homozygote G4R a été constatée chez un patient marocain [459]. Les autres mutations ponctuelles sont en général retrouvées chez des hétérozygotes présentant par ailleurs l'expansion du dodécamère. Les mutations ponctuelles changent un seul acide aminé et induisent des protéines tronquées [478] (**Figure 39**).

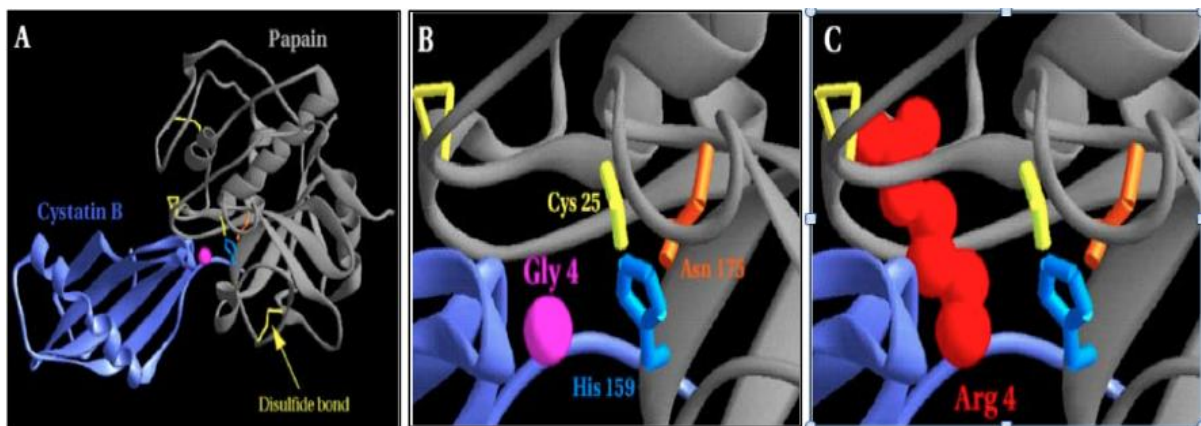


Figure 39: Structure de la protéine CSTB humaine [479]

A. représentation en ruban du complexe cystatine B (bleu)-papaine (gris).

B. site actif dans le type sauvage.

C. site actif dans le mutant G4R. Cette chaîne latérale est en conflit stérique avec le site de liaison sur la papaine, et est susceptible de réduire l'activité inhibitrice de la cystatine B.

Une autre variante (*EMP1B*) a été récemment rapportée chez des familles négatives pour la mutation du gène *EPM1*, avec des symptômes comparables. Ainsi, dans une famille palestinienne consanguine, une mutation p.Arg104Gln du gène *Prickle drosophila, homolog of, 1 (PRICKLE1, OMIM 608500)*, connu aussi sous le nom de REST/NRSF interacting LIM domain protein (*RILP*), a été identifiée sur le bras long du chromosome 12 (12q12). Ce gène code pour une protéine de la voie de signalisation WNT non canonique [479]. Par ailleurs, des mutation de Scavenger Receptor Class B, Member 2 (*SCARB2* ou *LIMP2, OMIM 602257*), situé sur le chromosome 12 et qui code pour une protéine membranaire lysosomiale ont été décrites chez des patients avec le syndrome myoclonus d'action/insuffisance rénale [463, 480].

Malgré la caractérisation de l'anomalie retrouvée chez la quasi-totalité des patients présentant une *EMP1*, le mécanisme physiopathologique de la maladie est encore obscur. Des modèles de rongeurs déficients en *CSTB* ont été mis au point : chez les souris transgéniques, on a pu montrer que le déficit en cystatine B provoquait une activation anormale de la cathepsine S, de la chaîne C1qB du complément (C1qB), de la bêta2-microglobuline, de la protéine gliale fibrillaire acide (pGfa), de l'apolipoprotéine D, de la fibronectine 1 et de la métallothionéine II, qui sont toutes impliquées dans la protéolyse, l'apoptose, et l'activation gliale [481, 482]. La plupart des modifications fonctionnelles associées aux diverses mutations décrites dans l'*EMP1* semblent altérer effectivement la production de cystatine B, et ses fonctions associées aux lysosomes [483]. Il pourrait donc s'agir d'une nouvelle pathologie lysosomiale de mécanisme indirect.

5. Conclusion

L'étude de ces deux nouvelles familles Algériennes consanguines atteintes d'épilepsie myoclonique progressive type 1 confirme les caractéristiques cliniques et évolutives connues de cette affection et son lien avec les anomalies du gène *EPM1*. En dépit des avancées de la recherche sur cette maladie, l'*EMP1* n'a pas encore dévoilé tous ses secrets. En effet, plusieurs questions restent en suspens ; telles que le rôle du déficit en cystatine B dans la survenue du tableau clinique caractéristique de la maladie, et les facteurs incriminés dans la variabilité phénotypique inter et intrafamiliale. La caractérisation clinico-génétique d'autres familles consanguines multigénérationnelles atteintes de MUL pourrait peut être élucider ces énigmes.

CHAPITRE VII : Variations du nombre de copies d'ADN et épilepsie

Résumé

Les variations du nombre de copies d'ADN (*Copy number variants* CNV) jouent un rôle clé dans le déterminisme génétique de nombreux désordres neurodéveloppementaux [484, 485]. Plusieurs études ont révélé que certains remaniements chromosomiques étaient pourvoyeurs d'épilepsie [486-488], et que les nouvelles technologies telles que l'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN (array-CGH) pourraient contribuer à détecter des CNV pathogènes chez les individus épileptiques.

Cette étude a pour objectifs de décrire deux familles Algériennes où le phénotype épileptique est associé à d'autres troubles d'allure génétique, et de rechercher des CNV au moyen d'une analyse du génome entier par array-CGH de haute résolution.

La première famille comporte neuf individus épileptiques dont deux présentent en plus, une paraplégie spastique héréditaire complexe, et sept sont décédés d'une façon soudaine et inattendue (SUDEP). Dans cette famille, un seul CNV a été identifié en 7q21.12 impliquant le gène *ABCB1*, dont les polymorphismes ont été associés à la résistance à certains médicaments antiépileptiques. La deuxième famille comporte deux individus atteints d'épilepsie myoclonique juvénile, un individu avec mouvements anormaux et un autre avec déficience intellectuelle (DI) et syndrome dysmorphique. Dans cette famille, six CNV différents ont été identifiés dont un en 22q11.21 chez l'individu avec DI.

Mots clés: CNV, array-CGH, Duplication, Délétion, SUDEP, Paraplégie spastique héréditaire.

CHAPTER VII: Copy Number Variations in Epilepsy

Abstract:

Copy Number Variants (CNV) play a key role in genetic determinism of many neurodevelopmental disorders [484, 485]. Several studies have shown the involvement of chromosomal aberrations in genetic epilepsies [486-488], which could be identified by new technologies such as Comparative Genomic Hybridization DNA microarray (*array-CGH*).

This study aims to describe two Algerian families with epileptic phenotype and other genetic disorders, and to seek for CNV associated with epilepsy, using high-resolution *array-CGH*.

The first family includes nine epileptic individuals. Two individuals were diagnosed with hereditary complex spastic paraplegia, and seven died suddenly and unexpectedly (SUDEP). In this family, one CNV was identified in 7q21.12 involving the *ABCB1* gene, which polymorphisms have been associated with resistance to antiepileptic drugs. The second family includes two individuals with juvenile myoclonic epilepsy, one individual with movement disorders, and another with intellectual disability (ID) and dysmorphic syndrome. In this family, six different CNV were identified including one in 22q11.21 in individual with DI.

Key words: CNV, *array-CGH*, Duplication, Deletion, SUDEP, Hereditary spastic paraplegia.

1. Introduction

Aujourd'hui, la CGH array a supplanté le caryotype pour l'étude globale du génome en offrant une résolution 10 à 500 fois supérieure et en donnant accès au contenu génique de la région remaniée appelée variant du nombre de copies d'ADN (*copy number variants* CNV), un terme introduit avec l'apparition de cette nouvelle technique [489]. Il correspond à des variations quantitatives du génome d'un individu malade (délétions, duplications, insertions ou remaniements complexes), en comparaison avec un génome de référence, d'une taille d'un kilobase à plusieurs mégabases [490, 491].

Les CNV ont été identifiés chez 8 à 17% des patients présentant une épilepsie associée ou non à d'autres troubles neurodéveloppementaux, tels que la déficience intellectuelle (DI) et les troubles du spectre autistique (TSA) [486, 487, 492, 493]. Bien que les CNV pathogènes soit très rares, certains ont été identifiés de façon récurrente chez des patients épileptiques [494]. En effet, trois microdélétions sur les chromosomes 15q11.2, 15q13.3 et 16p13.1, sont présentes chez plus de 3% des patients avec épilepsie généralisée génétique (EGG) et 1% des patients avec épilepsie focale [201, 495]. Le premier CNV inclut le gène « Non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 2 » (*NIPA2*), impliqué dans l'épilepsie absence de l'enfant dans la population chinoise [496]. Le deuxième CNV comporte le gène *CHRNA7* codant pour la sous-unité alpha7 du récepteur nicotinique à l'acétylcholine qui est considéré comme un gène candidat pour le phénotype épileptique [130]. Le troisième CNV inclut le gène *Nude, A. Nidulans, Homolog of, 1 (NDE1)*, connu pour son interaction avec le gène *Lisencephaly Type 1 (LIS1)*, responsable d'anomalies du développement cortical [263]. Cependant, ces CNV récurrents sont également retrouvés chez les apparentés sains, suggérant que leur contribution aux maladies neuropsychiatriques est modeste et illustrant la complexité de leur architecture génétique sous-jacente.

Un autre exemple de CNV associé à une énorme variabilité phénotypique est la microdélétion/microduplication 16p11.2 réciproque, qui a été identifiée chez des sujets avec différentes associations de DI, TSA, épilepsie, anomalies congénitales, et/ou obésité [497]. Par ailleurs, le constat de CNV chez les patients présentant des phénotypes épileptiques bien définis avait fourni les principaux indices pour l'identification de plusieurs gènes pathogènes, tels que *Syntaxin binding protein 1 (STXBP1)*, *Procadherin*

19 (*PCDH19*) ou Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 2A (*GRIN2A*) [498, 499]. Ici, nous décrivons deux familles d'origine Algérienne comportant plusieurs individus atteints d'épilepsie, et nous rapportons les résultats de recherche de CNV par CGH *array*.

2. Matériel et méthodes

2.1. Analyses par CGH-*array*

Afin de mesurer les pertes et les gains de matériel génétique, une étude pangénomique du nombre de copies d'ADN (CNV) a été réalisée chez tous les individus atteints et leur apparentés sains. Pour cela, le kit Agilent Human Genome CGH Microarray Kit 244K (Santa Clara, CA) a été utilisé. La puce a été scannée par un scanner Agilent DNA microarray. Les données ont été obtenues par le programme Agilent Feature extraction software 9, et analysées par le logiciel Agilent CGH analytics 3.4.

2.2. Analyses bioinformatiques par Genome Browsers

Afin d'interpréter les résultats générés par ces algorithmes, nous avons introduit les données de cartographie dans la base de données NCBI Build Hg19⁴⁰. Les CNV ont ensuite été vérifiés grâce à la base de données des Variants génomiques (DGV database) qui utilise la version GRCh37/hg19 du génome humain, et qui décrit un ensemble de CNV « bénins » retrouvés chez des témoins sains dans différentes populations⁴¹. Les CNV retenus ont été analysés à partir des bases de données : UCSC (University of California in Santa Cruz)⁴² et *Ensembl*⁴³, pour étudier les gènes impliqués dans ces délétions et duplications.

Nous avons également consulté la base de données OMIM pour définir la fonction des gènes et les phénotypes connus. Les CNV sélectionnés ont été recherchés dans la littérature scientifique internationale à travers Pubmed⁴⁴, et dans la base de données

⁴⁰ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mise> à jour le 21/01/2016

⁴¹ <http://projects.tcag.ca/variation/mise> à jour le 03/02/3916

⁴² <http://genome.ucsc.edu/mise> à jour le 03/02/2016

⁴³ <http://www.ensembl.org/mise> à jour le 03/02/3016

⁴⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/mise> à jour le 03/02/2016

Decipher (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*)⁴⁵.

3. Résultats

3.1. Résultats de l'analyse clinique et généalogique

3.1.1. Famille EPI-ORA-FEL

Cette famille est originaire de l'ouest Algérien (Mascara du côté maternel et Ouled Maallah du côté paternel, un petit village mostaganémois à 29km de Sidi Ali). Elle compte neuf individus atteints d'épilepsie dont sept sont décédés de façon soudaine et inexplicable. Seuls les membres de la famille nucléaire, vivants au moment de l'étude, ont bénéficié d'analyses génétiques par hybridation génomique comparative (*array-CGH*), en l'occurrence les individus I-06, I-07, II-06, II-08, II-10 et II-11 (**Figure 40**).

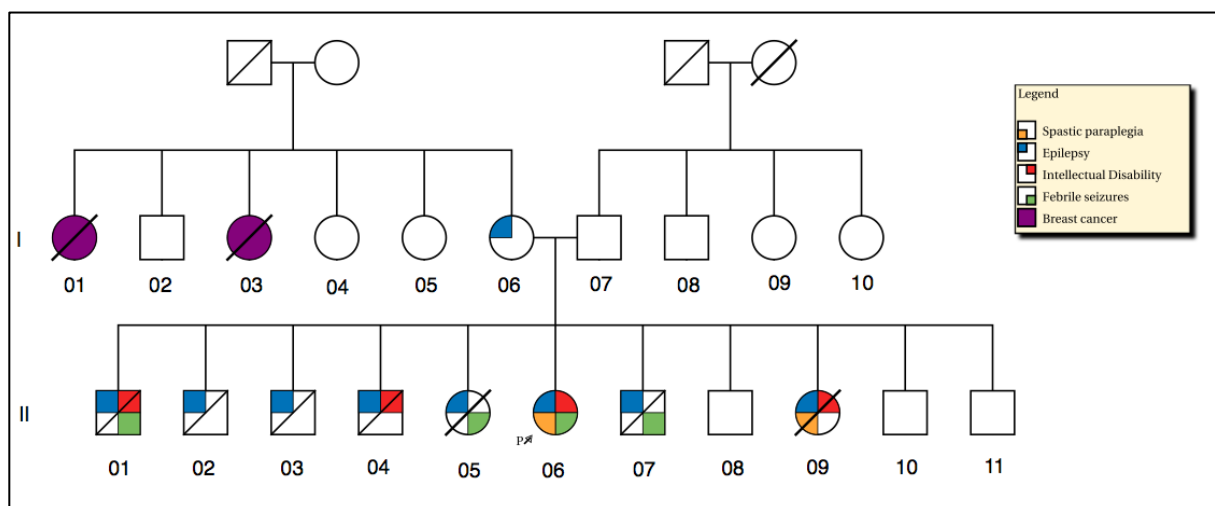


Figure 40: Pedigree de la famille EPI-ORA-FEL

I-06, la mère de la probante, est née le 03 décembre 1952 à Benfriha, un petit village à 30km d'Oran. Issue d'un mariage non consanguin, de parents et fratrie non épileptiques, ses deux sœurs (I-01 et I-03, **Figure 40**) sont décédées à l'âge de 41 et 53 ans respectivement, suite à des néoplasies mammaires. En raison du recueil rétrospectif des données, de l'indisponibilité des parents de cette patiente et de son niveau

⁴⁵ <https://decipher.sanger.ac.uk/> mise à jour le 21/02/2016

intellectuel bas, il nous a été difficile de retracer son historique et de préciser certains caractères relatifs à son enfance tels que le développement psychomoteur et les antécédents de convulsions fébriles ou de crises néonatales. Néanmoins, cette patiente rapporte un début des troubles vers l'âge de 14 ans, par des crises d'épilepsie vraisemblablement tonico-cloniques généralisées (TCG) survenant de façon circannuelle, pour lesquelles elle ne consultait que des guérisseurs et des marabouts.

Ce n'est qu'à l'âge de 30 ans qu'elle a consulté un neurologue qui a initié un traitement antiépileptique non précisé par la patiente.

Lorsqu'elle s'est présentée pour la première fois au service de Neurologie du CHU d'Oran le 29/03/2010, elle était déjà sous acide valproïque® à raison de 500 mg/j et n'avait pas convulsé depuis deux ans. L'examen neurologique était sans particularités. Elle avait un enregistrement EEG datant de 2006 qui mettait en évidence des bouffées de pointes ondes généralisées déclenchées par l'HPN, sur un rythme de fond de type alpha (**Figure 41**). L'imagerie cérébrale ne montrait aucune anomalie.

Actuellement en rémission, la patiente a été sevrée en janvier 2014, et est libre de crises depuis 2009. Son dernier EEG de contrôle datant du 13/12/2015, ne retrouvait aucune anomalie électrique.

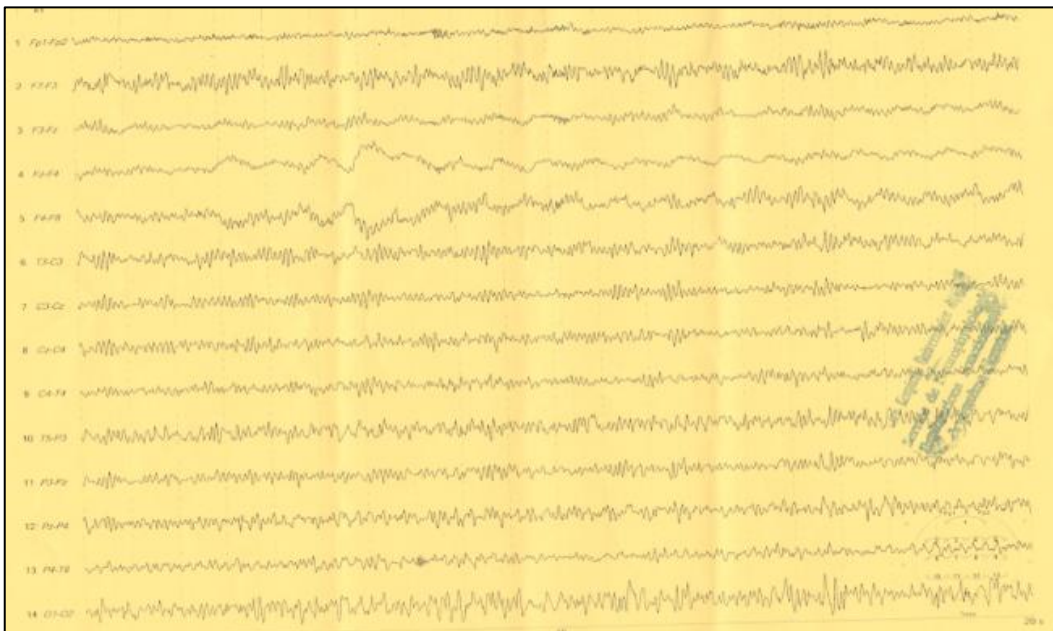


Figure 41: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-FEL-I-06

II-06 est la probante de l'étude. Elle est née le 27 Novembre 1977 à domicile. Ses parents rapportent un retard du développement psychomoteur (marche à 05 ans et langage à 06 ans). On note également dans ses antécédents une notion de reflux alimentaires postprandiaux quotidiens depuis l'enfance. Sa maladie épileptique s'est manifestée à l'âge de deux mois par l'alternance de convulsions fébriles et de crises apyrétiques d'allure TCG, très fréquentes, pouvant atteindre deux à trois par jour. Elle n'a consulté qu'à l'âge de 15 ans, et a été mise sous Phénobarbital® 100mg/j. L'évolution fut marquée par la diminution de la fréquence des crises (2 à 3 par mois) malgré la mauvaise observance du traitement. A l'âge de 32 ans, elle a développé de façon insidieuse une faiblesse musculaire des membres inférieurs qui s'est accentuée progressivement jusqu'à la perte de la marche quelques mois plus tard.

Nous l'avons reçue par le biais de l'urgence le 07/03/2009 pour un état de mal épileptique. En raison du niveau socio-économique très bas de cette famille, la patiente avait arrêté son traitement Phénobarbital® durant plusieurs jours. L'examen neurologique réalisé à distance de l'épisode d'état de mal mettait en évidence une déficience intellectuelle avec lenteur de l'idéation, labilité attentionnelle, écholalie et atteinte profonde des capacités de jugement et de raisonnement. Nous avons constaté aussi une paraplégie spastique avec reflexes ostéotendineux vifs, diffusés et polycinétiques aux quatre membres et un signe de Babinski à gauche avec clonus achilléen. Par ailleurs, une importante amyotrophie distale prédominant aux muscles des pieds, des jambes et des interosseux des mains a été notée. L'examen de la sensibilité et de la coordination était difficile en raison de la sévérité du retard mental. Par ailleurs, nous n'avons pas relevé de troubles sphinctériens. L'examen cutané a mis en évidence un vitiligo au niveau des pieds et des mains, et une accentuation de la pilosité au niveau des avant-bras et des jambes. L'examen ophtalmologique était sans particularités. L'examen orthopédique retrouvait des pieds creux, des doigts d'écrivain, ainsi qu'une scoliose dorsale.

L'EEG réalisé quelques jours après son admission montrait des décharges de pointes ondes multifocales sur un rythme de fond ralenti. L'ENMG des quatre membres était normal, de même que l'étude du liquide cébrospinal. Une IRM cérébro-médullaire avec injection de gadolinium a mis en évidence une atrophie cortico-sous corticale hémisphérique gauche et une atrophie cérébelleuse à prédominance vermiennne. Par ailleurs, une atrophie médullaire cervicale a également été constatée (**Figure 42**). Nous

avons complété le bilan par une échographie abdominale qui était normale et une fibroscopie digestive qui a retrouvé une hernie hiatale.

La patiente est actuellement sous bithérapie (Phénobarbital® 100mg/j et Valproate® 1000mg/j) et présente deux à trois crises tonico-cloniques généralisées par mois, probablement en rapport avec la mauvaise observance du traitement. Par ailleurs, nous l'avons mise sous inhibiteurs de la pompe à protons pour le reflux gastro-oesophagien et nous avons préconisé des séances de kinésithérapie pour prévenir les attitudes vicieuses.

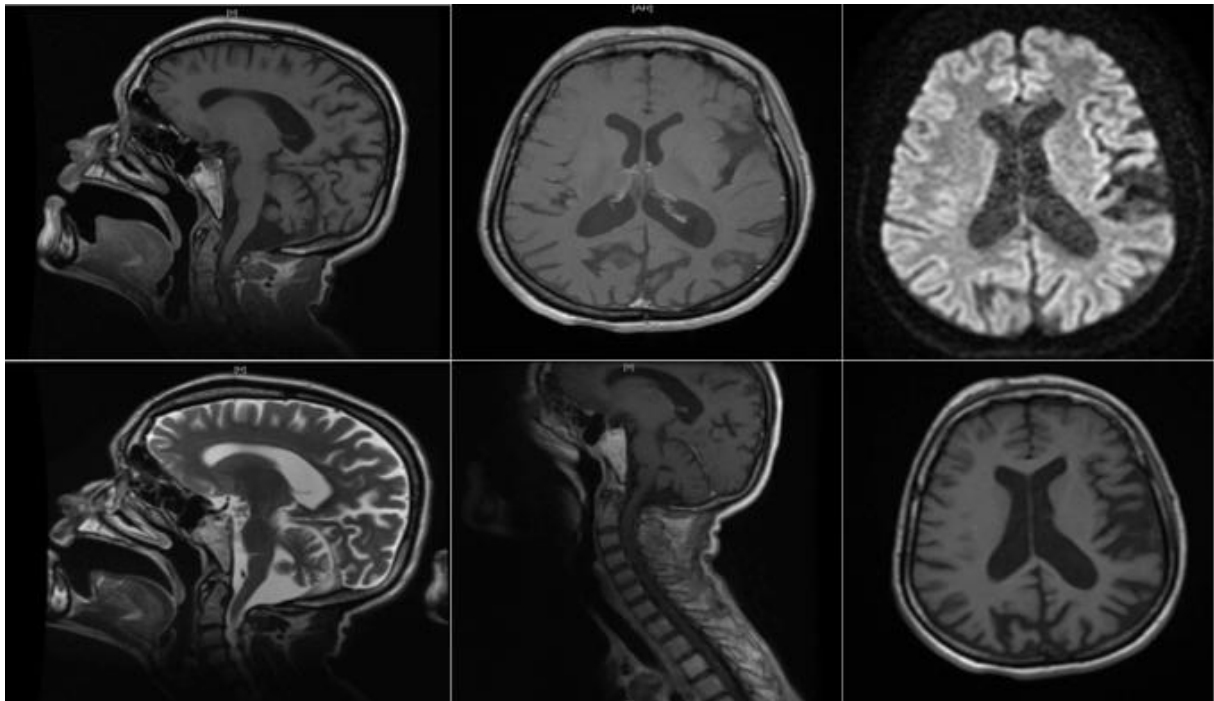


Figure 42: IRM cérébro-médullaire de la probante II-06

II-01 est né le 12/05/1970 à domicile. Selon ses parents, il présentait des convulsions fébriles à partir de l'âge de 06 mois et des crises apyrétiques d'allure TCG à partir de l'âge de 03 ans. Il n'a jamais consulté et n'a jamais bénéficié de traitement pour ses crises. Il souffrait également d'une déficience intellectuelle, raison pour laquelle il n'a jamais été scolarisé. Il est décédé le 23/01/1986 au cours de son sommeil de façon soudaine et inexplicée. Toutefois, nous ne savons pas si le décès est survenu suite à une crise épileptique.

II-02 est né le 16/12/1971 à Oran. L'accouchement s'est déroulé à domicile, sans complications selon sa mère. A l'âge de 01 mois, il a commencé à présenter de façon

quotidienne des convulsions sans fièvre. N'ayant jamais bénéficié de soins, il est décédé subitement le 12/02/1972, sans raison apparente.

II-03 est né le 28/01/1973. Lui aussi est né à domicile et a commencé à présenter des convulsions apyrétiques à l'âge de 03 mois. Selon les parents, les crises étaient quasi-quotidiennes. Malgré cela, il n'a jamais bénéficié de soins médicaux. Il est décédé à l'âge de 04 mois (le 03/05/1973), sans raison apparente ni lien avec les crises.

II-04 est né le 22/07/1974 à domicile. Selon son dossier médical que nous avons récupéré aux archives de l'Etablissement Public Hospitalier Nekkache Mohamed Seghir (ex Mohgoun), il a consulté une seule fois à l'âge de 10 ans pour des crises épileptiques survenant de façon hebdomadaire depuis l'âge de 06 mois, sur un terrain de déficience intellectuelle. Un traitement à base de phénobarbital® 50 mg/j lui a été prescrit mais pour des raisons financières, le patient n'a jamais pris ce traitement. Il a continué à présenter des crises jusqu'à l'âge de 23 ans. Il est décédé durant son sommeil le 13/05/1997, sans aucun stigmat de crise selon ses parents.

II-05 est née le 10/08/1975 au domicile parental. Les convulsions fébriles ont commencé à l'âge de 03 mois et les crises apyrétiques à l'âge de 01 an. Elle aussi n'a jamais été traitée et est décédée à l'âge de 09 mois suite à une crise convulsive apyrétique.

II-07 est né le 23/02/1980 à domicile. La maladie s'est manifestée chez lui à l'âge de 04 mois, marquée par l'alternance de convulsions fébriles et de crises apyrétiques. Ne bénéficiant d'aucun traitement, il est décédé durant son sommeil à l'âge de 15 mois suite à une crise sans fièvre.

II-09 est née le 17/02/1985 à domicile. Selon ses parents, elle présentait une surdi-mutité, une déficience intellectuelle, un retard à la marche qui a été perdue progressivement à l'âge de 7 ans avec conservation d'une attitude en flexion des membres inférieurs. Elle présentait également des troubles sphinctériens à type d'incontinence urinaire. Les premières convulsions se sont manifestées à l'âge de 10 mois, non accompagnées de fièvre. Jamais traitée, cette patiente présentait des crises bi

ou trimensuelles d'allure TCG. Elle est décédée à l'âge de 11 ans le 08/02/1996 suite à une crise convulsive.

Les individus I-07, II-08, II-10 et II-11 ont tous été évalués au service de Neurologie du CHU d'Oran. Ils ont bénéficié d'examens morphologique, neurologique, psychiatrique, et d'enregistrements électroencéphalographiques. Ils sont indemnes de toute affection neuropsychiatrique.

3.1.2. Famille EPI-ORA-KHE

Tous les ascendants de cette famille, jusqu'à la 5ème génération sont originaires de Douar Guires, près de Rahouia, une des 42 communes de la wilaya de Tiaret. Ce petit village est situé à 35km au nord-ouest de Tiaret et s'étend sur une superficie de 27.554 ha. D'après le dernier recensement de la population en 2008, la commune compte 24.983 habitants⁴⁶. Cette famille compte deux individus épileptiques issus d'un mariage consanguin au premier degré (**Figure 43**).

⁴⁶ <http://www.ons.dz/mise> à jour le 19/01/2016

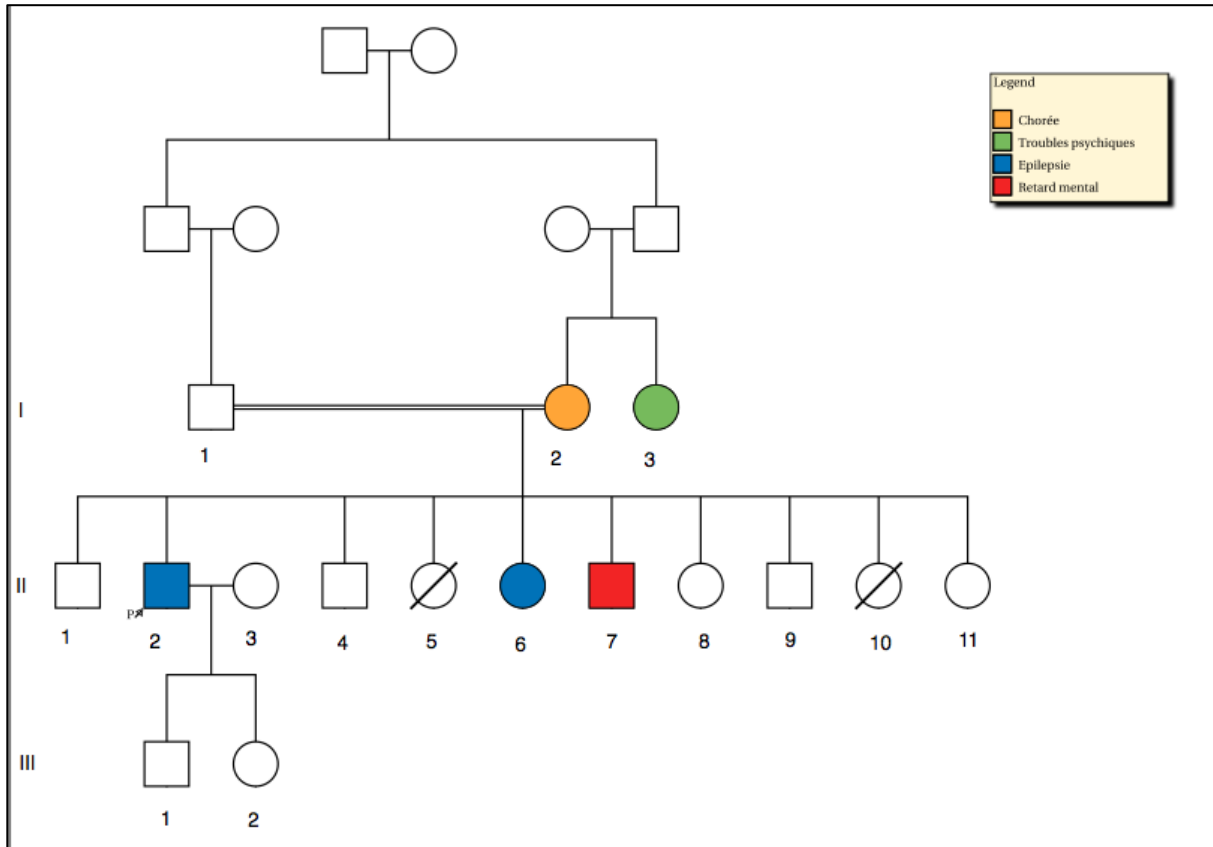


Figure 43: Pedigree de la famille EPI-ORA-KHE

II-02 est le probant de l'étude. Il est né le 10/02/1971 à Rahouia, à domicile. Issu d'un mariage consanguin au premier degré, il a un niveau de six années d'études et occupe un poste de vendeur dans un centre commercial. Il est marié et père de deux enfants en bon état de santé. Dans ses antécédents, on relève des épisodes fréquents de coliques néphrétiques.

Le début de sa maladie épileptique semble remonter à l'âge de 16 ans par l'apparition de myoclonies des quatre membres à prédominance proximale, sans trouble de la conscience, précédant parfois une crise généralisée tonico-clonique. Ces myoclonies étaient plus fréquentes le matin peu après le réveil, et occasionnaient des chutes avec lâchages d'objets. Des absences rares et brèves ont été rapportées par l'entourage. Les crises myocloniques étaient déclenchées par le manque de sommeil, la consommation d'alcool, le calcul, le jeu, mais aussi la lecture et la stimulation lumineuse naturelle.

Ce patient est suivi au service de Neurologie du CHU d'Oran depuis le 13/03/2000. Ses examens morphologique, neurologique et psychiatrique n'ont révélé aucune anomalie. L'EEG retrouvait de brèves décharges de pointes ondes et de polypointes ondes

généralisées activées par l'hyperpnée et la SLI, sur un rythme de fond alpha (**Figure 44**). L'IRM cérébrale avec injection de gadolinium était normale. Le patient a été traité par Valproate de sodium® à raison de 500 mg/j avec évolution favorable. Sa dernière crise remonte à janvier 2012.

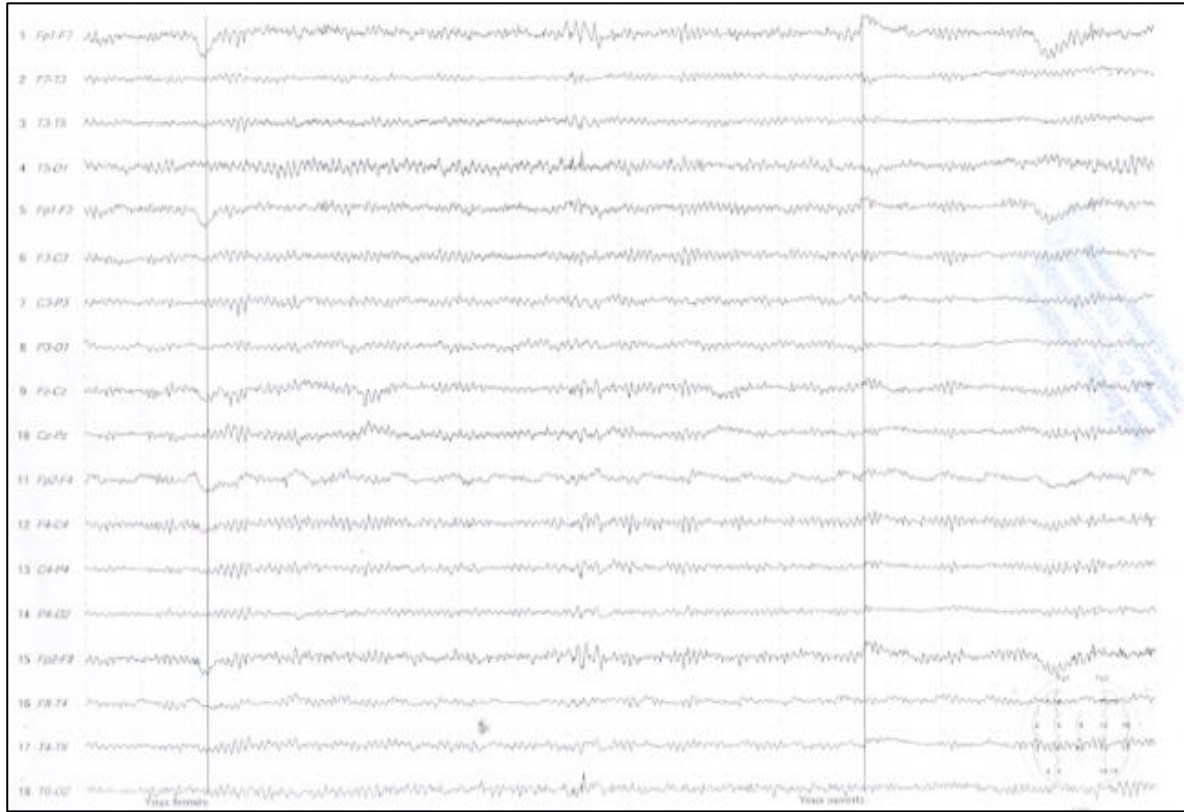


Figure 44: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-KHE-II-02

II-06 est née le 10/06/1979 à domicile. Ses parents rapportent une enfance sans évènements pathologiques et un niveau de 9 années d'études.

Le début remonte à l'âge de 17 ans par des crises TCG avec morsure de langue et émission d'urines survenant surtout la nuit avec une fréquence de 2 à 3 crises/mois. Elle signalait également des absences et des myoclonies des membres supérieurs survenant sans horaires fixes. Elle ne s'est présentée à notre service que trois années plus tard (le 30/10/1999), car elle ne consultait que des guérisseurs.

L'examen neurologique et l'évaluation psychiatrique ainsi que l'examen morphologique ne relevaient aucune anomalie. L'examen cardio-vasculaire complété par un ECG et une échographie cardiaque était normal.

Le tracé EEG était de rythme alpha (8 c/sec) parfois encoché de pointes et polypointes de topographie postérieure, entrecoupé de brèves bouffées de P, PO et PPO amples et

parfois incisives diffuses. Ces éléments étaient accentués par l'hyperpnée et la SLI (**Figure 45**). La patiente a été traitée par Valproate® 500mg/j avec diminution considérable de la fréquence des crises, la dernière remontant à 2006. L'IRM cérébrale réalisée en décembre 2012 était sans particularités.

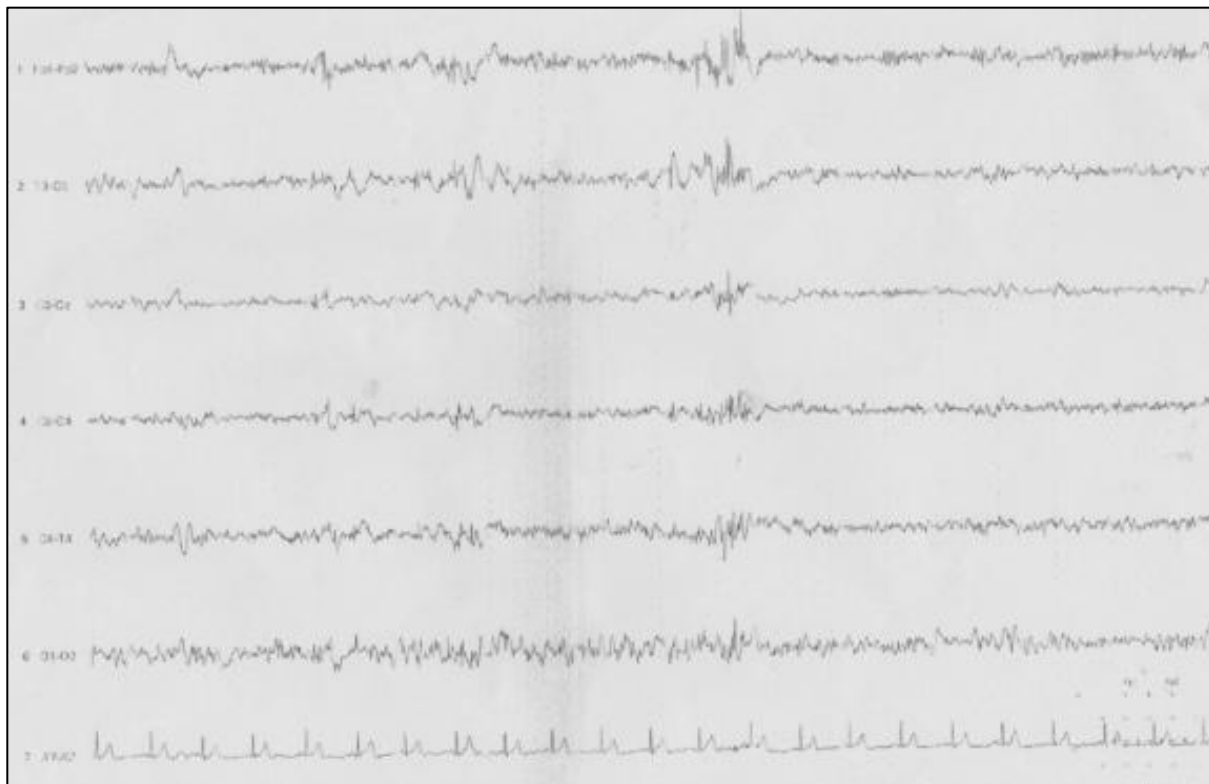


Figure 45: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-KHE-II-06

II-07 est né le 09/03/1982 à l'hôpital. Il a prononcé ses premières syllabes à l'âge de 06 ans et a marché à l'âge de 07 ans. Il n'est pas épileptique mais souffre de retard mental avec langage puéril et voix nasonnée, ainsi qu'un retard statural. Il est suivi au service d'endocrinologie pour hypothyroïdie découverte à la naissance, actuellement sous 175µg/j de lévothyroxine sodique®.

Lorsque nous l'avons vu en consultation le 19/11/2014, l'examen neurologique retrouvait une hypotonie des quatre membres portant sur la passivité et l'extensibilité sans déficit sensitivomoteur ni abolition des reflexes ostéotendineux. L'examen morphologique mettait en évidence une petite taille, un visage long et étroit, un

rétrognathisme, des oreilles décollées et des doigts boudinés. Par ailleurs, l'examen n'a retrouvé ni fente labiale ou palatine, ni anomalies anales (atrésie ou malposition).

L'examen cardiovasculaire était sans particularités, de même que l'ECG et l'échographie cardiaque. Nous avons complété le bilan par une échographie abdomino-pelvienne, un EEG et une IRM cérébrale qui étaient sans particularités.

I-02 est la mère des trois individus décrits plus haut. Elle est née le 25/05/1953 à Rahouia. Elle présente depuis janvier 2010 des mouvements anormaux à type de dystonie généralisée prédominant au niveau des mains, des épaules et de la face, sans notion de prise de neuroleptiques. L'examen neurologique ne retrouve aucun signe associé et l'EEG est sans particularités (**Figure 46**).

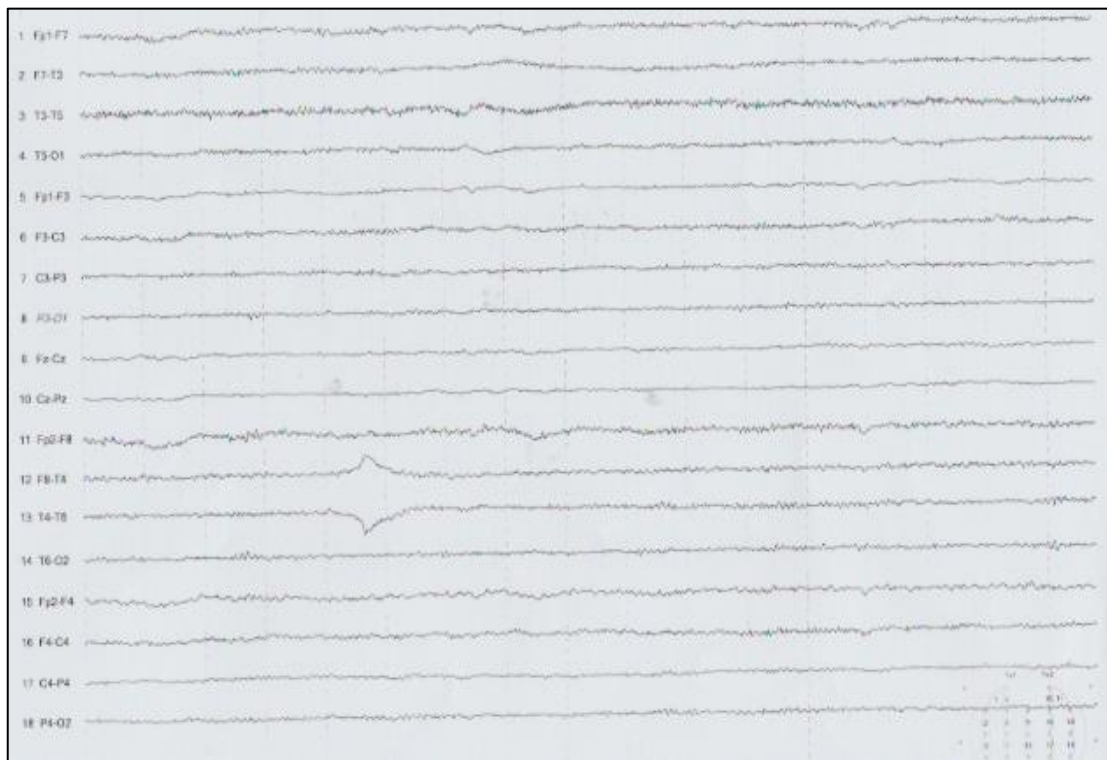


Figure 46: Tracé EEG de l'individu EPI-ORA-KHE-I-02

Un scanner cérébral avec injection de produit de contraste réalisé le 19/12/2012 a mis en évidence une atrophie corticale diffuse modérée, confirmée par l'IRM cérébrale. Un traitement par L-dopa a été initié avec une discrète amélioration des symptômes. L'évaluation psychiatrique a relevé un syndrome anxio-dépressif pour lequel elle a été mise sous Paroxétine® 20mg/j et Prazépan® 10mg/j avec stabilisation des troubles.

3.2. Résultats des analyses génétiques de recherche de CNV par CGH-array

3.2.1. Famille EPI-ORA-FEL

Chez la mère de la probante au phénotype épileptique (I-06), une duplication mesurant 141.610 pb a été identifiée sur le bras long du chromosome 7 (7q21.12), dans sa bande cytogénétique 87250226-87391835 (**Figure 47**).

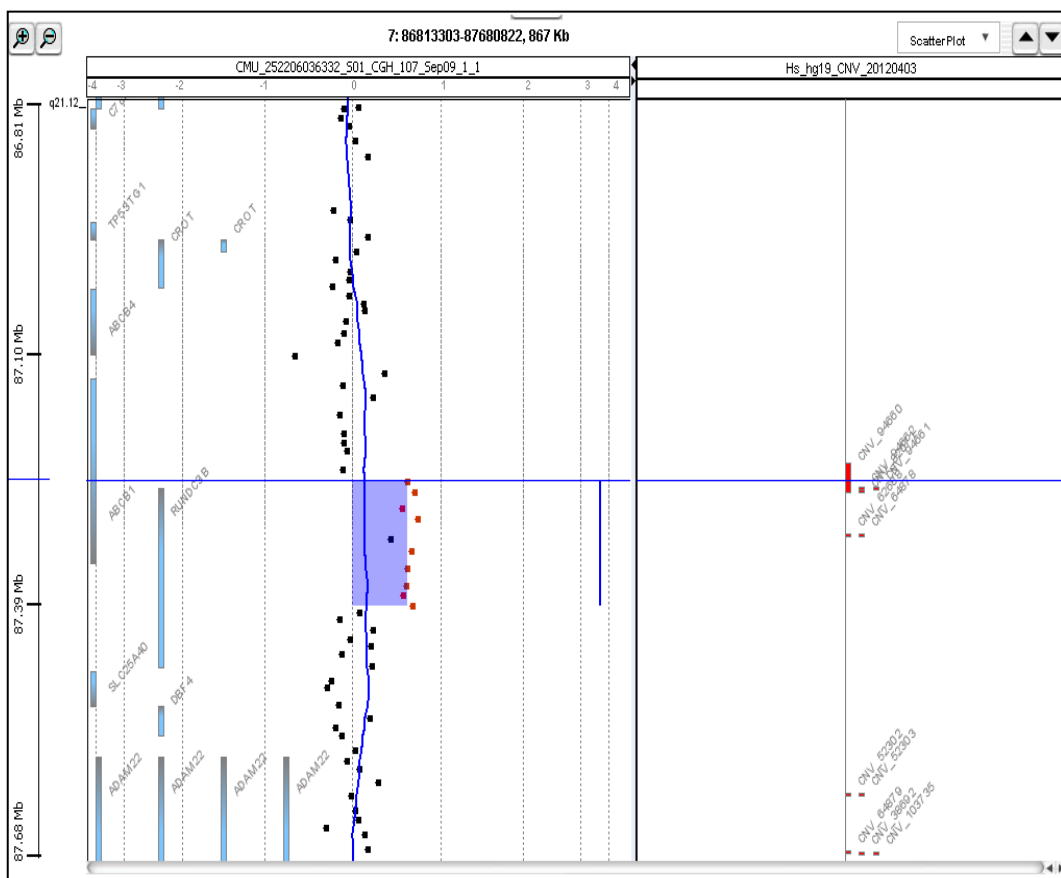


Figure 47: Représentation graphique du segment dupliqué 7q21.12

Selon la base de données de l'Université de Californie à Santa Cruz⁴⁷, ce CNV contient deux gènes (**Figure 48**) :

⁴⁷ UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly

- Le gène Adenosine Triphosphate–Binding Cassette B1 (*ABCB1*), également connu sous l'acronyme *MDR1* (Multi-Drug Resistance gene).
- Le gène RUN domain containing protein 3B (*RUNDC3B*), également appelé Rap2-Interacting Protein 9 (*RPIP9*).

Par ailleurs, aucun CNV n'a été identifié chez la probante au phénotype d'épilepsie, convulsions fébriles, paraplégie spastique et déficience intellectuelle, ni chez les individus sains testés (I-07, II-08, II-10 et II-11).

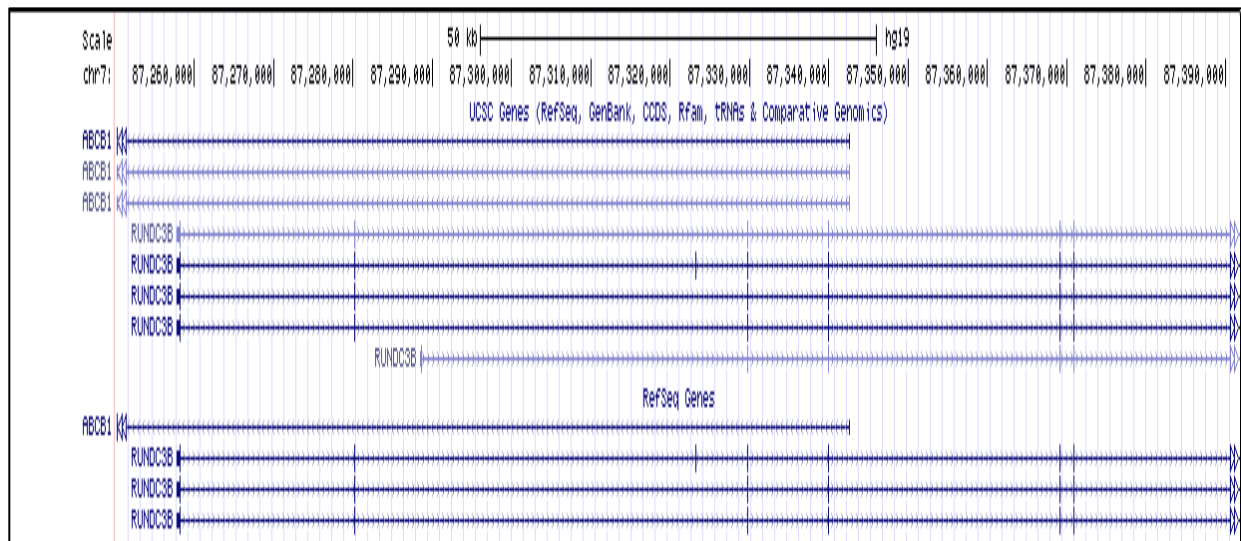


Figure 48: Région dupliée en 7q21.12 sur UCSC⁴⁸

3.2.2. Famille EPI-ORA-KHE

- Individu I-02:

Une délétion interstitielle de 2kb a été identifiée sur le bras long du chromosome 20q13.13, dans sa bande cytogénétique: 48.808.156-48.810.179 (**Figure 49**). Cette région contient le gène C/enhancer binding protein beta : *CEBPB* (OMIM : *189965) (**Figure 50**).

⁴⁸ <https://genome.ucsc.edu.mise> à jour le 18/01/2016

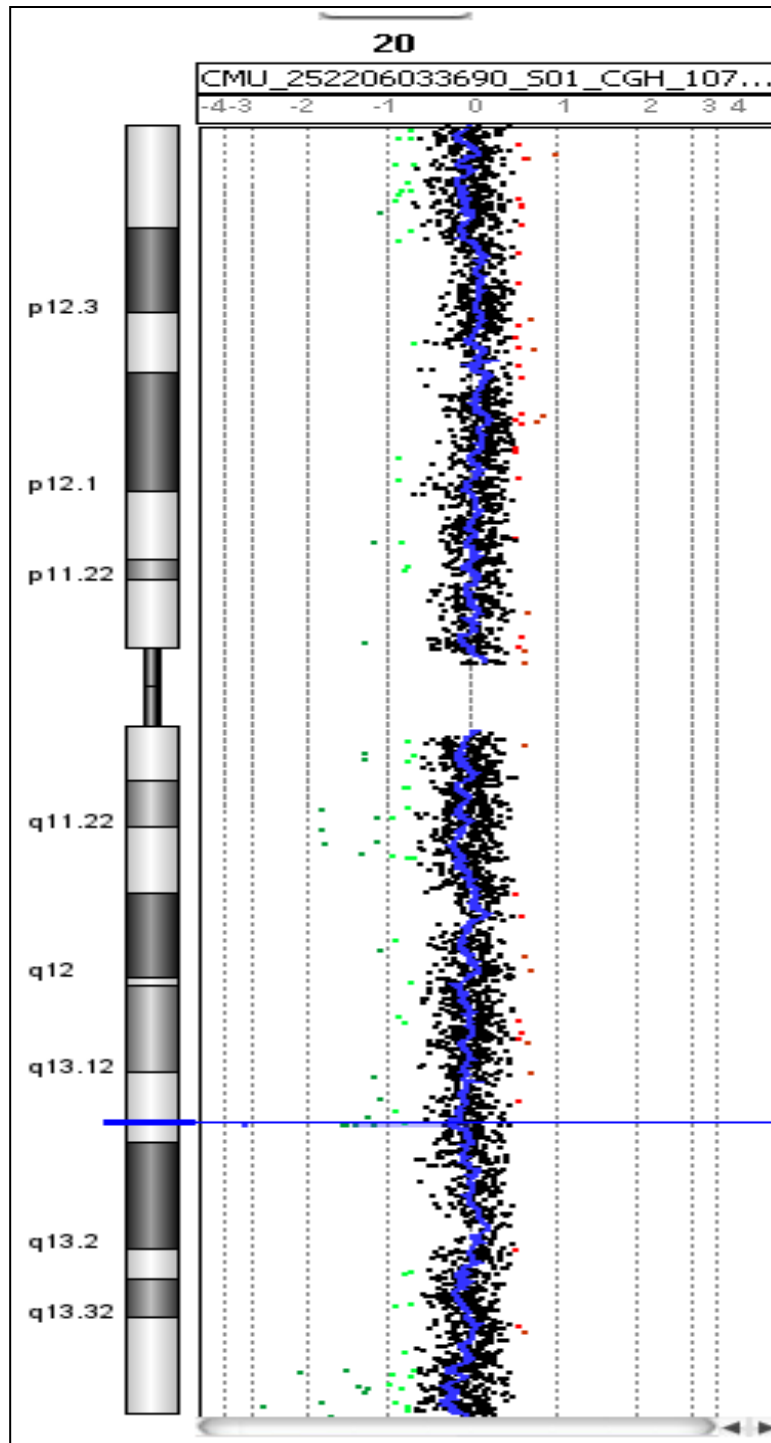


Figure 49: Résultats de l'analyse par CGH-array chez l'individu EPI-ORA-KHE-I-02

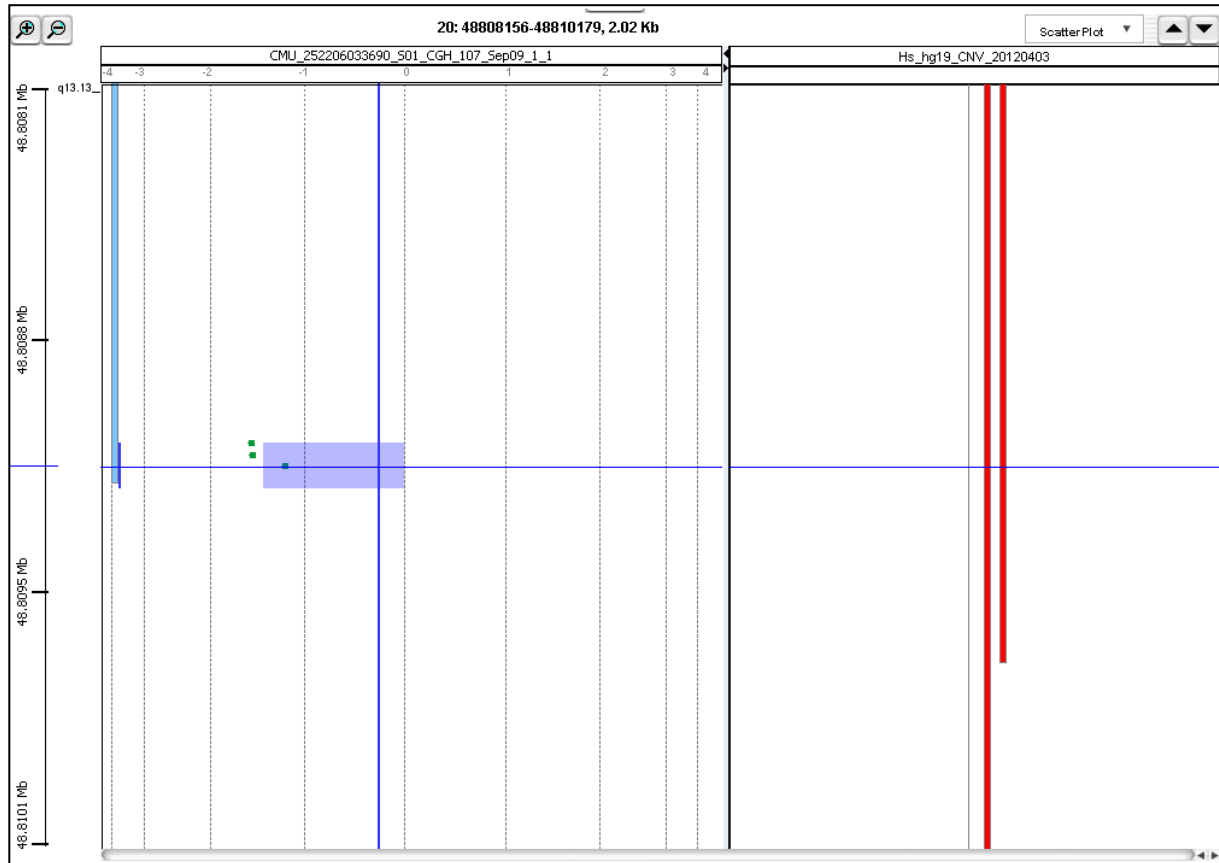


Figure 50: Représentation graphique du gène localisé dans le segment délété 20q13.13

- Individu II-02 :

Une duplication mesurant 223.654pb, identifiée sur le bras court du chromosome Xp11.22 au niveau de sa bande cytogénétique 53.430.723-53.654.376, est présente chez le probant (**Figure 51**). Ce CNV contient des gènes de la famille micro ARN (**Figure 52**):

- Structural maintenance of chromosomes 1A (*SMC1A*)
- RIB43A domain with coiled-coils 1 (*RIBC1*)
- Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10 (*HSD17B10*).
- HECT, UBA and WWE domain containing 1 (*HUWE1*)
- MicroRNA 98 (*MIR98*)
- MicroRNA LET-7F-2 (*MIRLET7F2*)

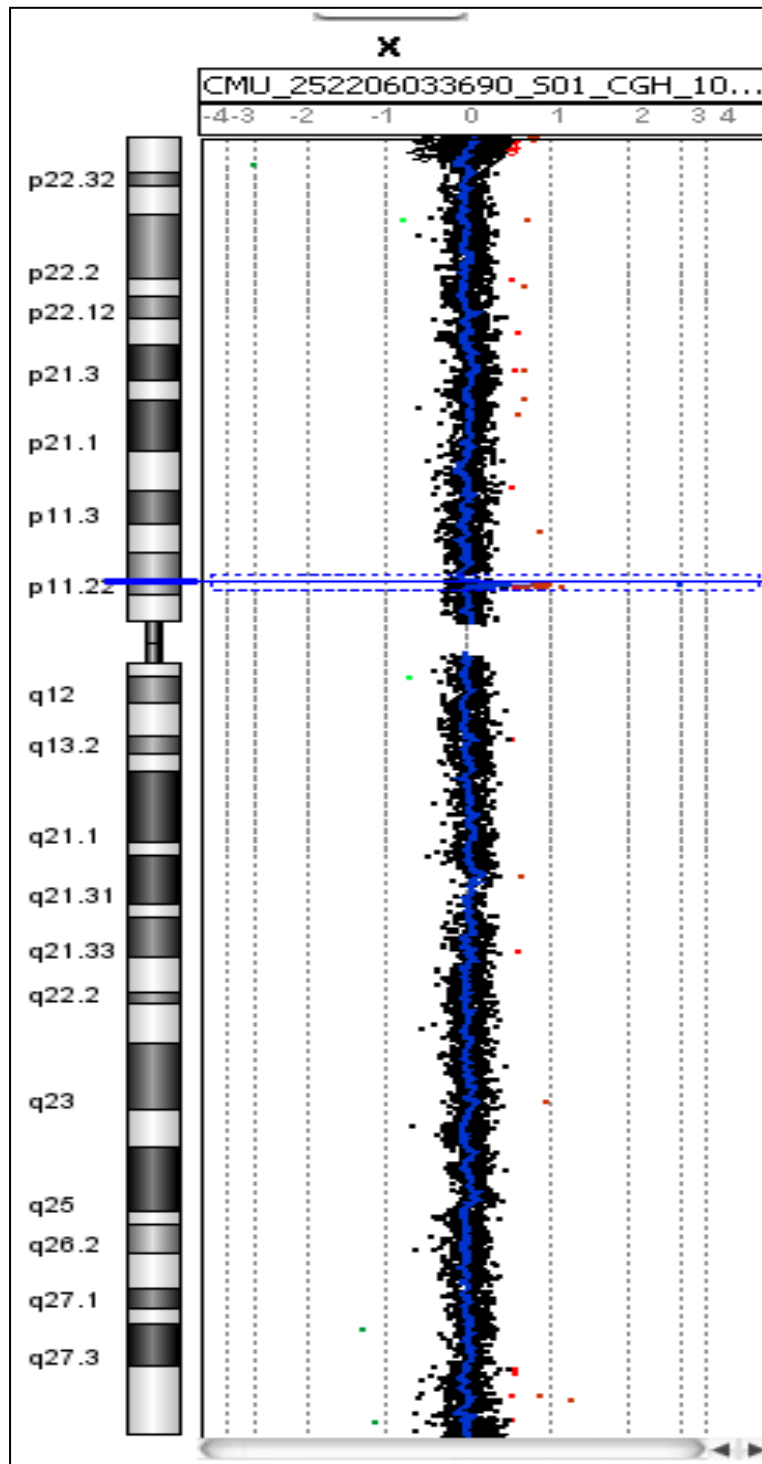


Figure 51: Résultats de l'analyse par CGH-array chez l'individu EPI-ORA-KHE-II-02

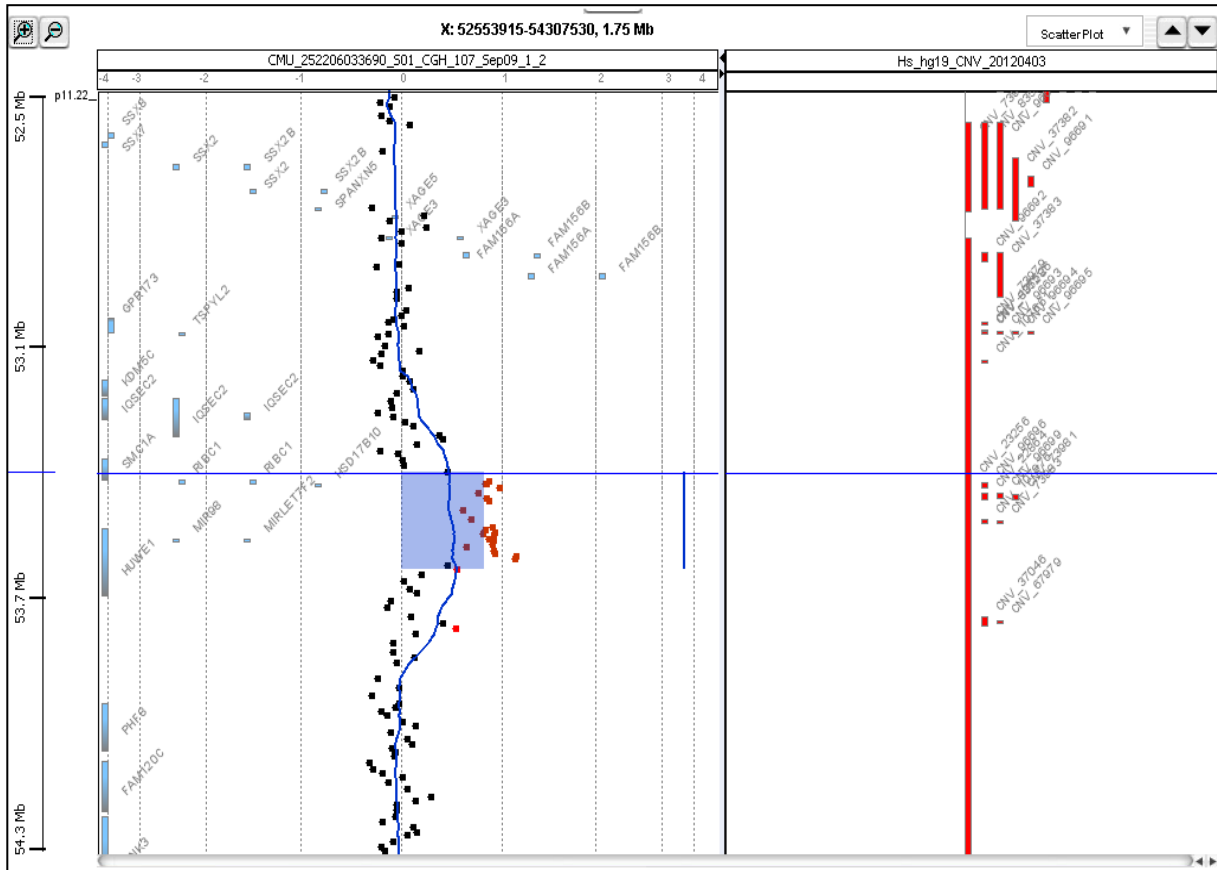


Figure 52: Représentation graphique des gènes localisés dans le segment dupliqué Xp11.22

Individu II-06 :

- Une délétion a été identifiée sur le bras court du chromosome 8p23.1 dans sa bande cytogénétique 4.939.824-9.353.839. Ce CNV mesure 4.414.016 pb et contient plusieurs gènes (**Figure 53**) :

- Microcephalin 1 (*MCPH1*)
- 1-Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 5 (*AGPAT5*)
- Defensin, alpha 4 (*DEFA4*)
- Angiotensinogen 2 (*ANGPT2*)
- Protein phosphatase 1, regulatory subunit 3B (*PPP1R3B*)

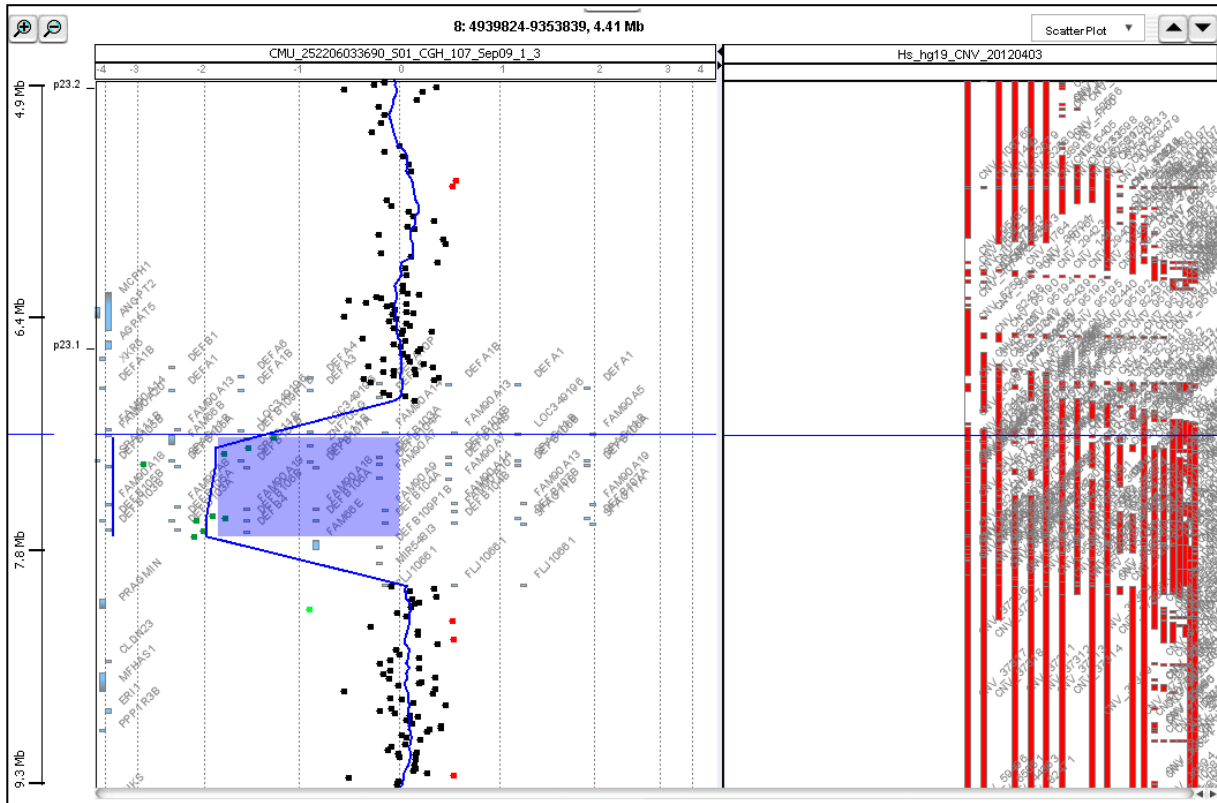


Figure 53: Représentation graphique des gènes localisés dans le segment délété 8p23.1

- Une autre délétion mesurant 1.1Kb a été identifiée chez cette patiente sur le bras long du chromosome 14q13.2 dans sa bande cytogénétique : 35.870.998-35.872.162. Ce CNV abrite le gène Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (*NFKBIA*).

Individu II-07 :

- Une délétion mesurant 3.1 Mb a été identifiée sur le bras long du chromosome 13q12.13 dans sa bande cytogénétique 25.743.062-25.746.170. Ce CNV contient un seul gène : APC membrane Recruitment protein 2 (*AMER2*) (**Figure 54**).

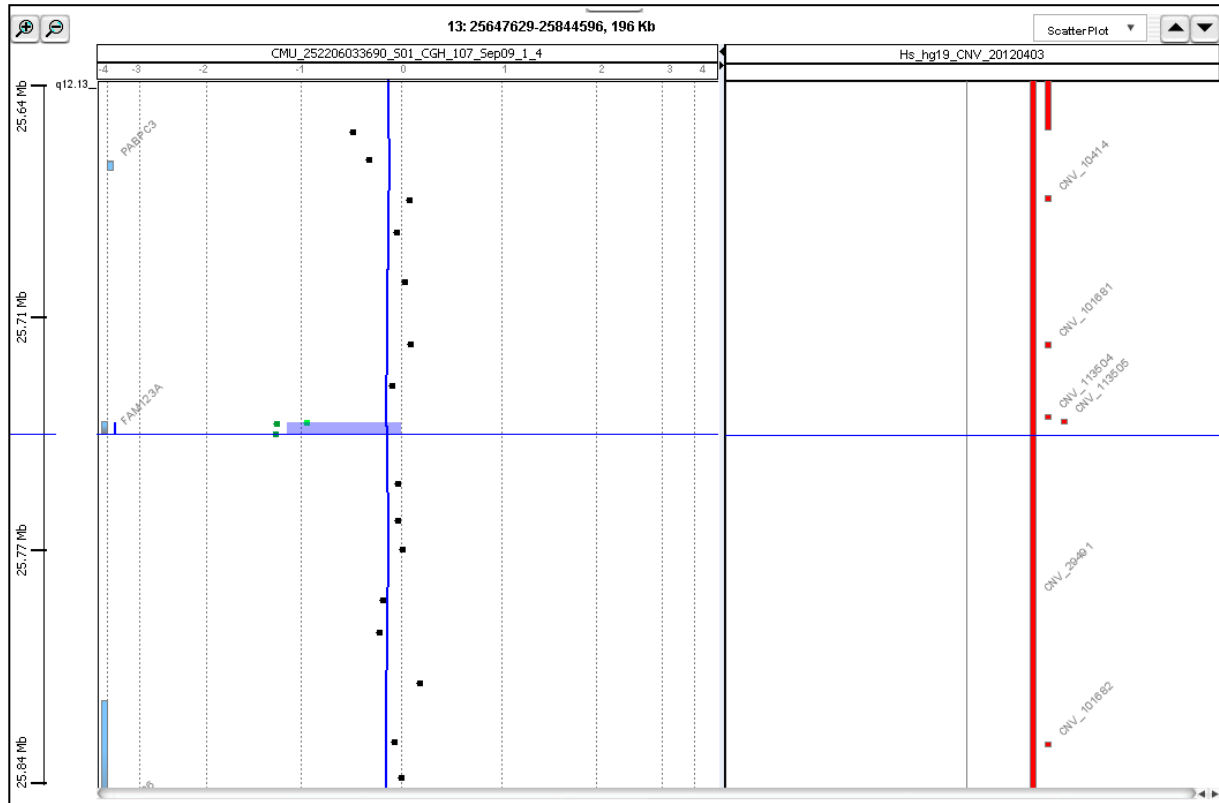


Figure 54: Représentation graphique du gène localisé dans le segment délété 13q12.13

- Une duplication en mosaïque mesurant 2.5Mb a été identifiée sur le bras long du chromosome 22q11.21 dans sa bande cytogénétique 18.937.937-21.407.690. Ce CNV contient plus de 30 gènes (**Figure 55**) dont la plus part sont impliqués dans le syndrome de DiGeorge tels que:

- DiGeorge syndrome critical region gene 5 (*DGCR5*)
- DiGeorge syndrome critical region gene 2 (*DGCR2*)
- Clathrin-heavy chain-like 1 (*CLTCL1*)
- Catechol-O-methyltransferase (*COMT*)
- T-box 1 (*TBX1*)
- Claudin 5 (*CLDN5*)

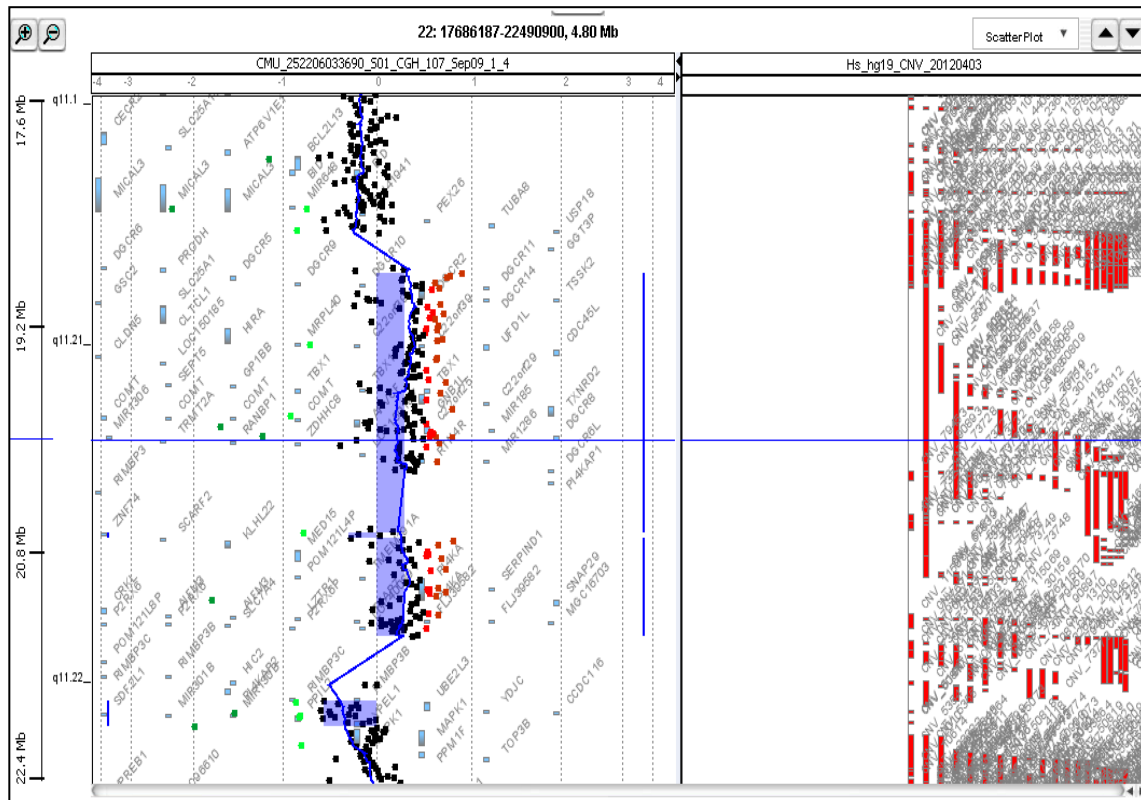


Figure 55: Représentation graphique des gènes localisés dans le segment dupliqué 22q11.21

4. Discussion

L'avènement de la technique de CGH-array a révolutionné la génétique humaine en mettant en évidence des remaniements chromosomiques chez des individus présentant des troubles neurodéveloppementaux [485]. Mais encore faut-il savoir interpréter l'avalanche de résultats générés par cette technique. En effet, les CNV rares, nouveaux ou non récurrents nécessitent une interprétation rigoureuse pour déterminer leur pathogénicité ou leur bénignité. Si ces CNVs non récurrents sont *de novo*, alors la chance qu'ils soient pathogènes est élevée, surtout si l'analyse *in silico* des gènes au sein de la microdélétion suggère leur implication dans le phénotype de la maladie. Par contre, si ces CNVs sont retrouvés dans la famille, c'est le phénotype du parent porteur qui oriente au mieux l'interprétation de la pathogénicité [500].

L'interprétation d'un CNV requiert une recherche bibliographique et dans les bases de données des patients, de rapports concernant des CNVs similaires ou chevauchant chez des individus atteints. Tout aussi importante est la consultation des bases de données

de témoins sains ainsi que les études publiées pour déterminer la fréquence de chevauchement des CNVs chez les individus sains [501, 502]. Enfin, le mode d'expression, la fonction, et l'association à d'autres maladies, le cas échéant, de chaque gène affecté par le CNV doivent être considérés [503].

Pour pallier à ces difficultés d'interprétation, des critères ont été établis afin de mieux appréhender la distinction entre CNV bénins et pathogènes [504] (**Tableau 22**). Nous avons tenu compte de ces recommandations pour interpréter les résultats générés par CGH array dans les deux familles décrites ci-dessus.

Tableau 22: Critères de distinction entre CNV bénins et pathogènes [504]

Critères majeurs	CNVs pathogènes	CNVs bénins
- CNV hérité d'un parent sain		✓
- CNV hérité d'un parent malade	✓	
- Présence d'un CNV similaire chez un apparenté sain		✓
- Présence d'un CNV similaire chez un apparenté malade	✓	
- CNV répertorié dans les bases de données d'individus sains (ex : dgv.db)		✓
- CNV répertorié dans les bases de données d'individus malades (ex : DECIPHER)	✓	
- CNV contenant des gènes morbides rapportés par OMIM	✓	
- CNV riche en gènes	✓	
- CNV pauvre en gènes		✓
Critères mineurs		
- CNV est une délétion	✓	
- CNV est une duplication		✓
- Taille du CNV > 3Mb	✓	
- CNV dépourvu d'éléments régulateurs		✓

4.1. Discussion des résultats de la famille EPI-ORA-FEL

4.1.2. SUDEP : Y aurait-il une prédisposition génétique ?

L'élément qui a attiré notre attention dans cette famille, c'est le nombre d'enfants décédés sans cause évidente. En effet, sept individus de la famille nucléaire sont décédés de façon soudaine et inattendue suggérant un SUDEP (*Sudden Unexpected Death in Epilepsy*). On parle de SUDEP lorsque le décès survient chez un épileptique, sans pathologie causale, en dehors d'un état de mal épileptique, et sans qu'il soit la conséquence d'une cause accidentelle ou d'un suicide [505, 506]. La majorité des SUDEP apparaît suite à une crise d'épilepsie mais n'en est pas la conséquence directe [507-510].

Le risque de SUDEP dans la population pédiatrique est très faible, et les mécanismes qui le sous-tendent ne sont pas encore bien élucidés [511]. Chez l'adulte, le risque est estimé à 0,4% en cas d'épilepsie réfractaire. Ce risque est accru par un âge de début précoce, par la présence de crises TCG fréquentes, par l'absence de traitement anti-épileptique reflétant une mauvaise observance, ou au contraire, par la prise d'une polythérapie, témoin indirect de la sévérité de la maladie [38, 41-44, 512]. Tous les individus décédés de cette famille nucléaire étaient exposés à ces facteurs de risque. Cependant, la fréquence élevée de décès inattendus et de cause indéterminée dans cette famille nucléaire, laisse supposer une susceptibilité génétique au SUDEP. L'individualisation de facteurs génétiques impliqués dans le SUDEP est une notion récente [513, 514]. En effet, une étude d'association pangénomique récente a identifié cinq gènes candidats significativement associés au SUDEP : le gène *sodium channel, neuronal type 1, alpha subunit (SCN1A)* dont l'effet pléiotropique est sous l'influence de facteurs modificateurs [515], le gène *Leucin rich glioma inactivated type 1 (LGI1)*, le gène *structural maintenance of chromosomes 4 (SMC4)*, le gène *collagen, type 4, alpha-3 (COL6A3)*, et le gène *tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF factor homology domains 1 (TIE1)* [516]. Une autre étude a incriminé des mutations du gène *proline-rich transmembrane protein 2 (PRRT2)*, déjà mis en cause dans les convulsions familiales infantiles bénignes, dans la dyskinésie paroxystique kinésigénique et dans la migraine [517-519]. Par ailleurs, une étude récente suggère l'implication d'un dysfonctionnement de sous-unités de canaux potassiques dans la physiopathologie du SUDEP [520]. Malheureusement, aucun des sept individus décédés de cette famille n'a bénéficié d'autopsie ni d'analyses génétiques permettant de relier le décès à un de ces polymorphismes. Des prélèvements sanguins ou tissulaires devraient faire partie intégrante de l'examen post mortem de tout épileptique décédé sans cause évidente. Ceci permettrait d'approfondir nos connaissances sur les bases génétiques du SUDEP.

4.1.2. Epilepsie et paraplégie spastique héréditaire

Aucun CNV n'a été identifié chez la probante (II-06) qui présente en plus de l'épilepsie, une paraplégie spastique, une déficience intellectuelle, un syndrome dysmorphique, un reflux gastro-oesophagien et une atrophie cérébelleuse. Ce tableau clinique est compatible avec une paraplégie spastique héréditaire complexe. Etant donné que les parents I-06 et I-07 n'expriment pas ce phénotype, et que la transmission

est horizontale (paraplégie spastique probable chez la sœur décédée II-09, qui présentait en plus, un retard du développement psychomoteur, une surdité et des crises d'épilepsie), l'hypothèse d'une transmission autosomique récessive est envisageable. Toutefois, une transmission autosomique dominante avec pénétrance réduite ne peut être écartée, car le tableau de paraplégie spastique héréditaire (PSH) peut se manifester à un âge tardif.

Les PSH également appelées « maladies de Strümpell-Lorrain » sont des affections neurodégénératives génétiquement déterminées, caractérisées par une spasticité progressive et une faiblesse musculaire des membres inférieurs [521]. A ce jour, plus de 76 loci différents et 59 gènes ont été identifiés, dont les mutations se transmettent selon tous les modes de transmissions connus [522]. Cette hétérogénéité génétique pourrait expliquer la grande variabilité inter- et intrafamiliale concernant l'âge de début de la symptomatologie clinique, la rapidité de progression et le degré de sévérité du handicap [523]. Deux formes ont été individualisées :

- Les PSH pures limitées à l'atteinte pyramidale des membres inférieurs et transmises habituellement sur un mode autosomique dominant ;

- Les PSH complexes qui associent d'autres signes neurologiques, extra-neurologiques ou systémiques (ataxie cérébelleuse, retard mental, signes extrapyramidaux, épilepsie, neuropathie périphérique, surdité, ichtyose, atteinte cognitive, atrophie optique, rétinite pigmentaire, cataracte etc.) [521, 524-527]. Ces formes sont généralement transmises de façon autosomique récessive (TAR) surtout en présence d'une consanguinité parentale témoin d'un effet fondateur [528, 529], mais l'absence de cette dernière n'exclut pas l'hypothèse de TAR [530]. De plus, certaines anomalies sur l'IRM cérébrale, comme une atrophie du corps calleux, des hypersignaux de la substance blanche (SB), ou une atrophie cérébelleuse font aujourd'hui partie des signes faisant classer les PSH en formes compliquées [531-533].

En Algérie, plusieurs familles avec PSH ont été identifiées et caractérisées génétiquement. Ainsi, dans une cohorte de 70 familles, Kediha et *al.* ont mis en évidence une légère prédominance des PSH complexes de TAR avec prévalence des formes SPG11 et SPG15 [534]. Dans ces formes, l'âge de début était plus tardif mais l'âge de perte de la marche plus précoce que dans les PSH pures. Dans une autre étude portant sur 25 individus avec PSH appartenant à 14 familles originaires de l'Est Algérien, des mutations

des gènes *SPG11* et *ZFYVE26* (SPG15) ont été identifiées, témoignant de la fréquence de ces mutations dans la population Algérienne [535]. Les mutations de ces deux gènes ont également été rapportées dans la population Tunisienne où la prévalence de la PSH est estimée à 5.75/100.000 [536].

La coexistence d'une paraplégie spastique et d'une épilepsie chez plusieurs membres d'une même famille n'est pas fortuite, et reflète probablement l'effet pléiotropique d'un ou de plusieurs gènes mutés [537]. En effet, dans sa description princeps de la PSH en 1880, Strumpell avait rapporté une famille avec paraplégie spastique et épilepsie [538]. Plus d'un siècle plus tard, des études familiales sont venues conforter l'hypothèse d'une susceptibilité génétique commune à ces deux affections [539-541].

Notre cas index présentait en plus de la paraplégie spastique un reflux gastro-oesophagien et une amyotrophie distale. Un phénotype similaire a été décrit dans une famille Italienne étiquetée SPG9, avec en plus, une cataracte bilatérale. Dans cette famille, l'anomalie génétique a été liée à un locus situé sur le bras long du chromosome 10, dans la bande cytogénétique q23.3-q24.2, une région déjà incriminée dans plusieurs troubles neurologiques [542]. Par ailleurs, des vomissements secondaires à une hernie hiatale ont été décrits dans les formes SPG29 dont le gène a été localisé en 1p31.1-21.1 [543].

L'ENMG de la probante était normal et son IRM mettait en évidence une atrophie cérébrale, cérébelleuse et médullaire cervicale, sans atrophie du corps calleux ni hypersignaux de la substance blanche. Pensato et al ont rapporté un cas de SPG35 d'origine Marocaine avec retard mental et atrophie cérébrale et cérébelleuse sans anomalies à l'ENMG ; ce gène a été identifié et localisé en 16q23.1 [524].

Ainsi, nous pouvons constater un chevauchement des spectres phénotypiques des PSH pouvant expliquer la variabilité intra- et interfamiliale décrite précédemment dans des familles de PSH compliquées d'épilepsie et/ou de retard mental [541]. Une étude par séquençage exonique est en cours chez cette famille à la recherche de mutations des gènes responsables de PSH.

4.1.3. Duplication 7q21.12

Ce CNV a été identifié chez la mère de la probante au phénotype d'épilepsie généralisée idiopathique isolée. Cette région chromosomique contient deux gènes :

- Le gène *ABCB1* (*MDR1*) est situé sur le bras long du chromosome 7. Il a une taille de 200 kb et comporte 29 exons [544]. Il code pour la glycoprotéine P (P-gp) qui comporte 1280 acides aminés (environ 170 kDa) [545, 546], exprimée essentiellement par l'intestin, le foie, les cellules hématopoïétiques, le rein, la barrière hémato-encéphalique et les testicules [547-549]. Cette protéine agit en tant que pompe ATPase, capable d'expulser grâce à l'énergie fournie par l'ATP, des substrats spécifiques [550]. Ces substrats sont soit des molécules endogènes comme les hormones, ou des substances exogènes telles que les xénobiotiques [546, 551]. Ainsi, P-gp influence la biodisponibilité de nombreux médicaments, par le pompage de ceux-ci vers la lumière du système digestif [552-556].

Les polymorphismes du gène *MDR1* n'ont pas été associés à l'épilepsie mais à la résistance aux médicaments antiépileptiques [557-561]. Ainsi, Siddiqui et al ont retrouvé une association significative entre le génotype CC au polymorphisme C3435T du gène *ABCB1* et la résistance aux antiépileptiques dans une population Britannique [562]. Seo et al ont démontré que ce même polymorphisme était associé à une résistance à la Carbamazépine® dans une population Japonaise [563]. Récemment, une autre équipe a démontré l'association de ce SNP à la résistance au phénobarbital® dans une population Thaïlandaise [564]. Par ailleurs, ce polymorphisme ne semble pas conférer une résistance au Valproate® [565]. Ceci est compatible avec la pharmacosensibilité au Valproate® observée chez notre patiente, d'où l'intérêt de compléter l'investigation par un séquençage de haut débit à la recherche de ce polymorphisme.

- le deuxième gène *RUNDC3B* (RUN domain containing 3B) ou *RPIP9* est situé sur le chromosome 7 en chevauchement avec le gène *MDR1*, les deux promoteurs de ces gènes étant espacés de seulement 27.5 kb. Le gène *RPIP9* comporte 12 exons et son ARNm (numéro d'accèsion NM138290) code pour une protéine de 52.8 kDa comportant 473 acides aminés (numéro d'accèsion NP612147).

RPIP9 appartient à la famille des protéines Rap. Il est exprimé dans différents tissus tels que le cerveau, les testicules et les glandes surrénales [566], mais son implication dans l'épilepsie n'a jamais été décrite. La famille des protéines Rap joue un rôle primordial dans la régulation de certaines fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation et la motilité cellulaire [567]. Le dérèglement de ces fonctions cellulaires est communément associé au développement de tumeurs malignes [568]. Ainsi, Raguz et

al, ont démontré que *RPIP9* était activé chez 61.6% des patientes avec carcinome mammaire primitif [566]. Hors, les deux sœurs de cette patiente sont toutes les deux décédées de cancer du sein bien avant le début de notre étude. Il aurait été intéressant de les génotyper pour le gène *RPIP9* afin de rechercher d'éventuels polymorphismes pouvant avoir un lien avec leur maladie. Ceci dit, nous envisageons rechercher ce polymorphisme par séquençage, et de suivre cette patiente de façon longitudinale par des mammographies et des échographies mammaires régulières afin de dépister un cancer sein.

Nous avons introduit nos données dans la base de données *Decipher* qui rapporte les CNV pathogéniques dans la même région ainsi que les phénotypes associés. Un seul patient épileptique porteur d'un CNV dans la région 7q21.11 en position 77803224-93290138 a été décrit⁴⁹. Cet individu présente un phénotype plus sévère avec retard d'acquisition du langage, déficience intellectuelle, et petite taille. Cependant, la taille de son CNV est beaucoup plus importante que celle du remaniement identifié chez notre patiente, atteignant 15.486.915 pb, ce qui expliquerait l'hétérogénéité phénotypique. Etant donné que la probante de l'étude n'a pas hérité de ce CNV, l'hypothèse de son implication dans le phénotype épileptique est peu probable.

4.2. Discussion des résultats de la famille EPI-ORA-KHE

- Individu I-02:

Chez cette patiente, la délétion 20q13.13 comprend le gène *CEBPB* qui mesure 2.108 pb et contient un seul exon (**Figure 56**). Il s'agit d'un important facteur de transcription régulateur de l'expression des gènes impliqués dans les réponses immunes et inflammatoires [569-571]. Il joue également un rôle primordial dans l'adipogénèse, dans la voie de néoglucogénèse, dans la régénération des hépatocytes et dans l'hématopoïèse [572]. Il est également essentiel pour la reproduction chez la femme en raison de son rôle critique dans la maturation du follicule ovarien [573].

⁴⁹ patient n°806, <https://decipher.sanger.ac.uk/mise> à jour le 29/01/2016

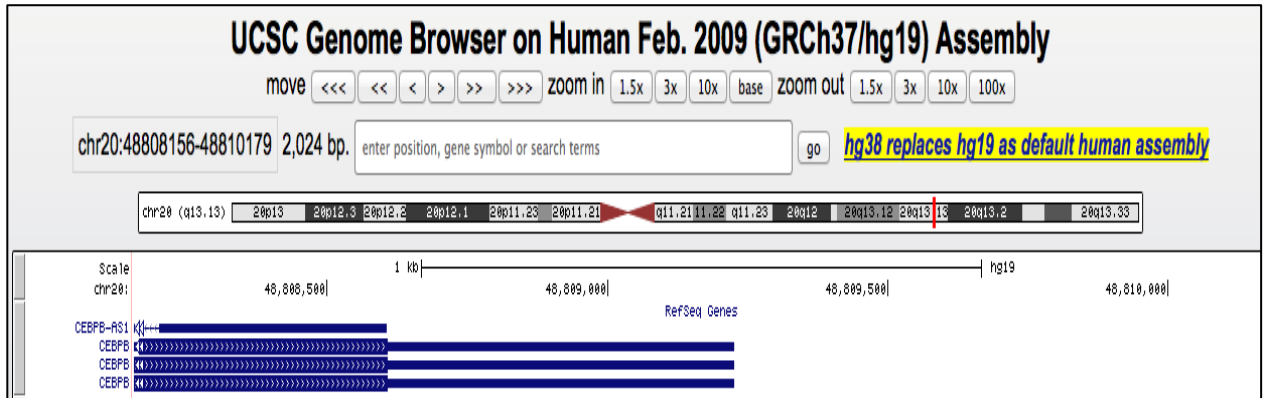


Figure 56: Représentation graphique de la région délétée 20q13.13 sur UCSC⁵⁰

Trois variants de ce gène ont été répertoriés dans la base de données des variants génomiques *DGV* (Figure 57): rs4811072 impliqué dans la forme familiale de la maladie de Parkinson [574], rs913678 dans la maladie de Behçet [575], et rs913678 incriminé dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [576]. Cependant, ce CNV est fréquent dans la population générale (MAF \geq 10%), ce qui laisse penser qu'il s'agit d'un variant bénin [577].

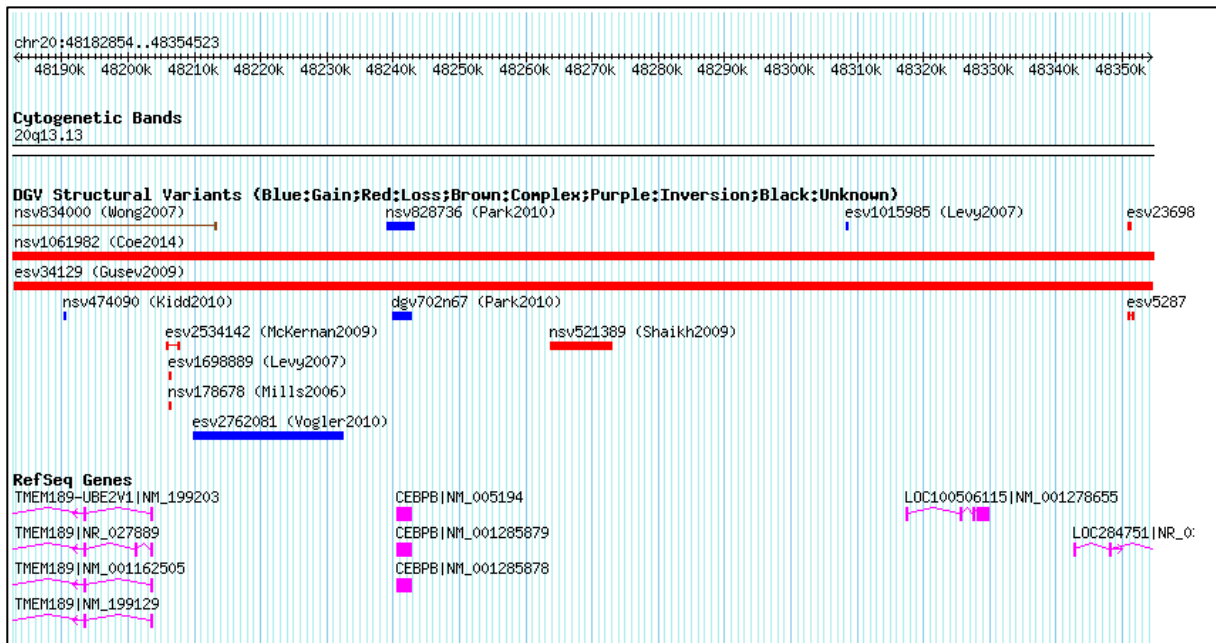


Figure 57: Variants du gène *CEBPB* répertoriés dans *DGV*

⁵⁰ <https://genome.ucsc.edu/mise> à jour le 30/01/2016

- Individu II-02 :

La duplication Xp11.22 identifiée chez cet individu concerne un segment chromosomique comportant plusieurs gènes de type micro-ARN (ou miARN) qui sont de courts acides ribonucléiques (ARN) simple-brin propres aux cellules eucaryotes [578]. Ils possèdent en moyenne 22 nucléotides, soit beaucoup moins que les autres ARN (Figure 58).

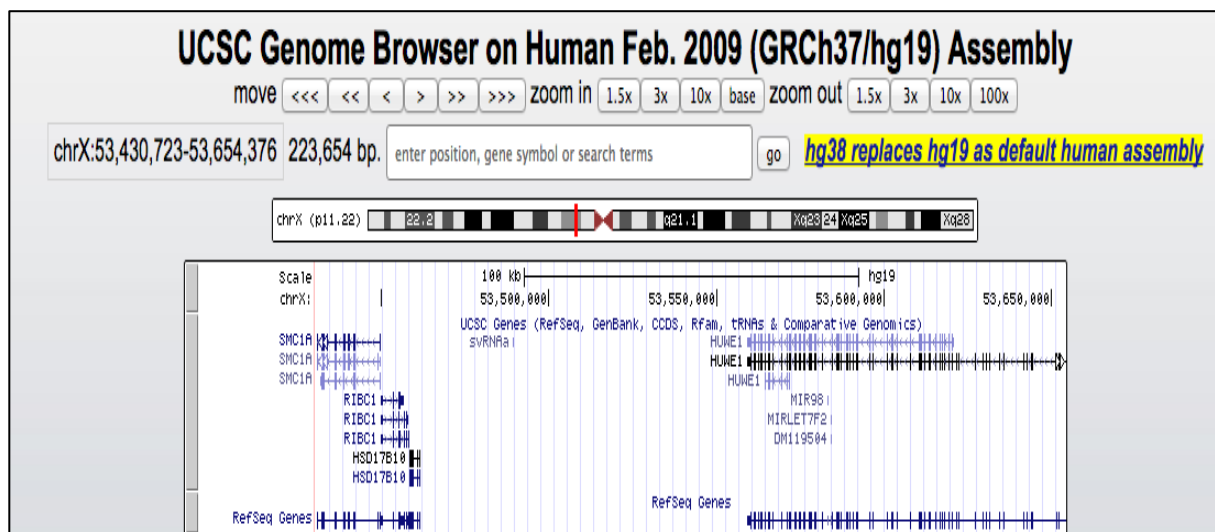


Figure 58: Représentation graphique des micro-ARN de la région dupliquée Xp11.22 sur UCSC

Les miARN sont des régulateurs post-transcriptionnels capables d'extinction de l'expression d'un gène: leur appariement à une séquence complémentaire de l'ARN messager (ARNm) du gène cible conduit à la répression traductionnelle ou à la dégradation de cet ARNm. Parce qu'ils affectent la régulation de l'expression des gènes, on peut penser que les miARN pourraient intervenir de façon indirecte dans le processus d'épileptogénèse, mais cette hypothèse reste à confirmer. En effet, le syndrome de microduplication Xp11.22 (OMIM #300705) a déjà été rapporté par plusieurs équipes qui ont décrit des familles multigénérationnelles comportant des individus de sexe masculin, présentant un retard mental avec retard de l'acquisition du langage, une dysarthrie et un faciès légèrement dysmorphique mais sans notion d'épilepsie [579-582]. De plus, la base de données DGV rapporte 9 duplications

impliquant la même région chromosomique chez des témoins sains. Ce CNV est donc probablement bénin.

- Individu II-06 :

Délétion 8p23.1 :

Cette région chromosomique délétée comporte plusieurs gènes :

-MCPH1 [OMIM : *607117] est localisé sur le chromosome 8 dans la bande cytogénétique 6.264.113-6.304.940. Il compte 7 exons et code pour une protéine qui joue un rôle dans le maintien de la phosphorylation inhibitrice de la cycline -dépendante kinase 1. Les mutations de ce gène ont été associées à la microcéphalie primaire autosomique récessive [583] et au syndrome de condensation prématurée du chromosome [584].

-AGPAT5 [OMIM : *614796] est localisé en 8p23, sur la bande cytogénétique : 6.565.877-6.619.023. Il contient 8 exons [585], et code pour une protéine membranaire qui catalyse l'acide lysophosphatidique en acide phosphatidique, étape cruciale dans la biosynthèse des phospholipides. Cette protéine s'exprime avec prédilection au niveau du cerveau, du muscle squelettique et du cœur [586].

-DEFA4 [OMIM : *601157] est localisé en 8p23.1 dans la bande cytogénétique 6.793.345-6.795.786. Il compte 3 exons et code pour un peptide corticostatique agoniste des canaux calciques qui inhibe l'action de l'ACTH [587].

-ANGPT2 [OMIM : *601922] est localisé en 8p23.1 sur la bande cytogénétique : 6.357.171-6.420.783. Il comporte 9 exons et code pour une protéine de 496 acides aminés qui joue un rôle dans la néovascularisation des tissus et l'angiogenèse [588, 589].

-PPP1R3B [OMIM : *610541] est localisé sur la bande cytogénétique 8.993.764-9.008.220 et comporte 2 exons. Il code pour la sous unité catalytique de la protéine phosphatase 1 (PP1), une protéine de 284 acides aminés exprimée dans le foie et le muscle squelettique [590] et qui joue un rôle important dans la suppression de l'activité de la phosphatase. Dunn et al ont identifié 20 variants bénins de *PPP1R3B* dans 13 familles caucasienne [591].

Les délétions 8p23.1 rapportées dans la littérature sont associées à plusieurs phénotypes : retard mental, microcéphalie, anomalies cardiaques congénitales, hernie diaphragmatique, hypospadias et troubles du comportement [592-595]. A ce jour, plus

de 50 cas de délétions interstitielles ou terminales en 8p23 ont été rapportés, mais seulement quelques délétions ont été caractérisées génétiquement au moyen d'analyses par microsatellite, FISH ou array CGH de haute résolution [596]. La prévalence de l'épilepsie dans les délétions subtélomériques 8p est estimée à 25% [594]. Les types de crises associés à ces délétions ont été décrits par plusieurs auteurs et incluent crises focales [597, 598], crises tonico-cloniques généralisées [599, 600], et absences atypiques [601]. Ces crises sont généralement bien contrôlées sous traitement antiépileptique [594]. Malgré que notre patiente présente une épilepsie myoclonique juvénile et ses crises sont bien contrôlées par monothérapie, il est peu probable que ce CNV soit responsable de son phénotype épileptique. En effet, cette délétion est commune, et sa fréquence allélique dans la population générale est supérieure à 1% [602].

Délétion 14q13.2 :

Cette région contient le gène *NFKBIA* (OMIM *164008) qui mesure 3.245 pb et comporte 6 exons (**Figure 59**). Il code pour une protéine membre de la famille des inhibiteurs de NF-kappa-B. Cette protéine est impliquée dans les réponses inflammatoires. Des mutations de ce gène ont été décrites dans la dysplasie ectodermique anhidrotique avec immunodéficiences mais n'ont jamais été associées à l'épilepsie. Là aussi, ce CNV n'explique pas le phénotype exprimé par cette patiente.

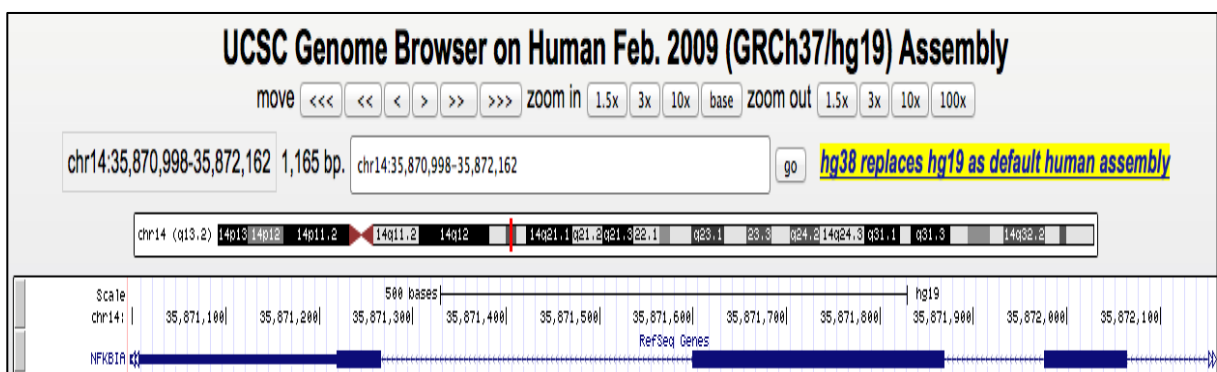


Figure 59: Représentation graphique du gène *NFKBIA* dans la région délétée 14q13.2 sur UCSC

- Individu II-07 :

Délétion 13q12.13

Cette région chromosomique contient le gène *AMER2* [OMIM : *614659] qui mesure 3.186 pb et comporte deux exons (**Figure 60**). Il code pour une protéine de 671 acides aminés qui joue un rôle dans la régulation de la prolifération tumorale [603]. Nous avons introduit les données de ce CNV dans UCSC qui décrit deux individus porteurs de la même délétion dont un avec hypothyroïdie et déficience intellectuelle, et l'autre avec syndrome dysmorphique intéressant les doigts et la face. Hors, notre patient présente ces trois phénotypes. Par ailleurs, ce CNV n'a jamais été rapporté dans les bases de données répertoriant les variants bénin dans la population générale. Ainsi, ce résultat est particulièrement intéressant mais doit être interprété avec précaution car ce CNV ne contient qu'un seul marqueur. Aussi, pour éviter tout biais de stratification, ce remaniement chromosomique devrait être recherché dans une population témoin d'origine Algérienne ou nord Africaine.

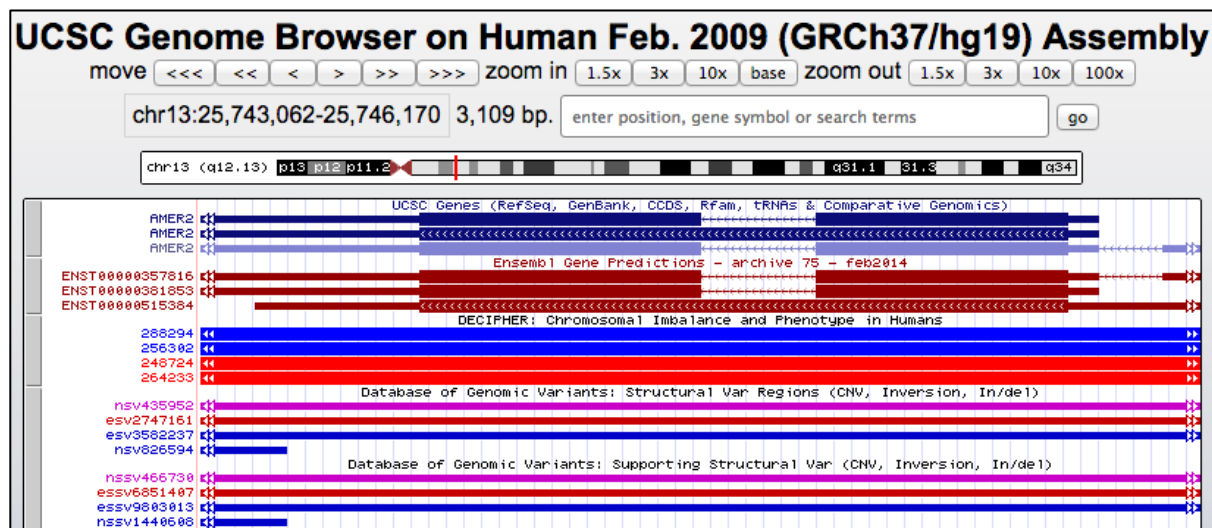


Figure 60: Représentation graphique du gène *AMER2* dans la région délétée 13q12.13 sur UCSC

Duplication 22q11.21

Le syndrome de microduplication 22q11.2 a été décrit pour la première fois en 1999 par Eldmann et al. chez une fillette de 4 ans avec retard du développement psychomoteur et

du langage, une dysmorphie faciale et une insuffisance vélaire [604]. A ce jour, plus de 60 individus porteurs d'une duplication 22q11.2 ont été identifiés [605]. Les remaniements génomiques du chromosome 22q11.2 incluant microdélétions et microduplications, sont secondaires à la recombinaison homologue, mais non allélique (NAHR), entre des séquences répétées et spécifiques (appelées *low copy repeats* [LCR]) [606]. Ces LCR segmentaires favorisent les mésappariements et les *crossing over* déséquilibrés entre chromosomes homologues lors de la méiose, donnant lieu à un chromosome avec un segment délété, et un autre, contenant une duplication de ce même segment [607]. Les CNV de la région chromosomique 22q11.2 sont responsables d'un large spectre phénotypique avec une grande variabilité inter et intrafamiliale, pouvant être expliqués par la richesse de cette région en gènes [608]. En effet, les individus affectés peuvent exprimer un retard du développement psychomoteur (67%), un retard mental léger à modéré (97%), une petite taille (63%) et une hypotonie musculaire (43%) [609]. Par ailleurs, les signes cliniques rappelant le syndrome vélocardiofacial ou syndrome de DiGeorge sont fréquemment rencontrés [610, 611]. En effet, on retrouve une insuffisance vélaire associée parfois à une fente palatine (70%), des anomalies urogénitales (40%) et une cardiopathie de type cono-troncale (20%). Sont fréquemment associés à ces signes des troubles du comportement, des troubles auditifs et une dysmorphie faciale modérée (visage long et étroit, sourcils haut situés, hypertélorisme, fentes palpébrales obliques en bas et en dehors, nez bulbeux, macrostomie et microrétrognathisme) [606, 607, 612]. Cependant, certains sujets porteurs de ce réarrangement chromosomiques sont tout à fait asymptomatiques.

Notre patient présente un retard du développement psychomoteur, une déficience intellectuelle, un langage puéril, une voix nasonnée ainsi qu'une hypotonie des quatre membres. Il présente également une petite taille et un syndrome dysmorphique fait d'un visage long et étroit, un rétrognathisme, des oreilles décollées et des doigts boudinés. Ce phénotype est parfaitement corrélé à l'anomalie chromosomique structurale identifiée chez lui par CGH *array*.

5. Limites de l'étude

Malgré la haute résolution de la technique d'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN utilisée pour la détection des CNV dans notre étude, cette technique

a des limites [613]. En effet, elle ne détecte pas les remaniements chromosomiques équilibrés tels que les translocations ou les inversions, ni les anomalies chromosomiques en faible mosaïque, ce qui justifie souvent de compléter l'analyse par un séquençage à haut débit [614]. Par ailleurs, certains CNV soulèvent des difficultés d'interprétation car leur lien de causalité avec le phénotype ne peut être clairement établi. Ils correspondent souvent à des duplications retrouvées dans des populations témoins. En raison de l'incertitude quant à leur pathogénicité, le conseil génétique est difficile.

6. Conclusion

Au terme de cette étude, nous n'avons pu identifier aucun CNV pathogène responsable du phénotype épileptique dans ces deux familles. Néanmoins, nous avons mis en évidence un CNV pathogène en 22q11.21 compatible avec le phénotype de déficience intellectuelle et syndrome dysmorphique. Des analyses par séquençage sont en cours afin de dépister les mutations responsables de paraplégie spastique héréditaire dans la première famille.

CHAPITRE VIII : CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

A travers ce travail, nous avons pu dresser le phénotype et déterminer le mode de transmission de l'épilepsie chez des familles algériennes multiplex, confirmant ainsi le caractère héréditaire de cette maladie. Nous avons également identifié les facteurs de risque propres à notre population, et confirmé l'agrégation familiale de l'épilepsie. Nos résultats confortent l'hypothèse d'une interaction entre une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux acquis dans la pathogenèse de l'épilepsie. Ils méritent une attention particulière et nécessitent la mise en œuvre d'une stratégie de sensibilisation de la population sur l'impact des mariages consanguins, et la mise en place d'une consultation spécialisée en conseil génétique pour les familles à risque.

Nous avons rapporté la première mutation du gène *GAL* en rapport avec un phénotype épileptique chez l'Homme, et nous avons confirmé l'implication du peptide muté dans le phénotype épileptique par des études *in silico*. Nos résultats pourraient avoir des retombées directes sur le développement de molécules antiépileptiques à base de galanine et de traitements par thérapie génique.

Nous avons également identifié un polymorphisme du gène *RELN* (rs55689103), dont les mutations ont déjà été associées à l'épilepsie et à la schizophrénie. Cependant, nous n'avons pu l'incriminer de façon formelle dans le phénotype de cette famille. Nous envisageons de poursuivre ce travail pour explorer les éléments génomiques fonctionnels autres que les gènes codant les protéines, tels que le dosage sérique de la protéine Reelin, de même que l'étude du niveau de méthylation du promoteur du gène *RELN*. Nous projetons également de rechercher la fréquence du polymorphisme rs55689103 par séquençage exonique d'individus témoins d'origine Algérienne, afin de caractériser la fréquence de l'allèle mineur et de l'allèle majeur de ce SNP, et ceci dans le but de positionner notre population par rapport aux différentes populations.

Dans un second temps, nous projetons de mener une étude de dépistage de ce polymorphisme dans une cohorte de patients d'origine Algérienne, au phénotype d'épilepsie du lobe temporal, recrutés et évalués au service de Neurologie du CHU d'Oran, afin d'évaluer l'implication de ce polymorphisme dans la survenue d'épilepsie.

Par la suite, nous tenterons de déterminer la fréquence allélique de ce polymorphisme dans la population des malades schizophrènes. Pour cela, une étude d'association est prévue dans une cohorte de familles Algériennes consanguines comportant plusieurs individus atteints de schizophrénie. Ces familles ont été recrutées au service de psychiatrie du CHU de Tlemcen et ont déjà fait l'objet d'une étude génétique par recherche de CNV [484].

Nous avons également décrit deux familles Algériennes consanguines au phénotype d'épilepsie myoclonique progressive de type 1, et confirmé les caractéristiques cliniques et évolutives connues de l'affection et son lien avec l'expansion du dodécamère CCCC GCCCGCG dans le gène *EPM1*.

Enfin, les résultats de recherche de CNV dans deux familles consanguines n'ont pas été concluants, reflétant les limites de la technique de CGH array et la difficulté d'interprétation des données. Des analyses par séquençage de nouvelle génération pourraient contribuer à décrypter les bases génétiques de l'épilepsie dans ces familles.

Références Bibliographiques

1. Badly-Moulinier, M., *Epilepsies en questions*. Pathologie-Science/Formation, ed. J.L. Eurotext. 1997. 250.
2. Fisher, R.S., W. van Emde Boas, W. Blume, C. Elger, P. Genton, P. Lee, and J. Engel, Jr., *Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)*. *Epilepsia*, 2005. 46(4): p. 470-2.
3. Ahmed, S.N., *Epileptic seizures and epilepsy*. *Epilepsia*, 2005. 46(10): p. 1700-1; author reply 1701-2.
4. Beghi, E., A. Berg, A. Carpio, L. Forsgren, D.C. Hesdorffer, W.A. Hauser, K. Malmgren, S. Shinnar, N. Temkin, D. Thurman, and T. Tomson, *Comment on epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)*. *Epilepsia*, 2005. 46(10): p. 1698-9; author reply 1701-2.
5. Gomez-Alonso, J., C. Andrade, and A. Koukoulis, *On the definition of epileptic seizures and epilepsy*. *Epilepsia*, 2005. 46(10): p. 1699-700; author reply 1701-2.
6. Fisher, R.S., C. Acevedo, A. Arzimanoglou, A. Bogacz, J.H. Cross, C.E. Elger, J. Engel, Jr., L. Forsgren, J.A. French, M. Glynn, D.C. Hesdorffer, B.I. Lee, G.W. Mathern, S.L. Moshe, E. Perucca, I.E. Scheffer, T. Tomson, M. Watanabe, and S. Wiebe, *ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy*. *Epilepsia*, 2014. 55(4): p. 475-82.
7. Fisher, R.S., *Redefining epilepsy*. *Curr Opin Neurol*, 2015. 28(2): p. 130-5.
8. Berg, A.T., *New classification efforts in epilepsy: Opportunities for clinical neurosciences*. *Epilepsy Behav*, 2016.
9. Dravet, C., *Comprendre l'épilepsie: Notions élémentaires sur l'épilepsie et les épilepsies*. Dialogue Médecin-Malade, ed. J.L. Eurotext. 2006, France.
10. Stol, M., *Epilepsy in Babylonia*, ed. C. Monographs. Vol. 2. 1993.
11. Catier, J., M. Weber, and E. Duperray, *Epileptiques célèbres: le cas Pétrarque*. *Epilepsies*, 2008. 20(4).
12. Tissot, S.A.D., *Traité de l'épilepsie*. 1770.

13. Eadie, M.J., *Sir Charles Locock and potassium bromide*. J R Coll Physicians Edinb, 2012. 42(3): p. 274-9.
14. Berkovic, S.F. and I.E. Scheffer, *Genetics of the epilepsies*. Epilepsia, 2001. 42 Suppl 5: p. 16-23.
15. WHO., *Epilepsies: etiology, epidemiology and prognosis*. 2001.
16. Behr, C., M.A. Goltzene, G. Kosmalski, E. Hirsch, and P. Ryvlin, *Epidemiology of epilepsy*. Rev Neurol (Paris), 2016. 172(1): p. 27-36.
17. WHO., *Atlas: epilepsy care in the world*. WHO press, 2005: p. 11-3.
18. Mutluay, F.K., A. Gunduz, A. Tekeoglu, S. Oguz, and S.N. Yeni, *Health related quality of life in patients with epilepsy in Turkey*. J Phys Ther Sci, 2016. 28(1): p. 240-5.
19. Beattie, J.F., S.A. Koch, L.B. Bolden, and M.D. Thompson, *Neuropsychological consequences of sleep disturbance in children with epilepsy*. Epilepsy Behav, 2016. 57(Pt A): p. 118-123.
20. Chen, H.F., Y.F. Tsai, M.S. Hsi, and J.C. Chen, *Factors affecting quality of life in adults with epilepsy in Taiwan: A cross-sectional, correlational study*. Epilepsy Behav, 2016. 58: p. 26-32.
21. Sander, J.W., *The epidemiology of epilepsy revisited*. Curr Opin Neurol, 2003. 16(2): p. 165-70.
22. Ba-Diop, A., B. Marin, M. Druet-Cabanac, E.B. Ngoungou, C.R. Newton, and P.M. Preux, *Epidemiology, causes, and treatment of epilepsy in sub-Saharan Africa*. Lancet Neurol, 2014. 13(10): p. 1029-44.
23. Bhalla, D., E. Lotfalinezhad, U. Timalisina, S. Kapoor, K.S. Kumar, A. Abdelrahman, B. Giagante, M. Tripathi, K. Srivastava, and I. Irmansyah, *A comprehensive review of epilepsy in the Arab world*. Seizure, 2016. 34: p. 54-9.
24. Ait Kaci, A.M., *Approche épidémiologique de l'épilepsie dans la région d'Alger.* , in *Faculté de médecine d'Alger*. 1978: Alger.
25. Christensen, J., M. Vestergaard, M.G. Pedersen, C.B. Pedersen, J. Olsen, and P. Sidenius, *Incidence and prevalence of epilepsy in Denmark*. Epilepsy Res, 2007. 76(1): p. 60-5.
26. Benavente, I., E. Rubio, C. Morales, N. Tajada, and P. Tamargo, *Prevalence of epilepsy amongst adolescents in Huesca, Spain: a community-based study*. Eur J Neurol, 2009. 16(10): p. 1138-43.

27. Bielen, I., L. Cvitanovic-Sojat, B. Bergman-Markovic, M. Kosicek, M. Planjar-Prvan, L. Vuksic, G. Miketek, and P. Matek, *Prevalence of epilepsy in Croatia: a population-based survey*. *Acta Neurol Scand*, 2007. 116(6): p. 361-7.
28. Edwards, T., A.G. Scott, G. Munyoki, V.M. Odera, E. Chengo, E. Bauni, T. Kwasa, L.W. Sander, B.G. Neville, and C.R. Newton, *Active convulsive epilepsy in a rural district of Kenya: a study of prevalence and possible risk factors*. *Lancet Neurol*, 2008. 7(1): p. 50-6.
29. Osuntokun, B.O., A.O. Adeuja, V.A. Nottidge, O. Bademosi, A. Olumide, O. Ige, F. Yaria, C.L. Bolis, and B.S. Schoenberg, *Prevalence of the epilepsies in Nigerian Africans: a community-based study*. *Epilepsia*, 1987. 28(3): p. 272-9.
30. Winkler, A.S., K. Kerschbaumsteiner, B. Stelzhammer, M. Meindl, J. Kaaya, and E. Schmutzhard, *Prevalence, incidence, and clinical characteristics of epilepsy--a community-based door-to-door study in northern Tanzania*. *Epilepsia*, 2009. 50(10): p. 2310-3.
31. Moualek, D., L.A. Pacha, S. Abrouk, M.I. Kediha, S. Nouioua, L.A. Aissa, M. Bellatache, S. Belarbi, S. Slimani, H. Khennouf, L. Fellahi, M. El Amine Hamimed, N. Benali, M.C. Chekkour, R. Maamoun, R. Dameche, S. Assami, and M. Tazir, *Multicenter transversal two-phase study to determine a national prevalence of epilepsy in Algeria*. *Neuroepidemiology*, 2012. 39(2): p. 131-4.
32. Hauser, W.A., J.F. Annegers, and L.R. Elveback, *Mortality in patients with epilepsy*. *Epilepsia*, 1980. 21(4): p. 399-412.
33. Mohanraj, R., J. Norrie, L.J. Stephen, K. Kelly, N. Hitiris, and M.J. Brodie, *Mortality in adults with newly diagnosed and chronic epilepsy: a retrospective comparative study*. *Lancet Neurol*, 2006. 5(6): p. 481-7.
34. Beghi, E., *Addressing the burden of epilepsy: Many unmet needs*. *Pharmacol Res*, 2016.
35. Wilson, D.A., A.M. Malek, J.L. Wagner, B.B. Wannamaker, and A.W. Selassie, *Mortality in people with epilepsy: A statewide retrospective cohort study*. *Epilepsy Res*, 2016. 122: p. 7-14.
36. Sarfo, F.S., D.O. Awuah, C. Nkyi, J. Akassi, O.K. Opare-Sem, and B. Ovbiagele, *Recent patterns and predictors of neurological mortality among hospitalized patients in Central Ghana*. *J Neurol Sci*, 2016. 363: p. 217-24.
37. Tellez-Zenteno, J.F., R. Dhar, L. Hernandez-Ronquillo, and S. Wiebe, *Long-term outcomes in epilepsy surgery: antiepileptic drugs, mortality, cognitive and psychosocial aspects*. *Brain*, 2007. 130(Pt 2): p. 334-45.

38. Walczak, T.S., I.E. Leppik, M. D'Amelio, J. Rarick, E. So, P. Ahman, K. Ruggles, G.D. Cascino, J.F. Annegers, and W.A. Hauser, *Incidence and risk factors in sudden unexpected death in epilepsy: a prospective cohort study*. *Neurology*, 2001. 56(4): p. 519-25.
39. Ficker, D.M., E.L. So, W.K. Shen, J.F. Annegers, P.C. O'Brien, G.D. Cascino, and P.G. Belau, *Population-based study of the incidence of sudden unexplained death in epilepsy*. *Neurology*, 1998. 51(5): p. 1270-4.
40. Dlouhy, B.J., B.K. Gehlbach, and G.B. Richerson, *Sudden unexpected death in epilepsy: basic mechanisms and clinical implications for prevention*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2016. 87(4): p. 402-13.
41. Hitiris, N., S. Suratman, K. Kelly, L.J. Stephen, G.J. Sills, and M.J. Brodie, *Sudden unexpected death in epilepsy: a search for risk factors*. *Epilepsy Behav*, 2007. 10(1): p. 138-41.
42. Langan, Y., L. Nashef, and J.W. Sander, *Case-control study of SUDEP*. *Neurology*, 2005. 64(7): p. 1131-3.
43. Nilsson, L., B.Y. Farahmand, P.G. Persson, I. Thiblin, and T. Tomson, *Risk factors for sudden unexpected death in epilepsy: a case-control study*. *Lancet*, 1999. 353(9156): p. 888-93.
44. Tellez-Zenteno, J.F., L.H. Ronquillo, and S. Wiebe, *Sudden unexpected death in epilepsy: evidence-based analysis of incidence and risk factors*. *Epilepsy Res*, 2005. 65(1-2): p. 101-15.
45. Jones, J.E., B.P. Hermann, J.J. Barry, F.G. Gilliam, A.M. Kanner, and K.J. Meador, *Rates and risk factors for suicide, suicidal ideation, and suicide attempts in chronic epilepsy*. *Epilepsy Behav*, 2003. 4 Suppl 3: p. S31-8.
46. Mazza, M., P. Bria, and S. Mazza, *Depression and suicide in epilepsy: fact or artefact?* *J Neurol Sci*, 2007. 260(1-2): p. 300-1.
47. Harris, E.C. and B. Barraclough, *Suicide as an outcome for mental disorders. A meta-analysis*. *Br J Psychiatry*, 1997. 170: p. 205-28.
48. Casetta, I., V.C. Monetti, S. Malagu, E. Paolino, V. Govoni, E. Fainardi, M.R. Tola, and E. Granieri, *Risk factors for cryptogenic and idiopathic partial epilepsy: a community-based case-control study in Copparo, Italy*. *Neuroepidemiology*, 2002. 21(5): p. 251-4.
49. Ogunniyi, A., B.O. Osuntokun, O. Bademosi, A.O. Adeuja, and B.S. Schoenberg, *Risk factors for epilepsy: case-control study in Nigerians*. *Epilepsia*, 1987. 28(3): p. 280-5.

50. Rocca, W.A., F.W. Sharbrough, W.A. Hauser, J.F. Annegers, and B.S. Schoenberg, *Risk factors for absence seizures: a population-based case-control study in Rochester, Minnesota*. *Neurology*, 1987. 37(8): p. 1309-14.
51. Asadi-Pooya, A.A. and K. Hojabri, *Risk factors for childhood epilepsy: a case-control study*. *Epilepsy Behav*, 2005. 6(2): p. 203-6.
52. Walsh, S., J. Donnan, Y. Fortin, L. Sikora, A. Morrissey, K. Collins, and D. MacDonald, *A systematic review of the risks factors associated with the onset and natural progression of epilepsy*. *Neurotoxicology*, 2016.
53. Chentouf, A., R. Talhi, A. Dahdouh, L. Benbihi, S. Benilha, M.L. Oubaiche, and M. Chaouch, *Consanguinity and epilepsy in Oran, Algeria: A case-control study*. *Epilepsy Res*, 2015. 111: p. 10-7.
54. Baram, T.Z., A. Gerth, and L. Schultz, *Febrile seizures: an appropriate-aged model suitable for long-term studies*. *Brain Res Dev Brain Res*, 1997. 98(2): p. 265-70.
55. Dube, C., C. Richichi, R.A. Bender, G. Chung, B. Litt, and T.Z. Baram, *Temporal lobe epilepsy after experimental prolonged febrile seizures: prospective analysis*. *Brain*, 2006. 129(Pt 4): p. 911-22.
56. Olney, J.W., R.C. Collins, and R.S. Sloviter, *Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage*. *Adv Neurol*, 1986. 44: p. 857-77.
57. Depaulis, A. and S. Hamelin, *Animal models for mesiotemporal lobe epilepsy: The end of a misunderstanding?* *Rev Neurol (Paris)*, 2015. 171(3): p. 217-26.
58. Danober, L., C. Deransart, A. Depaulis, M. Vergnes, and C. Marescaux, *Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat*. *Prog Neurobiol*, 1998. 55(1): p. 27-57.
59. Rajakulendran, S. and M.G. Hanna, *The Role of Calcium Channels in Epilepsy*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016. 6(1).
60. Bernard, C., *Physiopathologie des épilepsies: avancées récentes*. *Presse Med*, 2011(40): p. 256-264.
61. Abbott, N.J., A.A. Patabendige, D.E. Dolman, S.R. Yusof, and D.J. Begley, *Structure and function of the blood-brain barrier*. *Neurobiol Dis*, 2010. 37(1): p. 13-25.
62. Vezzani, A., S. Balosso, and T. Ravizza, *The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy*. *Brain Behav Immun*, 2008. 22(6): p. 797-803.

63. Shlosberg, D., M. Benifla, D. Kaufer, and A. Friedman, *Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury*. *Nat Rev Neurol*, 2010. 6(7): p. 393-403.
64. Ivens, S., D. Kaufer, L.P. Flores, I. Bechmann, D. Zumsteg, O. Tomkins, E. Seiffert, U. Heinemann, and A. Friedman, *TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis*. *Brain*, 2007. 130(Pt 2): p. 535-47.
65. Dube, C., A. Vezzani, M. Behrens, T. Bartfai, and T.Z. Baram, *Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures*. *Ann Neurol*, 2005. 57(1): p. 152-5.
66. Zurolo, E., A. Iyer, M. Maroso, C. Carbonell, J.J. Anink, T. Ravizza, K. Fluiter, W.G. Spliet, P.C. van Rijen, A. Vezzani, and E. Aronica, *Activation of Toll-like receptor, RAGE and HMGB1 signalling in malformations of cortical development*. *Brain*, 2011. 134(Pt 4): p. 1015-32.
67. Li, Y., A.A. Korgaonkar, B. Swietek, J. Wang, F.S. Elgammal, S. Elkabes, and V. Santhakumar, *Toll-like receptor 4 enhancement of non-NMDA synaptic currents increases dentate excitability after brain injury*. *Neurobiol Dis*, 2015. 74: p. 240-53.
68. Maroso, M., S. Balosso, T. Ravizza, J. Liu, E. Aronica, A.M. Iyer, C. Rossetti, M. Molteni, M. Casalgrandi, A.A. Manfredi, M.E. Bianchi, and A. Vezzani, *Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures*. *Nat Med*, 2010. 16(4): p. 413-9.
69. Becker, A.J., J. Pitsch, D. Sochivko, T. Opitz, M. Staniek, C.C. Chen, K.P. Campbell, S. Schoch, Y. Yaari, and H. Beck, *Transcriptional upregulation of Cav3.2 mediates epileptogenesis in the pilocarpine model of epilepsy*. *J Neurosci*, 2008. 28(49): p. 13341-53.
70. Su, H., D. Sochivko, A. Becker, J. Chen, Y. Jiang, Y. Yaari, and H. Beck, *Upregulation of a T-type Ca²⁺ channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus*. *J Neurosci*, 2002. 22(9): p. 3645-55.
71. Yaari, Y., C. Yue, and H. Su, *Recruitment of apical dendritic T-type Ca²⁺ channels by backpropagating spikes underlies de novo intrinsic bursting in hippocampal epileptogenesis*. *J Physiol*, 2007. 580(Pt. 2): p. 435-50.
72. Roopra, A., Y. Huang, and R. Dingledine, *Neurological disease: listening to gene silencers*. *Mol Interv*, 2001. 1(4): p. 219-28.
73. Warburton, A., F. Miyajima, K. Shazadi, J. Crossley, M.R. Johnson, A.G. Marson, G.A. Baker, J.P. Quinn, and G.J. Sills, *NRSF and BDNF polymorphisms as biomarkers of*

- cognitive dysfunction in adults with newly diagnosed epilepsy*. *Epilepsy Behav*, 2016. 54: p. 117-27.
74. Berg, A.T., S.F. Berkovic, M.J. Brodie, J. Buchhalter, J.H. Cross, W. van Emde Boas, J. Engel, J. French, T.A. Glauser, G.W. Mathern, S.L. Moshe, D. Nordli, P. Plouin, and I.E. Scheffer, *Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009*. *Epilepsia*, 2010. 51(4): p. 676-85.
 75. Engel, J., Jr., *ILAE classification of epilepsy syndromes*. *Epilepsy Res*, 2006. 70 Suppl 1: p. S5-10.
 76. ILAE, *Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy*. *Epilepsia*, 1989. 30(4): p. 389-99.
 77. Berg, A., *Classification des épilepsies: actuelle et future*. *EMC neurologie*, 2003. 17-044-C-60.
 78. Gastaut, H., *Classification of the epilepsies. Proposal for an international classification*. *Epilepsia*, 1969. 10: p. Suppl:14-21.
 79. Merlis, J.K., *Proposal for an international classification of the epilepsies*. *Epilepsia*, 1970. 11(1): p. 114-9.
 80. ILAE, *Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy*. *Epilepsia*, 1985. 26(3): p. 268-78.
 81. Gourfinkel-An, I., *Aspects génétiques des épilepsies*. *EMC neurologie*, 2009. 17-001-A-30.
 82. Helbig, I., *New technologies in molecular genetics: the impact on epilepsy research*. *Prog Brain Res*, 2014. 213: p. 253-78.
 83. Helbig, K.L., K.D. Farwell Hagman, D.N. Shinde, C. Mroske, Z. Powis, S. Li, S. Tang, and I. Helbig, *Diagnostic exome sequencing provides a molecular diagnosis for a significant proportion of patients with epilepsy*. *Genet Med*, 2016.
 84. Klug, W., M. Cummings, and C. Spencer, *Genetics*, ed. P.E. France. 2006, Paris.
 85. Chouraki, V., *Etudes d'association pangénomique appliquées à la recherche de nouveaux facteurs de risque génétiques de la maladie d'Alzheimer.*, in *HAL*. 2013.

86. Fukuhara, N., S. Tokiguchi, K. Shirakawa, and T. Tsubaki, *Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? Light-and electron-microscopic studies of two cases and review of literature*. J Neurol Sci, 1980. 47(1): p. 117-33.
87. Khoury, M.J., T.H. Beaty, and B.H. Cohen, *Scope and strategies of genetic epidemiology: analysis of articles published in Genetic Epidemiology, 1984-1991*. Genet Epidemiol, 1993. 10(5): p. 321-9.
88. Ziegler, A., *Basic mechanisms of monogenic inheritance*. Epilepsia, 1999. 40 Suppl 3: p. 4-8.
89. Moraru, I., S. Antohi, and L. Imbroane, *[Polygenic (multifactorial) heredity and interpretation of the genetic component in common diseases]*. Stud Cercet Med Interna, 1973. 14(1): p. 3-5.
90. Deng, H., X. Xiu, and Z. Song, *The molecular biology of genetic-based epilepsies*. Mol Neurobiol, 2014. 49(1): p. 352-67.
91. Gursoy, S. and D. Ercal, *Diagnostic Approach to Genetic Causes of Early-Onset Epileptic Encephalopathy*. J Child Neurol, 2016. 31(4): p. 523-32.
92. Petrovski, S. and P. Kwan, *Unraveling the genetics of common epilepsies: approaches, platforms, and caveats*. Epilepsy Behav, 2013. 26(3): p. 229-33.
93. Demenais, F., M. Martinez, and M. Lathrop, *Méthodes statistiques pour identifier les gènes dans les maladies multifactorielles*. Ann Instit Pasteur., 1996. 7(1): p. 3-12.
94. Ottman, R. and N. Risch, *Genetic Epidemiology and Gene Discovery in Epilepsy*, in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, J.L. Noebels, et al., Editors. 2012: Bethesda (MD).
95. Berkovic, S.F., R.A. Howell, D.A. Hay, and J.L. Hopper, *Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes*. Ann Neurol, 1998. 43(4): p. 435-45.
96. Corey, L.A., K. Berg, J.M. Pellock, M.H. Solaas, W.E. Nance, and R.J. DeLorenzo, *The occurrence of epilepsy and febrile seizures in Virginian and Norwegian twins*. Neurology, 1991. 41(9): p. 1433-6.
97. Inouye, E., *Observations on forty twin index cases with chronic epilepsy and their co-twins*. J Nerv Ment Dis, 1960. 130: p. 401-16.
98. Kjeldsen, M.J., L.A. Corey, K. Christensen, and M.L. Friis, *Epileptic seizures and syndromes in twins: the importance of genetic factors*. Epilepsy Res, 2003. 55(1-2): p. 137-46.

99. Lennox, W.G., *The heredity of epilepsy as told by relatives and twins*. J Am Med Assoc, 1951. 146(6): p. 529-36.
100. Tsuboi, T., *Genetic aspects of epilepsy*. Folia Psychiatr Neurol Jpn, 1980. 34(3): p. 215-25.
101. Harvald, B. and M. Hauge, *Hereditary factors elucidated by twin studies*. Genetics and the Epidemiology of Chronic Diseases, ed. J.C. Neel. Vol. 1163. 1965, Department of Health, Education and Welfare. Washington.
102. Corey, L.A., J.M. Pellock, M.J. Kjeldsen, and K.O. Nakken, *Importance of genetic factors in the occurrence of epilepsy syndrome type: a twin study*. Epilepsy Res, 2011. 97(1-2): p. 103-11.
103. Brena, R.M., T.H. Huang, and C. Plass, *Toward a human epigenome*. Nat Genet, 2006. 38(12): p. 1359-60.
104. Fraga, M.F., E. Ballestar, M.F. Paz, S. Ropero, F. Setien, M.L. Ballestar, D. Heine-Suner, J.C. Cigudosa, M. Urioste, J. Benitez, M. Boix-Chornet, A. Sanchez-Aguilera, C. Ling, E. Carlsson, P. Poulsen, A. Vaag, Z. Stephan, T.D. Spector, Y.Z. Wu, C. Plass, and M. Esteller, *Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(30): p. 10604-9.
105. Chentouf, A., A. Dahdouh, M. Guipponi, M.L. Oubaiche, M. Chaouch, H. Hamamy, and S.E. Antonarakis, *Familial epilepsy in Algeria: Clinical features and inheritance profiles*. Seizure, 2015. 31: p. 12-8.
106. Ottman, R., J.F. Annegers, N. Risch, W.A. Hauser, and M. Susser, *Relations of genetic and environmental factors in the etiology of epilepsy*. Ann Neurol, 1996. 39(4): p. 442-9.
107. Greenberg, D.A. and W.C. Stewart, *How should we be searching for genes for common epilepsy? A critique and a prescription*. Epilepsia, 2012. 53 Suppl 4: p. 72-80.
108. Désir, J., *Etude génétique de maladies rares chez des patients issus de mariages consanguins*. 2008, UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES FACULTE DE MEDECINE.
109. Hodge, S.E., L. Rodriguez-Murillo, L.J. Strug, and D.A. Greenberg, *Multipoint lods provide reliable linkage evidence despite unknown limiting distribution: type I error probabilities decrease with sample size for multipoint lods and mods*. Genet Epidemiol, 2008. 32(8): p. 800-15.
110. Risch, N.J., *Searching for genetic determinants in the new millennium*. Nature, 2000. 405(6788): p. 847-56.

111. Claes, L., J. Del-Favero, B. Ceulemans, L. Lagae, C. Van Broeckhoven, and P. De Jonghe, *De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy*. Am J Hum Genet, 2001. 68(6): p. 1327-32.
112. Brunklaus, A., R. Ellis, H. Stewart, S. Aylett, E. Reavey, R. Jefferson, R. Jain, S. Chakraborty, S. Jayawant, and S.M. Zuberi, *Homozygous mutations in the SCN1A gene associated with genetic epilepsy with febrile seizures plus and Dravet syndrome in 2 families*. Eur J Paediatr Neurol, 2015. 19(4): p. 484-8.
113. Wallace, R.H., D.W. Wang, R. Singh, I.E. Scheffer, A.L. George, Jr., H.A. Phillips, K. Saar, A. Reis, E.W. Johnson, G.R. Sutherland, S.F. Berkovic, and J.C. Mulley, *Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B*. Nat Genet, 1998. 19(4): p. 366-70.
114. Scheffer, I.E., L.A. Harkin, B.E. Grinton, L.M. Dibbens, S.J. Turner, M.A. Zielinski, R. Xu, G. Jackson, J. Adams, M. Connellan, S. Petrou, R.M. Wellard, R.S. Briellmann, R.H. Wallace, J.C. Mulley, and S.F. Berkovic, *Temporal lobe epilepsy and GEFS+ phenotypes associated with SCN1B mutations*. Brain, 2007. 130(Pt 1): p. 100-9.
115. Heron, S.E., K.M. Crossland, E. Andermann, H.A. Phillips, A.J. Hall, A. Bleasel, M. Shevell, S. Mercho, M.H. Seni, M.C. Guiot, J.C. Mulley, S.F. Berkovic, and I.E. Scheffer, *Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures*. Lancet, 2002. 360(9336): p. 851-2.
116. Herlenius, E., S.E. Heron, B.E. Grinton, D. Keay, I.E. Scheffer, J.C. Mulley, and S.F. Berkovic, *SCN2A mutations and benign familial neonatal-infantile seizures: the phenotypic spectrum*. Epilepsia, 2007. 48(6): p. 1138-42.
117. Bisulli, F., P. Tinuper, E. Scudellaro, I. Naldi, A. Bagattin, P. Avoni, R. Michelucci, and C. Nobile, *A de novo LGI1 mutation in sporadic partial epilepsy with auditory features*. Ann Neurol, 2004. 56(3): p. 455-6.
118. Klein, K.M., M. Pendziwiat, R. Cohen, S. Appenzeller, C.G. de Kovel, F. Rosenow, B.P. Koeleman, G. Kuhlenbaumer, L. Sheintuch, R. Veksler, A. Friedman, Z. Afawi, and I. Helbig, *Autosomal dominant epilepsy with auditory features: a new LGI1 family including a phenocopy with cortical dysplasia*. J Neurol, 2016. 263(1): p. 11-6.
119. Cossette, P., L. Liu, K. Brisebois, H. Dong, A. Lortie, M. Vanasse, J.M. Saint-Hilaire, L. Carmant, A. Verner, W.Y. Lu, Y.T. Wang, and G.A. Rouleau, *Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy*. Nat Genet, 2002. 31(2): p. 184-9.
120. Kodera, H., C. Ohba, M. Kato, T. Maeda, K. Araki, D. Tajima, M. Matsuo, N. Hino-Fukuyo, K. Kohashi, A. Ishiyama, S. Takeshita, H. Motoi, T. Kitamura, A. Kikuchi, Y. Tsurusaki, M. Nakashima, N. Miyake, M. Sasaki, S. Kure, K. Haginoya, H. Saitsu, and

- N. Matsumoto, *De novo GABRA1 mutations in Ohtahara and West syndromes*. Epilepsia, 2016.
121. Heron, S.E., H. Khosravani, D. Varela, C. Bladen, T.C. Williams, M.R. Newman, I.E. Scheffer, S.F. Berkovic, J.C. Mulley, and G.W. Zamponi, *Extended spectrum of idiopathic generalized epilepsies associated with CACNA1H functional variants*. Ann Neurol, 2007. 62(6): p. 560-8.
122. Spillane, J., D.M. Kullmann, and M.G. Hanna, *Genetic neurological channelopathies: molecular genetics and clinical phenotypes*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2016. 87(1): p. 37-48.
123. Kleefuss-Lie, A., W. Friedl, S. Cichon, K. Haug, M. Warnstedt, A. Alekov, T. Sander, A. Ramirez, B. Poser, S. Maljevic, S. Hebeisen, C. Kubisch, J. Rebstock, S. Horvath, K. Hallmann, J.S. Dullinger, B. Rau, F. Haverkamp, S. Beyenburg, H. Schulz, D. Janz, B. Giese, G. Muller-Newen, P. Propping, C.E. Elger, C. Fahlke, and H. Lerche, *CLCN2 variants in idiopathic generalized epilepsy*. Nat Genet, 2009. 41(9): p. 954-5.
124. Wallace, R.H., C. Marini, S. Petrou, L.A. Harkin, D.N. Bowser, R.G. Panchal, D.A. Williams, G.R. Sutherland, J.C. Mulley, I.E. Scheffer, and S.F. Berkovic, *Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures*. Nat Genet, 2001. 28(1): p. 49-52.
125. Singh, B., I. Ogiwara, M. Kaneda, N. Tokonami, E. Mazaki, K. Baba, K. Matsuda, Y. Inoue, and K. Yamakawa, *A Kv4.2 truncation mutation in a patient with temporal lobe epilepsy*. Neurobiol Dis, 2006. 24(2): p. 245-53.
126. Suls, A., S.A. Mullen, Y.G. Weber, K. Verhaert, B. Ceulemans, R. Guerrini, T.V. Wuttke, A. Salvo-Vargas, L. Deprez, L.R. Claes, A. Jordanova, S.F. Berkovic, H. Lerche, P. De Jonghe, and I.E. Scheffer, *Early-onset absence epilepsy caused by mutations in the glucose transporter GLUT1*. Ann Neurol, 2009. 66(3): p. 415-9.
127. Gloyn, A.L., C. Diatloff-Zito, E.L. Edghill, C. Bellanne-Chantelot, S. Nivot, R. Coutant, S. Ellard, A.T. Hattersley, and J.J. Robert, *KCNJ11 activating mutations are associated with developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes syndrome and other neurological features*. Eur J Hum Genet, 2006. 14(7): p. 824-30.
128. Proks, P., A.L. Arnold, J. Bruining, C. Girard, S.E. Flanagan, B. Larkin, K. Colclough, A.T. Hattersley, F.M. Ashcroft, and S. Ellard, *A heterozygous activating mutation in the sulphonylurea receptor SUR1 (ABCC8) causes neonatal diabetes*. Hum Mol Genet, 2006. 15(11): p. 1793-800.
129. Stogmann, E., P. Lichtner, C. Baumgartner, S. Bonelli, E. Assem-Hilger, F. Leutmezer, M. Schmied, C. Hotzy, T.M. Strom, T. Meitinger, F. Zimprich, and A. Zimprich, *Idiopathic generalized epilepsy phenotypes associated with different EFHC1 mutations*. Neurology, 2006. 67(11): p. 2029-31.

130. Helbig, I., H.C. Mefford, A.J. Sharp, M. Guipponi, M. Fichera, A. Franke, H. Muhle, C. de Kovel, C. Baker, S. von Spiczak, K.L. Kron, I. Steinich, A.A. Kleefuss-Lie, C. Leu, V. Gaus, B. Schmitz, K.M. Klein, P.S. Reif, F. Rosenow, Y. Weber, H. Lerche, F. Zimprich, L. Urak, K. Fuchs, M. Feucht, P. Genton, P. Thomas, F. Visscher, G.J. de Haan, R.S. Moller, H. Hjalgrim, D. Luciano, M. Wittig, M. Nothnagel, C.E. Elger, P. Nurnberg, C. Romano, A. Malafosse, B.P. Koeleman, D. Lindhout, U. Stephani, S. Schreiber, E.E. Eichler, and T. Sander, *15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy*. *Nat Genet*, 2009. 41(2): p. 160-2.
131. Deutsch, S.I., J.A. Burket, A.D. Benson, and M.R. Urbano, *The 15q13.3 deletion syndrome: Deficient alpha(7)-containing nicotinic acetylcholine receptor-mediated neurotransmission in the pathogenesis of neurodevelopmental disorders*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2016. 64: p. 109-17.
132. Engelsen, B.A., C. Tzoulis, B. Karlsen, A. Lillebo, L.M. Laegreid, J. Aasly, M. Zeviani, and L.A. Bindoff, *POLG1 mutations cause a syndromic epilepsy with occipital lobe predilection*. *Brain*, 2008. 131(Pt 3): p. 818-28.
133. Isohanni, P., A.H. Hakonen, L. Euro, I. Paetau, T. Linnankivi, E. Liukkonen, T. Wallden, L. Luostarinen, L. Valanne, A. Paetau, J. Uusimaa, T. Lonnqvist, A. Suomalainen, and H. Pihko, *POLG1 manifestations in childhood*. *Neurology*, 2011. 76(9): p. 811-5.
134. Saitsu, H., M. Kato, T. Mizuguchi, K. Hamada, H. Osaka, J. Tohyama, K. Uruno, S. Kumada, K. Nishiyama, A. Nishimura, I. Okada, Y. Yoshimura, S. Hirai, T. Kumada, K. Hayasaka, A. Fukuda, K. Ogata, and N. Matsumoto, *De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy*. *Nat Genet*, 2008. 40(6): p. 782-8.
135. Stamberger, H., M. Nikanorova, M.H. Willemsen, P. Accorsi, M. Angriman, H. Baier, I. Benkel-Herrenbrueck, V. Benoit, M. Budetta, A. Caliebe, G. Cantalupo, G. Capovilla, G. Casara, C. Courage, M. Deprez, A. Destree, R. Dilena, C.E. Erasmus, M. Fannemel, R. Fjaer, L. Giordano, K.L. Helbig, H.O. Heyne, J. Klepper, G.J. Kluger, D. Lederer, M. Lodi, O. Maier, A. Merckenschlager, N. Michelberger, C. Minetti, H. Muhle, J. Phalin, K. Ramsey, A. Romeo, J. Schallner, I. Schanze, M. Shinawi, K. Slegers, K. Sterbova, S. Syrbe, M. Traverso, A. Tzschach, P. Uldall, R. Van Coster, H. Verhelst, M. Viri, S. Winter, M. Wolff, M. Zenker, L. Zoccante, P. De Jonghe, I. Helbig, P. Striano, J.R. Lemke, R.S. Moller, and S. Weckhuysen, *STXBP1 encephalopathy: A neurodevelopmental disorder including epilepsy*. *Neurology*, 2016. 86(10): p. 954-62.
136. Rosas-Vargas, H., N. Bahi-Buisson, C. Philippe, J. Nectoux, B. Girard, M.A. N'Guyen Morel, C. Gitiaux, L. Lazaro, S. Odent, P. Jonveaux, J. Chelly, and T. Bienvenu, *Impairment of CDKL5 nuclear localisation as a cause for severe infantile encephalopathy*. *J Med Genet*, 2008. 45(3): p. 172-8.

137. Leoncini, S., C. De Felice, C. Signorini, G. Zollo, A. Cortelazzo, T. Durand, J.M. Galano, R. Guerranti, M. Rossi, L. Ciccoli, and J. Hayek, *Cytokine Dysregulation in MECP2- and CDKL5-Related Rett Syndrome: Relationships with Aberrant Redox Homeostasis, Inflammation, and omega-3 PUFAs*. *Oxid Med Cell Longev*, 2015. 2015: p. 421624.
138. Kato, M., S. Saitoh, A. Kamei, H. Shiraishi, Y. Ueda, M. Akasaka, J. Tohyama, N. Akasaka, and K. Hayasaka, *A longer polyalanine expansion mutation in the ARX gene causes early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern (Ohtahara syndrome)*. *Am J Hum Genet*, 2007. 81(2): p. 361-6.
139. Olivetti, P.R. and J.L. Noebels, *Interneuron, interrupted: molecular pathogenesis of ARX mutations and X-linked infantile spasms*. *Curr Opin Neurobiol*, 2012. 22(5): p. 859-65.
140. Singh, N.A., C. Charlier, D. Stauffer, B.R. DuPont, R.J. Leach, R. Melis, G.M. Ronen, I. Bjerre, T. Quattlebaum, J.V. Murphy, M.L. McHarg, D. Gagnon, T.O. Rosales, A. Peiffer, V.E. Anderson, and M. Leppert, *A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns*. *Nat Genet*, 1998. 18(1): p. 25-9.
141. Wang, J.J. and Y. Li, *KCNQ potassium channels in sensory system and neural circuits*. *Acta Pharmacol Sin*, 2016. 37(1): p. 25-33.
142. Charlier, C., N.A. Singh, S.G. Ryan, T.B. Lewis, B.E. Reus, R.J. Leach, and M. Leppert, *A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family*. *Nat Genet*, 1998. 18(1): p. 53-5.
143. Maljevic, S. and H. Lerche, *Potassium channel genes and benign familial neonatal epilepsy*. *Prog Brain Res*, 2014. 213: p. 17-53.
144. Zuberi, S.M., L.H. Eunson, A. Spauschus, R. De Silva, J. Tolmie, N.W. Wood, R.C. McWilliam, J.B. Stephenson, D.M. Kullmann, and M.G. Hanna, *A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy*. *Brain*, 1999. 122 (Pt 5): p. 817-25.
145. Ishida, S., Y. Sakamoto, T. Nishio, S. Baulac, M. Kuwamura, Y. Ohno, A. Takizawa, S. Kaneko, T. Serikawa, and T. Mashimo, *Kcna1-mutant rats dominantly display myokymia, neuromyotonia and spontaneous epileptic seizures*. *Brain Res*, 2012. 1435: p. 154-66.
146. Steinlein, O.K., J.C. Mulley, P. Propping, R.H. Wallace, H.A. Phillips, G.R. Sutherland, I.E. Scheffer, and S.F. Berkovic, *A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy*. *Nat Genet*, 1995. 11(2): p. 201-3.

147. Chen, Z., L. Wang, C. Wang, Q. Chen, Q. Zhai, Y. Guo, and Y. Zhang, *Mutational analysis of CHRNA2, CHRNA2 and CHRNA4 genes in Chinese population with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy*. Int J Clin Exp Med, 2015. 8(6): p. 9063-70.
148. Aridon, P., C. Marini, C. Di Resta, E. Brillì, M. De Fusco, F. Politi, E. Parrini, I. Manfredi, T. Pisano, D. Pruna, G. Curia, C. Cianchetti, M. Pasqualetti, A. Becchetti, R. Guerrini, and G. Casari, *Increased sensitivity of the neuronal nicotinic receptor alpha 2 subunit causes familial epilepsy with nocturnal wandering and ictal fear*. Am J Hum Genet, 2006. 79(2): p. 342-50.
149. Conti, V., P. Aracri, L. Chiti, S. Brusco, F. Mari, C. Marini, M. Albanese, A. Marchi, C. Liguori, F. Placidi, A. Romigi, A. Becchetti, and R. Guerrini, *Nocturnal frontal lobe epilepsy with paroxysmal arousals due to CHRNA2 loss of function*. Neurology, 2015. 84(15): p. 1520-8.
150. De Fusco, M., A. Becchetti, A. Patrignani, G. Annesi, A. Gambardella, A. Quattrone, A. Ballabio, E. Wanke, and G. Casari, *The nicotinic receptor beta 2 subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy*. Nat Genet, 2000. 26(3): p. 275-6.
151. Dibbens, L.M., P.S. Tarpey, K. Hynes, M.A. Bayly, I.E. Scheffer, R. Smith, J. Bomar, E. Sutton, L. Vandeleur, C. Shoubbridge, S. Edkins, S.J. Turner, C. Stevens, S. O'Meara, C. Tofts, S. Barthorpe, G. Buck, J. Cole, K. Halliday, D. Jones, R. Lee, M. Madison, T. Mironenko, J. Varian, S. West, S. Widaa, P. Wray, J. Teague, E. Dicks, A. Butler, A. Menzies, A. Jenkinson, R. Shepherd, J.F. Gusella, Z. Afawi, A. Mazarib, M.Y. Neufeld, S. Kivity, D. Lev, T. Lerman-Sagie, A.D. Korczyn, C.P. Derry, G.R. Sutherland, K. Friend, M. Shaw, M. Corbett, H.G. Kim, D.H. Geschwind, P. Thomas, E. Haan, S. Ryan, S. McKee, S.F. Berkovic, P.A. Futreal, M.R. Stratton, J.C. Mulley, and J. Gecz, *X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment*. Nat Genet, 2008. 40(6): p. 776-81.
152. Vanmolkot, K.R., E.E. Kors, J.J. Hottenga, G.M. Terwindt, J. Haan, W.A. Hoefnagels, D.F. Black, L.A. Sandkuijl, R.R. Frants, M.D. Ferrari, and A.M. van den Maagdenberg, *Novel mutations in the Na⁺, K⁺-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions*. Ann Neurol, 2003. 54(3): p. 360-6.
153. Consortium, E., C. Leu, C.G. de Kovel, F. Zara, P. Striano, M. Pezzella, A. Robbiano, A. Bianchi, F. Bisulli, A. Coppola, A.T. Giallonardo, F. Beccaria, D.K. Trenite, D. Lindhout, V. Gaus, B. Schmitz, D. Janz, Y.G. Weber, F. Becker, H. Lerche, A.A. Kleefuss-Lie, K. Hallman, W.S. Kunz, C.E. Elger, H. Muhle, U. Stephani, R.S. Moller, H. Hjalgrim, S. Mullen, I.E. Scheffer, S.F. Berkovic, K.V. Everett, M.R. Gardiner, C. Marini, R. Guerrini, A.E. Lehesjoki, A. Siren, R. Nabbout, S. Baulac, E. Leguern, J.M. Serratosa, F. Rosenow, M. Feucht, I. Unterberger, A. Covanis, A. Suls, S. Weckhuysen, R. Kaneva, H. Caglayan, D. Turkdogan, B. Baykan, N. Bebek, U. Ozbek, A. Hempelmann, H. Schulz, F. Ruschendorf, H. Trucks, P. Nurnberg, G. Avanzini, B.P. Koeleman, and T. Sander, *Genome-wide linkage meta-analysis identifies*

- susceptibility loci at 2q34 and 13q31.3 for genetic generalized epilepsies.* *Epilepsia*, 2012. 53(2): p. 308-18.
154. Morton, N.E., *Sequential tests for the detection of linkage.* *Am J Hum Genet*, 1955. 7(3): p. 277-318.
155. Feingold, J., *Maladies multifactorielles: un cauchemar pour le généticien.* *Médecine Sciences*, 2005. 21(11): p. 927-933.
156. Bourgain, C. and E. Genin, *Complex trait mapping in isolated populations: Are specific statistical methods required?* *Eur J Hum Genet*, 2005. 13(6): p. 698-706.
157. Myers, C.T. and H.C. Mefford, *Advancing epilepsy genetics in the genomic era.* *Genome Med*, 2015. 7(1): p. 91.
158. Jiang, Y., G.A. Satten, Y. Han, M.P. Epstein, E.L. Heinzen, D.B. Goldstein, and A.S. Allen, *Utilizing population controls in rare-variant case-parent association tests.* *Am J Hum Genet*, 2014. 94(6): p. 845-53.
159. Papandreou, A., A. McTague, N. Trump, G. Ambegaonkar, A. Ngoh, E. Meyer, R.H. Scott, and M.A. Kurian, *GABRB3 mutations: a new and emerging cause of early infantile epileptic encephalopathy.* *Dev Med Child Neurol*, 2015.
160. Dimassi, S., A. Labalme, D. Ville, A. Calender, C. Mignot, N. Boutry-Kryza, J. de Bellescize, C. Rivier-Ringenbach, E. Bourel-Ponchel, D. Cheillan, T. Simonet, K. Maincent, M. Rossi, M. Till, S. Mougou-Zerelli, P. Edery, A. Saad, D. Heron, V. des Portes, D. Sanlaville, and G. Lesca, *Whole-exome sequencing improves the diagnosis yield in sporadic infantile spasm syndrome.* *Clin Genet*, 2016. 89(2): p. 198-204.
161. Epi, K.C., P. Epilepsy Phenome/Genome, A.S. Allen, S.F. Berkovic, P. Cossette, N. Delanty, D. Dlugos, E.E. Eichler, M.P. Epstein, T. Glauser, D.B. Goldstein, Y. Han, E.L. Heinzen, Y. Hitomi, K.B. Howell, M.R. Johnson, R. Kuzniecky, D.H. Lowenstein, Y.F. Lu, M.R. Madou, A.G. Marson, H.C. Mefford, S. Esmaeli Nieh, T.J. O'Brien, R. Ottman, S. Petrovski, A. Poduri, E.K. Ruzzo, I.E. Scheffer, E.H. Sherr, C.J. Yuskaitis, B. Abou-Khalil, B.K. Alldredge, J.F. Bautista, S.F. Berkovic, A. Boro, G.D. Cascino, D. Consalvo, P. Crumrine, O. Devinsky, D. Dlugos, M.P. Epstein, M. Fiol, N.B. Fountain, J. French, D. Friedman, E.B. Geller, T. Glauser, S. Glynn, S.R. Haut, J. Hayward, S.L. Helmers, S. Joshi, A. Kanner, H.E. Kirsch, R.C. Knowlton, E.H. Kossoff, R. Kuperman, R. Kuzniecky, D.H. Lowenstein, S.M. McGuire, P.V. Motika, E.J. Novotny, R. Ottman, J.M. Paolicchi, J.M. Parent, K. Park, A. Poduri, I.E. Scheffer, R.A. Shellhaas, E.H. Sherr, J.J. Shih, R. Singh, J. Sirven, M.C. Smith, J. Sullivan, L. Lin Thio, A. Venkat, E.P. Vining, G.K. Von Allmen, J.L. Weisenberg, P. Widdess-Walsh, and M.R. Winawer, *De novo mutations in epileptic encephalopathies.* *Nature*, 2013. 501(7466): p. 217-21.

162. Lander, E.S. and N.J. Schork, *Genetic dissection of complex traits*. Science, 1994. 265(5181): p. 2037-48.
163. Page, G.P., V. George, R.C. Go, P.Z. Page, and D.B. Allison, "Are we there yet?": *Deciding when one has demonstrated specific genetic causation in complex diseases and quantitative traits*. Am J Hum Genet, 2003. 73(4): p. 711-9.
164. Slatkin, M., *Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future*. Nat Rev Genet, 2008. 9(6): p. 477-85.
165. Tan, N.C., S.E. Heron, I.E. Scheffer, J.T. Pelekanos, J.M. McMahon, D.F. Vears, J.C. Mulley, and S.F. Berkovic, *Failure to confirm association of a polymorphism in ABCB1 with multidrug-resistant epilepsy*. Neurology, 2004. 63(6): p. 1090-2.
166. Buono, R.J., *Genome wide association studies (GWAS) and common forms of human epilepsy*. Epilepsy Behav, 2013. 28 Suppl 1: p. S63-5.
167. Helbig, I. and D.H. Lowenstein, *Genetics of the epilepsies: where are we and where are we going?* Curr Opin Neurol, 2013. 26(2): p. 179-85.
168. Heinzen, E.L., C. Depondt, G.L. Cavalleri, E.K. Ruzzo, N.M. Walley, A.C. Need, D. Ge, M. He, E.T. Cirulli, Q. Zhao, K.D. Cronin, C.E. Gumbs, C.R. Campbell, L.K. Hong, J.M. Maia, K.V. Shianna, M. McCormack, R.A. Radtke, G.D. O'Conner, M.A. Mikati, W.B. Gallentine, A.M. Husain, S.R. Sinha, K. Chinthapalli, R.S. Puranam, J.O. McNamara, R. Ottman, S.M. Sisodiya, N. Delanty, and D.B. Goldstein, *Exome sequencing followed by large-scale genotyping fails to identify single rare variants of large effect in idiopathic generalized epilepsy*. Am J Hum Genet, 2012. 91(2): p. 293-302.
169. Perry, G.H., F. Yang, T. Marques-Bonet, C. Murphy, T. Fitzgerald, A.S. Lee, C. Hyland, A.C. Stone, M.E. Hurles, C. Tyler-Smith, E.E. Eichler, N.P. Carter, C. Lee, and R. Redon, *Copy number variation and evolution in humans and chimpanzees*. Genome Res, 2008. 18(11): p. 1698-710.
170. Caminiti, C.B., D.C. Hesdorffer, S. Shostak, J. Goldsmith, S.T. Sorge, M.R. Winawer, J.C. Phelan, W.K. Chung, and R. Ottman, *Parents' interest in genetic testing of their offspring in multiplex epilepsy families*. Epilepsia, 2016. 57(2): p. 279-87.
171. Freeman, W.M., S.J. Walker, and K.E. Vrana, *Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential*. Biotechniques, 1999. 26(1): p. 112-22, 124-5.
172. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. 25(2): p. 169-93.
173. Malan, V. and S. Romana, *[Diagnosis of chromosomal abnormalities by array CGH in constitutional pathology: the end of the first-line karyotype]*. Arch Pediatr, 2012. 19(4): p. 437-42.

174. Shinawi, M. and S.W. Cheung, *The array CGH and its clinical applications*. Drug Discov Today, 2008. 13(17-18): p. 760-70.
175. Meldrum, C., M.A. Doyle, and R.W. Tothill, *Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective*. Clin Biochem Rev, 2011. 32(4): p. 177-95.
176. Desai, A.N. and A. Jere, *Next-generation sequencing: ready for the clinics?* Clin Genet, 2012. 81(6): p. 503-10.
177. Woollard, P.M., N.A. Mehta, J.J. Vamathevan, S. Van Horn, B.K. Bonde, and D.J. Dow, *The application of next-generation sequencing technologies to drug discovery and development*. Drug Discov Today, 2011. 16(11-12): p. 512-9.
178. Shendure, J. and H. Ji, *Next-generation DNA sequencing*. Nat Biotechnol, 2008. 26(10): p. 1135-45.
179. Bentley, D.R., *The Human Genome Project--an overview*. Med Res Rev, 2000. 20(3): p. 189-96.
180. Brookes, A.J., *The essence of SNPs*. Gene, 1999. 234(2): p. 177-86.
181. Frazer, K.A., S.S. Murray, N.J. Schork, and E.J. Topol, *Human genetic variation and its contribution to complex traits*. Nat Rev Genet, 2009. 10(4): p. 241-51.
182. Sherry, S.T., M.H. Ward, M. Kholodov, J. Baker, L. Phan, E.M. Smigielski, and K. Sirotkin, *dbSNP: the NCBI database of genetic variation*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(1): p. 308-11.
183. Genomes Project, C., G.R. Abecasis, D. Altshuler, A. Auton, L.D. Brooks, R.M. Durbin, R.A. Gibbs, M.E. Hurles, and G.A. McVean, *A map of human genome variation from population-scale sequencing*. Nature, 2010. 467(7319): p. 1061-73.
184. Nicita, F., P. De Liso, F.R. Danti, L. Papetti, F. Ursitti, A. Castronovo, F. Allemand, E. Gennaro, F. Zara, P. Striano, and A. Spalice, *The genetics of monogenic idiopathic epilepsies and epileptic encephalopathies*. Seizure, 2012. 21(1): p. 3-11.
185. Moller, R.S., H.A. Dahl, and I. Helbig, *The contribution of next generation sequencing to epilepsy genetics*. Expert Rev Mol Diagn, 2015. 15(12): p. 1531-8.
186. Heron, S.E., B.E. Grinton, S. Kivity, Z. Afawi, S.M. Zuberi, J.N. Hughes, C. Pridmore, B.L. Hodgson, X. Iona, L.G. Sadleir, J. Pelekanos, E. Herlenius, H. Goldberg-Stern, H. Bassan, E. Haan, A.D. Korczyn, A.E. Gardner, M.A. Corbett, J. Gecz, P.Q. Thomas, J.C. Mulley, S.F. Berkovic, I.E. Scheffer, and L.M. Dibbens, *PRRT2 mutations cause benign familial infantile epilepsy and infantile convulsions with choreoathetosis syndrome*. Am J Hum Genet, 2012. 90(1): p. 152-60.

187. Schubert, J., R. Paravidino, F. Becker, A. Berger, N. Bebek, A. Bianchi, K. Brockmann, G. Capovilla, B. Dalla Bernardina, Y. Fukuyama, G.F. Hoffmann, K. Jurkat-Rott, A.K. Anttonen, G. Kurlermann, A.E. Lehesjoki, F. Lehmann-Horn, M. Mastrangelo, U. Mause, S. Muller, B. Neubauer, B. Pust, D. Rating, A. Robbiano, S. Ruf, C. Schroeder, A. Seidel, N. Specchio, U. Stephani, P. Striano, J. Teichler, D. Turkdogan, F. Vigevano, M. Viri, P. Bauer, F. Zara, H. Lerche, and Y.G. Weber, *PRRT2 mutations are the major cause of benign familial infantile seizures*. Hum Mutat, 2012. 33(10): p. 1439-43.
188. Maini, I., A. Iodice, C. Spagnoli, G.G. Salerno, G. Bertani, D. Frattini, and C. Fusco, *Expanding phenotype of PRRT2 gene mutations: A new case with epilepsy and benign myoclonus of early infancy*. Eur J Paediatr Neurol, 2016.
189. Heron, S.E. and L.M. Dibbens, *Role of PRRT2 in common paroxysmal neurological disorders: a gene with remarkable pleiotropy*. J Med Genet, 2013. 50(3): p. 133-9.
190. Barcia, G., M.R. Fleming, A. Deligniere, V.R. Gazula, M.R. Brown, M. Langouet, H. Chen, J. Kronengold, A. Abhyankar, R. Cilio, P. Nitschke, A. Kaminska, N. Boddaert, J.L. Casanova, I. Desguerre, A. Munnich, O. Dulac, L.K. Kaczmarek, L. Colleaux, and R. Nabbout, *De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy*. Nat Genet, 2012. 44(11): p. 1255-9.
191. Heron, S.E., K.R. Smith, M. Bahlo, L. Nobili, E. Kahana, L. Licchetta, K.L. Oliver, A. Mazarib, Z. Afawi, A. Korczyn, G. Plazzi, S. Petrou, S.F. Berkovic, I.E. Scheffer, and L.M. Dibbens, *Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene KCNT1 cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy*. Nat Genet, 2012. 44(11): p. 1188-90.
192. Kingwell, K., *Genetics: mutations in potassium channel KCNT1-a novel driver of epilepsy pathogenesis*. Nat Rev Neurol, 2012. 8(12): p. 658.
193. Consortium, E., E.M. Consortium, M. Steffens, C. Leu, A.K. Ruppert, F. Zara, P. Striano, A. Robbiano, G. Capovilla, P. Tinuper, A. Gambardella, A. Bianchi, A. La Neve, G. Crichiutti, C.G. de Kovel, D. Kasteleijn-Nolst Trenite, G.J. de Haan, D. Lindhout, V. Gaus, B. Schmitz, D. Janz, Y.G. Weber, F. Becker, H. Lerche, B.J. Steinhoff, A.A. Kleefuss-Lie, W.S. Kunz, R. Surges, C.E. Elger, H. Muhle, S. von Spiczak, P. Ostertag, I. Helbig, U. Stephani, R.S. Moller, H. Hjalgrim, L.M. Dibbens, S. Bellows, K. Oliver, S. Mullen, I.E. Scheffer, S.F. Berkovic, K.V. Everett, M.R. Gardiner, C. Marini, R. Guerrini, A.E. Lehesjoki, A. Siren, M. Guipponi, A. Malafosse, P. Thomas, R. Nabbout, S. Baulac, E. Leguern, R. Guerrero, J.M. Serratosa, P.S. Reif, F. Rosenow, M. Morzinger, M. Feucht, F. Zimprich, C. Kapsner, C.J. Schankin, A. Suls, K. Smets, P. De Jonghe, A. Jordanova, H. Caglayan, Z. Yapici, D.A. Yalcin, B. Baykan, N. Bebek, U. Ozbek, C. Gieger, H.E. Wichmann, T. Balschun, D. Ellinghaus, A. Franke, C. Meesters, T. Becker, T.F. Wienker, A. Hempelmann, H. Schulz, F. Ruschendorf, M. Leber, S.M. Pauck, H. Trucks, M.R. Toliat, P. Nurnberg, G. Avanzini, B.P. Koeleman, and T. Sander, *Genome-wide association analysis of genetic*

- generalized epilepsies implicates susceptibility loci at 1q43, 2p16.1, 2q22.3 and 17q21.32.* Hum Mol Genet, 2012. 21(24): p. 5359-72.
194. Tang, Q.Y., F.F. Zhang, J. Xu, R. Wang, J. Chen, D.E. Logothetis, and Z. Zhang, *Epilepsy-Related Slack Channel Mutants Lead to Channel Over-Activity by Two Different Mechanisms.* Cell Rep, 2016. 14(1): p. 129-39.
 195. International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies. Electronic address, e.-a.u.e.a., *Genetic determinants of common epilepsies: a meta-analysis of genome-wide association studies.* Lancet Neurol, 2014. 13(9): p. 893-903.
 196. Poduri, A., *Meta-Analysis Revives Genome-Wide Association Studies in Epilepsy.* Epilepsy Curr, 2015. 15(3): p. 122-3.
 197. Liu, X., R. Wang, D. Zhou, and Z. Hong, *Feasibility and acceptability of smartphone applications for seizure self-management in China: Questionnaire study among people with epilepsy.* Epilepsy Behav, 2016. 55: p. 57-61.
 198. Jin, Y., C. Zhao, L. Chen, X. Liu, S. Pan, D. Ju, J. Ma, J. Li, and B. Wei, *Identification of novel gene and pathway targets for human epilepsy treatment.* Biol Res, 2016. 49(1): p. 3.
 199. Shetty, A.K. and D. Upadhya, *GABA-ergic cell therapy for epilepsy: Advances, limitations and challenges.* Neurosci Biobehav Rev, 2016. 62: p. 35-47.
 200. Hardies, K., S. Weckhuysen, P. De Jonghe, and A. Suls, *Lessons learned from gene identification studies in Mendelian epilepsy disorders.* Eur J Hum Genet, 2015.
 201. Mefford, H.C., *Clinical Genetic Testing in Epilepsy.* Epilepsy Curr, 2015. 15(4): p. 197-201.
 202. Ottman, R., S. Hirose, S. Jain, H. Lerche, I. Lopes-Cendes, J.L. Noebels, J. Serratosa, F. Zara, and I.E. Scheffer, *Genetic testing in the epilepsies--report of the ILAE Genetics Commission.* Epilepsia, 2010. 51(4): p. 655-70.
 203. Preux, P.M., *[Questionnaire in a study of epilepsy in tropical countries].* Bull Soc Pathol Exot, 2000. 93(4): p. 276-8.
 204. Debrock, C., P.M. Preux, D. Houinato, M. Druet-Cabanac, F. Kassa, C. Adjien, G. Avode, F. Denis, F. Boutros-Toni, and M. Dumas, *Estimation of the prevalence of epilepsy in the Benin region of Zinvie using the capture-recapture method.* Int J Epidemiol, 2000. 29(2): p. 330-5.

205. Kabore, J.K., J.W. Cabore, Z. Melaku, M. Druet-Cabanac, and P.M. Preux, *Epilepsy in a focus of onchocerciasis in Burkina Faso*. *Lancet*, 1996. 347(9004): p. 836.
206. Preux, P.M., F. Tiemagni, L. Fodzo, P. Kandem, P. Ngouafong, F. Ndonko, W. Macharia, L. Dongmo, and M. Dumas, *Antiepileptic therapies in the Mifi Province in Cameroon*. *Epilepsia*, 2000. 41(4): p. 432-9.
207. Druet-Cabanac, M., P.M. Preux, B. Bouteille, P. Bernet-Bernady, J. Dunand, A. Hopkins, G. Yaya, A. Tabo, C. Sartoris, W. Macharia, and M. Dumas, *Onchocerciasis and epilepsy: a matched case-control study in the Central African Republic*. *Am J Epidemiol*, 1999. 149(6): p. 565-70.
208. Traore, H., M. Diagana, C. Debrock, A. Ba, B. Alqad, and P.M. Preux, *[Sociocultural approach to epilepsy in Mauritania]*. *Med Trop (Mars)*, 1998. 58(4): p. 365-8.
209. Preisig, M., B.T. Fenton, M.L. Matthey, A. Berney, and F. Ferrero, *Diagnostic interview for genetic studies (DIGS): inter-rater and test-retest reliability of the French version*. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 1999. 249(4): p. 174-9.
210. Alkhamees, H.A., C.E. Selai, S.D. Shorvon, and A.M. Kanner, *The use of the NDDI-E in Arabic to identify symptoms of depression of moderate or greater severity in people with epilepsy*. *Epilepsy Behav*, 2014. 32: p. 55-8.
211. Micoulaud-Franchi, J.A., G. Barkate, A. Trebuchon-Da Fonseca, L. Vaugier, M. Gavaret, F. Bartolomei, and A. McGonigal, *One step closer to a global tool for rapid screening of major depression in epilepsy: validation of the French NDDI-E*. *Epilepsy Behav*, 2015. 44: p. 11-6.
212. Micoulaud-Franchi, J.A., S. Lagarde, G. Barkate, B. Dufournet, C. Besancon, A. Trebuchon-Da Fonseca, M. Gavaret, F. Bartolomei, F. Bonini, and A. McGonigal, *Rapid detection of generalized anxiety disorder and major depression in epilepsy: Validation of the GAD-7 as a complementary tool to the NDDI-E in a French sample*. *Epilepsy Behav*, 2016. 57(Pt A): p. 211-216.
213. Officiel, J., *Règles de déontologie médicale*. 1992: Algérie.
214. Tadmouri, G.O., P. Nair, T. Obeid, M.T. Al Ali, N. Al Khaja, and H.A. Hamamy, *Consanguinity and reproductive health among Arabs*. *Reprod Health*, 2009. 6: p. 17.
215. Subcommittee on Febrile, S. and P. American Academy of, *Neurodiagnostic evaluation of the child with a simple febrile seizure*. *Pediatrics*, 2011. 127(2): p. 389-94.
216. Juhel, J.C., *La déficience intellectuelle: connaitre, comprendre, intervenir*. Les presses de l'Université de Laval, 1997: p. 395.

217. Tellez-Zenteno, J.F., L. Hernandez-Ronquillo, S. Buckley, R. Zahagun, and S. Rizvi, *A validation of the new definition of drug-resistant epilepsy by the International League Against Epilepsy*. *Epilepsia*, 2014. 55(6): p. 829-34.
218. Chawla, S., S. Aneja, R. Kashyap, and V. Mallika, *Etiology and clinical predictors of intractable epilepsy*. *Pediatr Neurol*, 2002. 27(3): p. 186-91.
219. Guipponi, M., A. Chentouf, K.E. Webling, K. Freimann, A. Crespel, C. Nobile, J.R. Lemke, J. Hansen, T. Dorn, G. Lesca, P. Ryvlin, E. Hirsch, G. Rudolf, D.S. Rosenberg, Y. Weber, F. Becker, I. Helbig, H. Muhle, A. Salzmann, M. Chaouch, M.L. Oubaiche, S. Ziglio, C. Gehrig, F. Santoni, M. Pizzato, U. Langel, and S.E. Antonarakis, *Galanin pathogenic mutations in temporal lobe epilepsy*. *Hum Mol Genet*, 2015. 24(11): p. 3082-91.
220. Zaoui, S. and C. Biemont, *[Frequency of consanguineous unions in the Tlemcen area (West Algeria)]*. *Sante*, 2002. 12(3): p. 289-95.
221. Masri, A. and H. Hamamy, *Clinical and inheritance profile of familial childhood epilepsy in Jordan*. *Seizure*, 2013. 22(6): p. 443-51.
222. Sozmen, V., S. Baybas, A. Dirican, A. Koksall, and M. Ozturk, *Frequency of epilepsies in family members of patients with different epileptic syndromes*. *Eur Neurol*, 2011. 65(1): p. 4-9.
223. Daoud, A.S., A. Batieha, M. Bashtawi, and H. El-Shanti, *Risk factors for childhood epilepsy: a case-control study from Irbid, Jordan*. *Seizure*, 2003. 12(3): p. 171-4.
224. Matuja, W.B., G. Kilonzo, P. Mbena, R.L. Mwango'mbola, P. Wong, P. Goodfellow, and L. Jilek-Aall, *Risk factors for epilepsy in a rural area in Tanzania. A community-based case-control study*. *Neuroepidemiology*, 2001. 20(4): p. 242-7.
225. Mung'ala-Odera, V., S. White, R. Meehan, G.O. Otieno, P. Njuguna, N. Mturi, T. Edwards, B.G. Neville, and C.R. Newton, *Prevalence, incidence and risk factors of epilepsy in older children in rural Kenya*. *Seizure*, 2008. 17(5): p. 396-404.
226. Kanno, S., J.P. Unnikrishnan, T. Santhosh Kumar, P. Sankara Sarma, and K. Radhakrishnan, *Risk factors for epilepsy: a population-based case-control study in Kerala, southern India*. *Epilepsy Behav*, 2009. 16(1): p. 58-63.
227. Nair, R.R. and S.V. Thomas, *Genetic liability to epilepsy in Kerala State, India*. *Epilepsy Res*, 2004. 62(2-3): p. 163-70.
228. Hauser, W.A., J.F. Annegers, and W.A. Rocca, *Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota*. *Mayo Clin Proc*, 1996. 71(6): p. 576-86.

229. Cvetkovska, E., S. Panov, and I. Kuzmanovski, *Clinical genetic study in juvenile myoclonic epilepsy*. *Seizure*, 2014. 23(10): p. 903-5.
230. Magaudda, A., E. Ferlazzo, V.H. Nguyen, and P. Genton, *Unverricht-Lundborg disease, a condition with self-limited progression: long-term follow-up of 20 patients*. *Epilepsia*, 2006. 47(5): p. 860-6.
231. Shahwan, A., M. Farrell, and N. Delanty, *Progressive myoclonic epilepsies: a review of genetic and therapeutic aspects*. *Lancet Neurol*, 2005. 4(4): p. 239-48.
232. Aguglia, U., A. Gambardella, E. Le Piane, D. Messina, R.L. Oliveri, C. Russo, M. Zappia, and A. Quattrone, *Mild non-lesional temporal lobe epilepsy. A common, unrecognized disorder with onset in adulthood*. *Can J Neurol Sci*, 1998. 25(4): p. 282-6.
233. Hamdy, N.A., *Prevalence of epilepsy in primary school children in Elminia city, Egypt*. *Egypt J. Neurol. Psychiat. Neurosurg.*, 2009. 46(1): p. 33-39.
234. Mac, T.L., D.S. Tran, F. Quet, P. Odermatt, P.M. Preux, and C.T. Tan, *Epidemiology, aetiology, and clinical management of epilepsy in Asia: a systematic review*. *Lancet Neurol*, 2007. 6(6): p. 533-43.
235. Preux, P.M. and M. Druet-Cabanac, *Epidemiology and aetiology of epilepsy in sub-Saharan Africa*. *Lancet Neurol*, 2005. 4(1): p. 21-31.
236. Abou-Khalil, B., L. Krei, B. Lazenby, P.A. Harris, J.L. Haines, and P. Hedera, *Familial genetic predisposition, epilepsy localization and antecedent febrile seizures*. *Epilepsy Res*, 2007. 73(1): p. 104-10.
237. Afawi, Z., K.L. Oliver, S. Kivity, A. Mazarib, I. Blatt, M.Y. Neufeld, K.L. Helbig, H. Goldberg-Stern, A.J. Misk, R. Straussberg, S. Walid, M. Mahajnah, T. Lerman-Sagie, B. Ben-Zeev, E. Kahana, R. Masalha, U. Kramer, D. Ekstein, Z. Shorer, R.H. Wallace, M. Mangelsdorf, J.N. MacPherson, G.L. Carvill, H.C. Mefford, G.D. Jackson, I.E. Scheffer, M. Bahlo, J. Gecz, S.E. Heron, M. Corbett, J.C. Mulley, L.M. Dibbens, A.D. Korczyn, and S.F. Berkovic, *Multiplex families with epilepsy: Success of clinical and molecular genetic characterization*. *Neurology*, 2016. 86(8): p. 713-22.
238. Hwang, G., H.S. Kang, S.Y. Park, K.H. Han, and S.H. Kim, *Predictors of unprovoked seizure after febrile seizure: short-term outcomes*. *Brain Dev*, 2015. 37(3): p. 315-21.
239. Chentouf, A., A. Dahdouh, S. Ghomari, M.L. Oubaiche, and M. Chaouch, *Early predictors of intractable epilepsy in Oran, Algeria: A case-control study*. *International Journal of Neurology and Brain Disorders*, 2016. 3(2): p. 1-5.

240. Alfstad, K.A., H. Torgersen, B. Van Roy, E. Hessen, B.H. Hansen, O. Henning, J. Clench-Aas, P. Mowinckel, L. Gjerstad, and M.I. Lossius, *Psychiatric comorbidity in children and youth with epilepsy: An association with executive dysfunction?* *Epilepsy Behav*, 2016. 56: p. 88-94.
241. Keezer, M.R., S.M. Sisodiya, and J.W. Sander, *Comorbidities of epilepsy: current concepts and future perspectives*. *Lancet Neurol*, 2016. 15(1): p. 106-15.
242. Kwong, K.L., D. Lam, S. Tsui, M. Ngan, B. Tsang, and S.M. Lam, *Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Adolescents With Epilepsy*. *Pediatr Neurol*, 2016.
243. Lacey, C.J., M.R. Salzberg, and W.J. D'Souza, *What factors contribute to the risk of depression in epilepsy?-Tasmanian Epilepsy Register Mood Study (TERMS)*. *Epilepsia*, 2016. 57(3): p. 516-22.
244. Su, C.C., M.H. Chi, S.H. Lin, and Y.K. Yang, *Bidirectional association between autism spectrum disorder and epilepsy in child and adolescent patients: a population-based cohort study*. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 2016.
245. Akindele, O.O., *Commentary: Self-mutilation in epilepsy: An unpleasantly, rare phenomenon*. *Neurol India*, 2016. 64(2): p. 335-6.
246. Williams, A.E., J.M. Giust, W.G. Kronenberger, and D.W. Dunn, *Epilepsy and attention-deficit hyperactivity disorder: links, risks, and challenges*. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2016. 12: p. 287-96.
247. Buckley, A.W. and G.L. Holmes, *Epilepsy and Autism*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016.
248. Brandt, C., M. Schoendienst, M. Trentowska, T.W. May, B. Pohlmann-Eden, B. Tuschen-Caffier, M. Schrecke, N. Fueratsch, K. Witte-Boelt, and A. Ebner, *Prevalence of anxiety disorders in patients with refractory focal epilepsy--a prospective clinic based survey*. *Epilepsy Behav*, 2010. 17(2): p. 259-63.
249. Sanchez-Gistau, V., L. Pintor, G. Sugranyes, E. Bailles, M. Carreno, A. Donaire, T. Boget, X. Setoain, N. Bargallo, and J. Rumia, *Prevalence of interictal psychiatric disorders in patients with refractory temporal and extratemporal lobe epilepsy in Spain. A comparative study*. *Epilepsia*, 2010. 51(7): p. 1309-13.
250. Carrozzino, D., D. Marchetti, D. Laino, M. Minna, M.C. Verrocchio, M. Fulcheri, A. Verrotti, and P. Bech, *Anxiety in adolescent epilepsy. A clinimetric analysis*. *Nord J Psychiatry*, 2016: p. 1-6.
251. Fiest, K.M., J. Dykeman, S.B. Patten, S. Wiebe, G.G. Kaplan, C.J. Maxwell, A.G. Bulloch, and N. Jette, *Depression in epilepsy: a systematic review and meta-analysis*. *Neurology*, 2013. 80(6): p. 590-9.

252. Elliott, B. and J. O'Donovan, *Psychiatric disorders*. Cambridge Unive. Press, ed. S. Shorvon, Andermann, F., Guerrini, R., editors. 2011.
253. Verrotti, A., A. Cicconetti, B. Scorrano, D. De Berardis, C. Cotellessa, F. Chiarelli, and F.M. Ferro, *Epilepsy and suicide: pathogenesis, risk factors, and prevention*. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2008. 4(2): p. 365-70.
254. Elliott, B., E. Joyce, and S. Shorvon, *Delusions, illusions and hallucinations in epilepsy: 2. Complex phenomena and psychosis*. *Epilepsy Res*, 2009. 85(2-3): p. 172-86.
255. Sarma, A.K., N. Khandker, L. Kurczewski, and G.M. Brophy, *Medical management of epileptic seizures: challenges and solutions*. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2016. 12: p. 467-85.
256. Galtrey, C.M., M. Mula, and H.R. Cock, *Stress and epilepsy: fact or fiction, and what can we do about it?* *Pract Neurol*, 2016.
257. Im, H.J., S.H. Park, S.H. Baek, M.K. Chu, K.I. Yang, W.J. Kim, and C.H. Yun, *Associations of impaired sleep quality, insomnia, and sleepiness with epilepsy: A questionnaire-based case-control study*. *Epilepsy Behav*, 2016. 57(Pt A): p. 55-59.
258. Kanner, A.M., *Management of psychiatric and neurological comorbidities in epilepsy*. *Nat Rev Neurol*, 2016. 12(2): p. 106-16.
259. Sirven, J.I., *Management of Epilepsy Comorbidities*. Continuum (Minneap Minn), 2016. 22(1 Epilepsy): p. 191-203.
260. Mula, M., *The pharmacological management of psychiatric comorbidities in patients with epilepsy*. *Pharmacol Res*, 2016.
261. Mignot, C., C. von Stulpnagel, C. Nava, D. Ville, D. Sanlaville, G. Lesca, A. Rastetter, B. Gachet, Y. Marie, G.C. Korenke, I. Borggraefe, D. Hoffmann-Zacharska, E. Szczepanik, M. Rudzka-Dybala, U. Yis, H. Caglayan, A. Isapof, I. Marey, E. Panagiotakaki, C. Korff, E. Rossier, A. Riess, S. Beck-Woedl, A. Rauch, C. Zweier, J. Hoyer, A. Reis, M. Mironov, M. Bobylova, K. Mukhin, L. Hernandez-Hernandez, B. Maher, S. Sisodiya, M. Kuhn, D. Glaeser, S. Wechuysen, C.T. Myers, H.C. Mefford, K. Hortnagel, S. Biskup, E.-R.E.S.M.A.E.w.g. Euro, J.R. Lemke, D. Heron, G. Kluger, and C. Depienne, *Genetic and neurodevelopmental spectrum of SYNGAP1-associated intellectual disability and epilepsy*. *J Med Genet*, 2016.
262. Torres, F., M. Barbosa, and P. Maciel, *Recurrent copy number variations as risk factors for neurodevelopmental disorders: critical overview and analysis of clinical implications*. *J Med Genet*, 2016. 53(2): p. 73-90.

263. Heinzen, E.L., R.A. Radtke, T.J. Urban, G.L. Cavalleri, C. Depondt, A.C. Need, N.M. Walley, P. Nicoletti, D. Ge, C.B. Catarino, J.S. Duncan, D. Kasperaviciute, S.K. Tate, L.O. Caboclo, J.W. Sander, L. Clayton, K.N. Linney, K.V. Shianna, C.E. Gumbs, J. Smith, K.D. Cronin, J.M. Maia, C.P. Doherty, M. Pandolfo, D. Leppert, L.T. Middleton, R.A. Gibson, M.R. Johnson, P.M. Matthews, D. Hosford, R. Kalviainen, K. Eriksson, A.M. Kantanen, T. Dorn, J. Hansen, G. Kramer, B.J. Steinhoff, H.G. Wieser, D. Zumsteg, M. Ortega, N.W. Wood, J. Huxley-Jones, M. Mikati, W.B. Gallentine, A.M. Husain, P.G. Buckley, R.L. Stallings, M.V. Podgoreanu, N. Delanty, S.M. Sisodiya, and D.B. Goldstein, *Rare deletions at 16p13.11 predispose to a diverse spectrum of sporadic epilepsy syndromes*. *Am J Hum Genet*, 2010. 86(5): p. 707-18.
264. Sebat, J., B. Lakshmi, D. Malhotra, J. Troge, C. Lese-Martin, T. Walsh, B. Yamrom, S. Yoon, A. Krasnitz, J. Kendall, A. Leotta, D. Pai, R. Zhang, Y.H. Lee, J. Hicks, S.J. Spence, A.T. Lee, K. Puura, T. Lehtimaki, D. Ledbetter, P.K. Gregersen, J. Bregman, J.S. Sutcliffe, V. Jobanputra, W. Chung, D. Warburton, M.C. King, D. Skuse, D.H. Geschwind, T.C. Gilliam, K. Ye, and M. Wigler, *Strong association of de novo copy number mutations with autism*. *Science*, 2007. 316(5823): p. 445-9.
265. Hochstenbach, R., J.E. Buizer-Voskamp, J.A. Vorstman, and R.A. Ophoff, *Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research*. *Cytogenet Genome Res*, 2011. 135(3-4): p. 174-202.
266. Guilmatre, A., C. Dubourg, A.L. Mosca, S. Legallic, A. Goldenberg, V. Drouin-Garraud, V. Layet, A. Rosier, S. Briault, F. Bonnet-Brilhault, F. Laumonnier, S. Odent, G. Le Vacon, G. Joly-Helas, V. David, C. Bendavid, J.M. Pinoit, C. Henry, C. Impallomeni, E. Germano, G. Tortorella, G. Di Rosa, C. Barthelemy, C. Andres, L. Faivre, T. Frebourg, P. Saugier Veber, and D. Campion, *Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation*. *Arch Gen Psychiatry*, 2009. 66(9): p. 947-56.
267. Jabbari, K. and P. Nurnberg, *A genomic view on epilepsy and autism candidate genes*. *Genomics*, 2016.
268. Rosanoff, M.J. and R. Ottman, *Penetrance of LGI1 mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features*. *Neurology*, 2008. 71(8): p. 567-71.
269. Hedera, P., M.A. Blair, E. Andermann, F. Andermann, D. D'Agostino, K.A. Taylor, L. Chahine, M. Pandolfo, Y. Bradford, J.L. Haines, and B. Abou-Khalil, *Familial mesial temporal lobe epilepsy maps to chromosome 4q13.2-q21.3*. *Neurology*, 2007. 68(24): p. 2107-12.
270. Pal, D.K., M. Durner, I. Klotz, E. Dicker, S. Shinnar, S. Resor, J. Cohen, C. Harden, S.L. Moshe, K. Ballaban-Gill, E.B. Bromfield, and D.A. Greenberg, *Complex inheritance*

- and parent-of-origin effect in juvenile myoclonic epilepsy.* Brain Dev, 2006. 28(2): p. 92-8.
271. Berkovic, S.F., N.K. So, and F. Andermann, *Progressive myoclonus epilepsies: clinical and neurophysiological diagnosis.* J Clin Neurophysiol, 1991. 8(3): p. 261-74.
272. Lehesjoki, A.E., *Clinical features and genetics of Unverricht-Lundborg disease.* Adv Neurol, 2002. 89: p. 193-7.
273. Camfield, P. and C. Camfield, *Febrile seizures and genetic epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+).* Epileptic Disord, 2015. 17(2): p. 124-33.
274. Belhedi, N., F. Bena, A. Mrabet, M. Guipponi, C.B. Souissi, H.K. Mrabet, A.B. Elgaaiied, A. Malafosse, and A. Salzmman, *A new locus on chromosome 22q13.31 linked to recessive genetic epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) in a Tunisian consanguineous family.* BMC Genet, 2013. 14: p. 93.
275. Salzmman, A., M. Guipponi, P.J. Lyons, L.D. Fricker, M. Sapio, C. Lambercy, C. Buresi, B. Ouled Amar Bencheikh, F. Lahjouji, R. Ouazzani, A. Crespel, D. Chaigne, and A. Malafosse, *Carboxypeptidase A6 gene (CPA6) mutations in a recessive familial form of febrile seizures and temporal lobe epilepsy and in sporadic temporal lobe epilepsy.* Hum Mutat, 2012. 33(1): p. 124-35.
276. Abouda, H., Y. Hizem, A. Gargouri, C. Depienne, D. Bouteiller, F. Riant, E. Tournier-Lasserre, I. Gourfinkel-An, E. LeGuern, and R. Gouider, *Familial form of typical childhood absence epilepsy in a consanguineous context.* Epilepsia, 2010. 51(9): p. 1889-93.
277. Modell, B. and A. Darr, *Science and society: genetic counselling and customary consanguineous marriage.* Nat Rev Genet, 2002. 3(3): p. 225-9.
278. Anwar, W.A., M. Khyatti, and K. Hemminki, *Consanguinity and genetic diseases in North Africa and immigrants to Europe.* Eur J Public Health, 2014. 24 Suppl 1: p. 57-63.
279. Dahdouh, A., M. Taleb, P. Courtet, B. Semaoune, and A. Malafosse, *Consanguinity, schizophrenia and bipolar disorder.* Annales Médico-Psychologiques, 2013. 171: p. 246-250.
280. Bittles, A.H. and M.L. Black, *Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Consanguinity, human evolution, and complex diseases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107 Suppl 1: p. 1779-86.
281. Hamamy, H., S.E. Antonarakis, L.L. Cavalli-Sforza, S. Temtamy, G. Romeo, L.P. Kate, R.L. Bennett, A. Shaw, A. Megarbane, C. van Duijn, H. Bathija, S. Fokstuen, E. Engel,

- J. Zlotogora, E. Dermitzakis, A. Bottani, S. Dahoun, M.A. Morris, S. Arsenault, M.S. Aglan, M. Ajaz, A. Alkalamchi, D. Alnaqeb, M.K. Alwasiyah, N. Anwer, R. Awwad, M. Bonnefin, P. Corry, L. Gwanmesia, G.A. Karbani, M. Mostafavi, T. Pippucci, E. Ranza-Boscardin, B. Reversade, S.M. Sharif, M.E. Teeuw, and A.H. Bittles, *Consanguineous marriages, pearls and perils: Geneva International Consanguinity Workshop Report*. Genet Med, 2011. 13(9): p. 841-7.
282. Ogunrin, O.A., A. Adeyekun, and P. Adudu, *Etiologies of epilepsy and health-seeking itinerary of patients with epilepsy in a resource poor setting: analysis of 342 Nigerian Africans*. Seizure, 2013. 22(7): p. 572-6.
283. Guekht, A., W.A. Hauser, L. Milchakova, Y. Churillin, A. Shpak, and E. Gusev, *The epidemiology of epilepsy in the Russian Federation*. Epilepsy Res, 2010. 92(2-3): p. 209-18.
284. Pi, X., L. Zhou, L. Cui, A. Liu, J. Zhang, Y. Ma, B. Liu, C. Cai, C. Zhu, T. Zhou, J. Chen, Z. Zhou, C. Wang, L. Li, S. Li, J. Wu, and B. Xiao, *Prevalence and clinical characteristics of active epilepsy in southern Han Chinese*. Seizure, 2014. 23(8): p. 636-40.
285. Osakwe, C., W.M. Otte, and C. Alo, *Epilepsy prevalence, potential causes and social beliefs in Ebonyi State and Benue State, Nigeria*. Epilepsy Res, 2014. 108(2): p. 316-26.
286. Port, K.E. and K.H. Bittles, *A population-based estimate of the prevalence of consanguineous marriage in Western Australia*. Community Genetics, 2001. 4: p. 97-101.
287. Romeo, G. and A.H. Bittles, *Consanguinity in the contemporary world*. Hum Hered, 2014. 77(1-4): p. 6-9.
288. Al-Awadi, S.A., M.A. Moussa, K.K. Naguib, T.I. Farag, A.S. Teebi, M. el-Khalifa, and L. el-Dossary, *Consanguinity among the Kuwaiti population*. Clin Genet, 1985. 27(5): p. 483-6.
289. Al-Gazali, L., H. Hamamy, and S. Al-Arrayad, *Genetic disorders in the Arab world*. BMJ, 2006. 333(7573): p. 831-4.
290. Saedi-Wong, S. and A.R. al-Frayh, *Effects of consanguineous matings on anthropometric measurements of Saudi newborn infants*. Fam Pract, 1989. 6(3): p. 217-20.
291. Talbi, J., A.E. Khadmaoui, A.E.M. Soulaymani, and A.E.A. Chafik, *Etude de la consanguinité dans la population marocaine. Impact sur le profil de la santé*. Antropo, 2007. 15: p. 1-11.

292. Asadi-Pooya, A.A., *Epilepsy and consanguinity in Shiraz, Iran*. Eur J Paediatr Neurol, 2005. 9(6): p. 383-6.
293. Benamer, H.T. and D.G. Grosset, *A systematic review of the epidemiology of epilepsy in Arab countries*. Epilepsia, 2009. 50(10): p. 2301-4.
294. Bourrous, M., I. Elibrahimi, G. Draiss, F. Safini, M. Amine, and M. Bouskraoui, *[Characteristics of the children with epilepsy followed in the Marrakech University Hospital]*. Rev Neurol (Paris), 2010. 166(11): p. 921-6.
295. Choueiri, R.N., M.N. Fayad, A. Farah, and M.A. Mikati, *Classification of epilepsy syndromes and role of genetic factors*. Pediatr Neurol, 2001. 24(1): p. 37-43.
296. Khedr, E.M., O.A. Shawky, M.A. Ahmed, N.A. Elfetoh, G. Al Attar, A.M. Ali, M.R. Kandil, and H. Farweez, *A community based epidemiological study of epilepsy in Assiut Governorate/Egypt*. Epilepsy Res, 2013. 103(2-3): p. 294-302.
297. Cansu, A., A. Serdaroglu, D. Yuksel, V. Dogan, S. Ozkan, T. Hirfanoglu, N. Senbil, K. Gucuyener, S. Soysal, A. Camurdan, and Y.K. Gurer, *Prevalence of some risk factors in children with epilepsy compared to their controls*. Seizure, 2007. 16(4): p. 338-44.
298. Huseyinoglu, N., S. Ozben, E. Arhan, Y. Palanci, and N. Gunes, *Prevalence and risk factors of epilepsy among school children in eastern Turkey*. Pediatr Neurol, 2012. 47(1): p. 13-8.
299. Yemadje, L.P., D. Houinato, F. Boumediene, E.B. Ngoungou, P.M. Preux, and M. Druet-Cabanac, *Prevalence of epilepsy in the 15 years and older in Benin: a door-to-door nationwide survey*. Epilepsy Res, 2012. 99(3): p. 318-26.
300. Lowenstein, D.H., *Epilepsy after head injury: an overview*. Epilepsia, 2009. 50 Suppl 2: p. 4-9.
301. Al Rajeh, S., A. Awada, O. Bademosi, and A. Ogunniyi, *The prevalence of epilepsy and other seizure disorders in an Arab population: a community-based study*. Seizure, 2001. 10(6): p. 410-4.
302. Attia-Romdhane, N., A. Mrabet, and M. Ben Hamida, *Prevalence of epilepsy in Kelibia, Tunisia*. Epilepsia, 1993. 34(6): p. 1028-32.
303. Ramasundrum, V. and C.T. Tan, *Consanguinity and risk of epilepsy*. Neurol Asia, 2004. 9(1): p. 10.
304. Woods, C.G., J. Cox, K. Springell, D.J. Hampshire, M.D. Mohamed, M. McKibbin, R. Stern, F.L. Raymond, R. Sandford, S. Malik Sharif, G. Karbani, M. Ahmed, J. Bond, D.

- Clayton, and C.F. Inglehearn, *Quantification of homozygosity in consanguineous individuals with autosomal recessive disease*. Am J Hum Genet, 2006. 78(5): p. 889-96.
305. Lowenstein, D. and R. Messing, *Epilepsy genetics: yet more exciting news*. Ann Neurol, 2007. 62(6): p. 549-50.
306. Steinlein, O.K., *Genetics and epilepsy*. Dialogues Clin Neurosci, 2008. 10(1): p. 29-38.
307. Weber, Y.G. and H. Lerche, *Genetic mechanisms in idiopathic epilepsies*. Dev Med Child Neurol, 2008. 50(9): p. 648-54.
308. Rudan, I., H. Campbell, A.D. Carothers, N.D. Hastie, and A.F. Wright, *Contribution of consanguinity to polygenic and multifactorial diseases*. Nat Genet, 2006. 38(11): p. 1224-5.
309. Birbeck, G., E. Chomba, M. Atadzhanov, E. Mbewe, and A. Haworth, *The social and economic impact of epilepsy in Zambia: a cross-sectional study*. Lancet Neurol, 2007. 6(1): p. 39-44.
310. Noronha, A.L., M.A. Borges, L.H. Marques, D.M. Zanetta, P.T. Fernandes, H. de Boer, J. Espindola, C.T. Miranda, L. Prilipko, G.S. Bell, J.W. Sander, and L.M. Li, *Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil*. Epilepsia, 2007. 48(5): p. 880-5.
311. Seinfeld, S.A., J.M. Pellock, M.J. Kjeldsen, K.O. Nakken, and L.A. Corey, *Epilepsy After Febrile Seizures: Twins Suggest Genetic Influence*. Pediatr Neurol, 2016. 55: p. 14-6.
312. Lee, S.H., J.H. Byeon, G.H. Kim, B.L. Eun, and S.H. Eun, *Epilepsy in children with a history of febrile seizures*. Korean J Pediatr, 2016. 59(2): p. 74-9.
313. Goldberg-Stern, H., S. Aharoni, Z. Afawi, O. Bennett, S. Appenzeller, M. Pendziwiat, G. Kuhlenbaumer, L. Basel-Vanagaite, A. Shuper, A.D. Korczyn, and I. Helbig, *Broad phenotypic heterogeneity due to a novel SCN1A mutation in a family with genetic epilepsy with febrile seizures plus*. J Child Neurol, 2014. 29(2): p. 221-6.
314. Brunklaus, A. and S.M. Zuberi, *Dravet syndrome--from epileptic encephalopathy to channelopathy*. Epilepsia, 2014. 55(7): p. 979-84.
315. Dravet, C. and H. Oguni, *Dravet syndrome (severe myoclonic epilepsy in infancy)*, in *Handbook of Clinical Neurology*. 2013. p. 627-633.

316. McClelland, S., C.M. Dube, J. Yang, and T.Z. Baram, *Epileptogenesis after prolonged febrile seizures: mechanisms, biomarkers and therapeutic opportunities*. *Neurosci Lett*, 2011. 497(3): p. 155-62.
317. Bowley, C. and M. Kerr, *Epilepsy and intellectual disability*. *J Intellect Disabil Res*, 2000. 44 (Pt 5): p. 529-43.
318. Camfield, C.S. and P.R. Camfield, *Long-term social outcomes for children with epilepsy*. *Epilepsia*, 2007. 48 Suppl 9: p. 3-5.
319. Wakamoto, H., H. Nagao, M. Hayashi, and T. Morimoto, *Long-term medical, educational, and social prognoses of childhood-onset epilepsy: a population-based study in a rural district of Japan*. *Brain Dev*, 2000. 22(4): p. 246-55.
320. Carrascosa-Romero, M.C., J. Suela, B. Alfaro-Ponce, and A.J. Cepillo-Boluda, *[X-chromosome-linked ichthyosis associated to epilepsy, hyperactivity, autism and mental retardation, due to the Xp22.31 microdeletion]*. *Rev Neurol*, 2012. 54(4): p. 241-8.
321. Cassel, A., R. Morris, M. Koutroumanidis, and M. Kopelman, *Forgetting in temporal lobe epilepsy: When does it become accelerated?* *Cortex*, 2016. 78: p. 70-84.
322. Krsek, P., A. Mikulecka, R. Druga, H. Kubova, Z. Hlinak, L. Suchomelova, and P. Mares, *Long-term behavioral and morphological consequences of nonconvulsive status epilepticus in rats*. *Epilepsy Behav*, 2004. 5(2): p. 180-91.
323. Seinfeld, S., H.P. Goodkin, and S. Shinnar, *Status Epilepticus*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016. 6(3).
324. Kazemi, H., S. Hashemi-Fesharaki, S. Razaghi, M. Najafi, P.H. Kolivand, S. Kovac, and A. Gorji, *Intractable epilepsy and craniocerebral trauma: analysis of 163 patients with blunt and penetrating head injuries sustained in war*. *Injury*, 2012. 43(12): p. 2132-5.
325. Lucke-Wold, B.P., L. Nguyen, R.C. Turner, A.F. Logsdon, Y.W. Chen, K.E. Smith, J.D. Huber, R. Matsumoto, C.L. Rosen, E.S. Tucker, and E. Richter, *Traumatic brain injury and epilepsy: Underlying mechanisms leading to seizure*. *Seizure*, 2015. 33: p. 13-23.
326. Park, J.T. and H.T. Chugani, *Post-traumatic epilepsy in children-experience from a tertiary referral center*. *Pediatr Neurol*, 2015. 52(2): p. 174-81.
327. Rao, V.R. and K.L. Parko, *Clinical approach to posttraumatic epilepsy*. *Semin Neurol*, 2015. 35(1): p. 57-63.

328. Pitkanen, A., R. Roivainen, and K. Lukasiuk, *Development of epilepsy after ischaemic stroke*. *Lancet Neurol*, 2015.
329. Osseman, M., *Crises épileptiques et épilepsies d'origine vasculaire : caractéristiques cliniques, électroencéphalographiques et scannographiques*. *Rev Neurol*, 2002. 158(2): p. 256-259.
330. Chen, T.C., Y.Y. Chen, P.Y. Cheng, and C.H. Lai, *The incidence rate of post-stroke epilepsy: a 5-year follow-up study in Taiwan*. *Epilepsy Res*, 2012. 102(3): p. 188-94.
331. Menon, B. and S.D. Shorvon, *Ischaemic stroke in adults and epilepsy*. *Epilepsy Res*, 2009. 87(1): p. 1-11.
332. Annegers, J.F., W.A. Hauser, E. Beghi, A. Nicolosi, and L.T. Kurland, *The risk of unprovoked seizures after encephalitis and meningitis*. *Neurology*, 1988. 38(9): p. 1407-10.
333. Asadi-Pooya, A.A. and M. Doroudchi, *Thalassemia major and consanguinity in Shiraz city, Iran*. *Turk J Haematol*, 2004. 21(3): p. 127-130.
334. Manford, M., Y.M. Hart, J.W. Sander, and S.D. Shorvon, *National General Practice Study of Epilepsy (NGPSE): partial seizure patterns in a general population*. *Neurology*, 1992. 42(10): p. 1911-7.
335. Berkovic, S.F., A. McIntosh, R.A. Howell, A. Mitchell, L.J. Sheffield, and J.L. Hopper, *Familial temporal lobe epilepsy: a common disorder identified in twins*. *Ann Neurol*, 1996. 40(2): p. 227-35.
336. Vadlamudi, L., I.E. Scheffer, and S.F. Berkovic, *Genetics of temporal lobe epilepsy*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2003. 74(10): p. 1359-61.
337. Schulte, U., J.O. Thumfart, N. Klocker, C.A. Sailer, W. Bildl, M. Biniossek, D. Dehn, T. Deller, S. Eble, K. Abbass, T. Wangler, H.G. Knaus, and B. Fakler, *The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1*. *Neuron*, 2006. 49(5): p. 697-706.
338. Boillot, M., C.Y. Lee, C. Allene, E. Leguern, S. Baulac, and N. Rouach, *LGI1 acts presynaptically to regulate excitatory synaptic transmission during early postnatal development*. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 21769.
339. Dibbens, L.M., B. de Vries, S. Donatello, S.E. Heron, B.L. Hodgson, S. Chintawar, D.E. Crompton, J.N. Hughes, S.T. Bellows, K.M. Klein, P.M. Callenbach, M.A. Corbett, A.E. Gardner, S. Kivity, X. Iona, B.M. Regan, C.M. Weller, D. Crimmins, T.J. O'Brien, R. Guerrero-Lopez, J.C. Mulley, F. Dubeau, L. Licchetta, F. Bisulli, P. Cossette, P.Q. Thomas, J. Gecz, J. Serratosa, O.F. Brouwer, F. Andermann, E. Andermann, A.M. van den Maagdenberg, M. Pandolfo, S.F. Berkovic, and I.E. Scheffer, *Mutations in*

- DEPDC5 cause familial focal epilepsy with variable foci.* Nat Genet, 2013. 45(5): p. 546-51.
340. Striano, P., E. Serioli, L. Santulli, I. Manna, A. Labate, E. Dazzo, E. Pasini, A. Gambardella, R. Michelucci, S. Striano, and C. Nobile, *DEPDC5 mutations are not a frequent cause of familial temporal lobe epilepsy.* Epilepsia, 2015. 56(10): p. e168-71.
341. Bar-Peled, L., L. Chantranupong, A.D. Cherniack, W.W. Chen, K.A. Ottina, B.C. Grabiner, E.D. Spear, S.L. Carter, M. Meyerson, and D.M. Sabatini, *A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1.* Science, 2013. 340(6136): p. 1100-6.
342. Picard, F., P. Makrythanasis, V. Navarro, S. Ishida, J. de Bellescize, D. Ville, S. Weckhuysen, E. Fosselle, A. Suls, P. De Jonghe, M. Vasselon Raina, G. Lesca, C. Depienne, I. An-Gourfinkel, M. Vlaicu, M. Baulac, E. Mundwiler, P. Couarch, R. Combi, L. Ferini-Strambi, A. Gambardella, S.E. Antonarakis, E. Leguern, O. Steinlein, and S. Baulac, *DEPDC5 mutations in families presenting as autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy.* Neurology, 2014. 82(23): p. 2101-6.
343. Tatemoto, K., A. Rokaeus, H. Jornvall, T.J. McDonald, and V. Mutt, *Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine.* FEBS Lett, 1983. 164(1): p. 124-8.
344. Lang, R., A.L. Gundlach, and B. Kofler, *The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease.* Pharmacol Ther, 2007. 115(2): p. 177-207.
345. Mechenthaler, I., *Galanin and the neuroendocrine axes.* Cell Mol Life Sci, 2008. 65(12): p. 1826-35.
346. Mazarati, A.M., E. Halaszi, and G. Telegdy, *Anticonvulsive effects of galanin administered into the central nervous system upon the picrotoxin-kindled seizure syndrome in rats.* Brain Res, 1992. 589(1): p. 164-6.
347. Lerner, J.T., R. Sankar, and A.M. Mazarati, *Galanin and epilepsy.* Cell Mol Life Sci, 2008. 65(12): p. 1864-71.
348. Nikitidou, L., M. Torp, L. Fjord-Larsen, P. Kusk, L.U. Wahlberg, and M. Kokaia, *Encapsulated galanin-producing cells attenuate focal epileptic seizures in the hippocampus.* Epilepsia, 2014. 55(1): p. 167-74.
349. Li, H. and R. Durbin, *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform.* Bioinformatics, 2009. 25(14): p. 1754-60.

350. Santoni, F.A., P. Makrythanasis, S. Nikolaev, M. Guipponi, D. Robyr, A. Bottani, and S.E. Antonarakis, *Simultaneous identification and prioritization of variants in familial, de novo, and somatic genetic disorders with VariantMaster*. Genome Res, 2014. 24(2): p. 349-55.
351. Cheng, Y. and W.H. Prusoff, *Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction*. Biochem Pharmacol, 1973. 22(23): p. 3099-108.
352. Chiquet, B.T., A.C. Lidral, S. Stal, J.B. Mulliken, L.M. Moreno, M. Arcos-Burgos, C. Valencia-Ramirez, S.H. Blanton, and J.T. Hecht, *CRISPLD2: a novel NSCLP candidate gene*. Hum Mol Genet, 2007. 16(18): p. 2241-8.
353. Letra, A., R. Menezes, M.E. Cooper, R.F. Fonseca, S. Tropp, M. Govil, J.M. Granjeiro, S.R. Imoehl, M.A. Mansilla, J.C. Murray, E.E. Castilla, I.M. Orioli, A.E. Czeizel, L. Ma, B.T. Chiquet, J.T. Hecht, A.R. Vieira, and M.L. Marazita, *CRISPLD2 variants including a C471T silent mutation may contribute to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate*. Cleft Palate Craniofac J, 2011. 48(4): p. 363-70.
354. Schaefer-Rego, K., H. Dudek, D. Popenoe, Z. Arlin, J.G. Mears, A. Bank, and D. Leibowitz, *CML patients in blast crisis have breakpoints localized to a specific region of the BCR*. Blood, 1987. 70(2): p. 448-55.
355. Abouhamed, M., K. Grobe, I.V. San, S. Thelen, U. Honnert, M.S. Balda, K. Matter, and M. Bahler, *Myosin IXa regulates epithelial differentiation and its deficiency results in hydrocephalus*. Mol Biol Cell, 2009. 20(24): p. 5074-85.
356. Evans, H., M. Baumgartner, J. Shine, and H. Herzog, *Genomic organization and localization of the gene encoding human preprogalanin*. Genomics, 1993. 18(3): p. 473-7.
357. Kakuyama, H., A. Kuwahara, T. Mochizuki, M. Hoshino, and N. Yanaihara, *Role of N-terminal active sites of galanin in neurally evoked circular muscle contractions in the guinea-pig ileum*. Eur J Pharmacol, 1997. 329(1): p. 85-91.
358. Bedecs, K., U. Langel, and T. Bartfai, *Metabolism of galanin and galanin (1-16) in isolated cerebrospinal fluid and spinal cord membranes from rat*. Neuropeptides, 1995. 29(3): p. 137-43.
359. Land, T., U. Langel, and T. Bartfai, *Hypothalamic degradation of galanin(1-29) and galanin(1-16): identification and characterization of the peptidolytic products*. Brain Res, 1991. 558(2): p. 245-50.
360. Alexandris, A., A.K. Liu, R.C. Chang, R.K. Pearce, and S.M. Gentleman, *Differential expression of galanin in the cholinergic basal forebrain of patients with Lewy body disorders*. Acta Neuropathol Commun, 2015. 3(1): p. 77.

361. Jacoby, A.S., Y.J. Hort, G. Constantinescu, J. Shine, and T.P. Iismaa, *Critical role for GALR1 galanin receptor in galanin regulation of neuroendocrine function and seizure activity*. Brain Res Mol Brain Res, 2002. 107(2): p. 195-200.
362. Webling, K., J.L. Groves-Chapman, J. Runesson, I. Saar, A. Lang, R. Sillard, E. Jakovenko, B. Kofler, P.V. Holmes, and U. Langel, *Pharmacological stimulation of GALR but not GALR attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the rat hippocampus*. Neuropeptides, 2015.
363. Freimann, K., K. Kurrikoff, and U. Langel, *Galanin receptors as a potential target for neurological disease*. Expert Opin Ther Targets, 2015. 19(12): p. 1665-76.
364. Zorrilla, E.P., M. Brennan, V. Sabino, X. Lu, and T. Bartfai, *Galanin type 1 receptor knockout mice show altered responses to high-fat diet and glucose challenge*. Physiol Behav, 2007. 91(5): p. 479-85.
365. Blackshear, A., M. Yamamoto, B.J. Anderson, P.V. Holmes, L. Lundstrom, U. Langel, and J.K. Robinson, *Intracerebroventricular administration of galanin or galanin receptor subtype 1 agonist M617 induces c-Fos activation in central amygdala and dorsomedial hypothalamus*. Peptides, 2007. 28(5): p. 1120-4.
366. Gottsch, M.L., H. Zeng, J.G. Hohmann, D. Weinshenker, D.K. Clifton, and R.A. Steiner, *Phenotypic analysis of mice deficient in the type 2 galanin receptor (GALR2)*. Mol Cell Biol, 2005. 25(11): p. 4804-11.
367. Mazarati, A., X. Lu, K. Kilk, U. Langel, C. Wasterlain, and T. Bartfai, *Galanin type 2 receptors regulate neuronal survival, susceptibility to seizures and seizure-induced neurogenesis in the dentate gyrus*. Eur J Neurosci, 2004. 19(12): p. 3235-44.
368. Mazarati, A., L. Lundstrom, U. Sollenberg, D. Shin, U. Langel, and R. Sankar, *Regulation of kindling epileptogenesis by hippocampal galanin type 1 and type 2 receptors: The effects of subtype-selective agonists and the role of G-protein-mediated signaling*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. 318(2): p. 700-8.
369. Bartfai, T., X. Lu, H. Badie-Mahdavi, A.M. Barr, A. Mazarati, X.Y. Hua, T. Yaksh, G. Haberhauer, S.C. Ceide, L. Trembleau, L. Somogyi, L. Krock, and J. Rebeck, Jr., *Galmic, a nonpeptide galanin receptor agonist, affects behaviors in seizure, pain, and forced-swim tests*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(28): p. 10470-5.
370. Blakeman, K.H., J.X. Hao, X.J. Xu, A.S. Jacoby, J. Shine, J.N. Crawley, T. Iismaa, and Z. Wiesenfeld-Hallin, *Hyperalgesia and increased neuropathic pain-like response in mice lacking galanin receptor 1 receptors*. Neuroscience, 2003. 117(1): p. 221-7.
371. Hobson, S.A., F.E. Holmes, N.C. Kerr, R.J. Pope, and D. Wynick, *Mice deficient for galanin receptor 2 have decreased neurite outgrowth from adult sensory neurons and impaired pain-like behaviour*. J Neurochem, 2006. 99(3): p. 1000-10.

372. Liu, H.X. and T. Hokfelt, *The participation of galanin in pain processing at the spinal level*. Trends Pharmacol Sci, 2002. 23(10): p. 468-74.
373. Bailey, K.R., M.N. Pavlova, A.D. Rohde, J.G. Hohmann, and J.N. Crawley, *Galanin receptor subtype 2 (GalR2) null mutant mice display an anxiogenic-like phenotype specific to the elevated plus-maze*. Pharmacol Biochem Behav, 2007. 86(1): p. 8-20.
374. Karlsson, R.M. and A. Holmes, *Galanin as a modulator of anxiety and depression and a therapeutic target for affective disease*. Amino Acids, 2006. 31(3): p. 231-9.
375. Lu, X., A.M. Barr, J.W. Kinney, P. Sanna, B. Conti, M.M. Behrens, and T. Bartfai, *A role for galanin in antidepressant actions with a focus on the dorsal raphe nucleus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(3): p. 874-9.
376. Swanson, C.J., T.P. Blackburn, X. Zhang, K. Zheng, Z.Q. Xu, T. Hokfelt, T.D. Wolinsky, M.J. Konkel, H. Chen, H. Zhong, M.W. Walker, D.A. Craig, C.P. Gerald, and T.A. Branchek, *Anxiolytic- and antidepressant-like profiles of the galanin-3 receptor (Gal3) antagonists SNAP 37889 and SNAP 398299*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(48): p. 17489-94.
377. Soares, F.R., G.P. Silote, A.F. Almeida-Santos, D.C. Aguiar, L.C. Schenberg, and V. Beijamini, *Galanin microinjection into the dorsal periaqueductal gray matter produces paradigm-dependent anxiolytic effects*. Brain Res Bull, 2016. 121: p. 42-47.
378. Millon, C., A. Flores-Burgess, M. Narvaez, D.O. Borroto-Escuela, L. Santin, B. Gago, J.A. Narvaez, K. Fuxe, and Z. Diaz-Cabiale, *Galanin (1-15) enhances the antidepressant effects of the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT: involvement of the raphe-hippocampal 5-HT neuron system*. Brain Struct Funct, 2016.
379. Weinshenker, D. and P.V. Holmes, *Regulation of neurological and neuropsychiatric phenotypes by locus coeruleus-derived galanin*. Brain Res, 2015.
380. Berger, A., R. Lang, K. Moritz, R. Santic, A. Hermann, W. Sperl, and B. Kofler, *Galanin receptor subtype GalR2 mediates apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells*. Endocrinology, 2004. 145(2): p. 500-7.
381. Berger, A., R. Santic, C. Hauser-Kronberger, F.H. Schilling, P. Kogner, M. Ratschek, A. Gamper, N. Jones, W. Sperl, and B. Kofler, *Galanin and galanin receptors in human cancers*. Neuropeptides, 2005. 39(3): p. 353-9.
382. Kanazawa, T., T. Iwashita, P. Kommareddi, T. Nair, K. Misawa, Y. Misawa, Y. Ueda, T. Tono, and T.E. Carey, *Galanin and galanin receptor type 1 suppress proliferation in squamous carcinoma cells: activation of the extracellular signal regulated kinase pathway and induction of cyclin-dependent kinase inhibitors*. Oncogene, 2007. 26(39): p. 5762-71.

383. Mazarati, A.M., H. Liu, U. Soomets, R. Sankar, D. Shin, H. Katsumori, U. Langel, and C.G. Wasterlain, *Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus*. J Neurosci, 1998. 18(23): p. 10070-7.
384. Mazarati, A.M., J.G. Hohmann, A. Bacon, H. Liu, R. Sankar, R.A. Steiner, D. Wynick, and C.G. Wasterlain, *Modulation of hippocampal excitability and seizures by galanin*. J Neurosci, 2000. 20(16): p. 6276-81.
385. Walls, A.B., S.P. Flynn, P.J. West, M.S. Muller, L.K. Bak, G. Bulaj, A. Schousboe, and H.S. White, *The anticonvulsant action of the galanin receptor agonist NAX-5055 involves modulation of both excitatory- and inhibitory neurotransmission*. Epilepsy Res, 2016. 121: p. 55-63.
386. Zini, S., M.P. Roisin, U. Langel, T. Bartfai, and Y. Ben-Ari, *Galanin reduces release of endogenous excitatory amino acids in the rat hippocampus*. Eur J Pharmacol, 1993. 245(1): p. 1-7.
387. Mennicken, F., C. Hoffert, M. Pelletier, S. Ahmad, and D. O'Donnell, *Restricted distribution of galanin receptor 3 (GalR3) mRNA in the adult rat central nervous system*. J Chem Neuroanat, 2002. 24(4): p. 257-68.
388. McColl, C.D., A.S. Jacoby, J. Shine, T.P. Iismaa, and J.M. Bekkers, *Galanin receptor-1 knockout mice exhibit spontaneous epilepsy, abnormal EEGs and altered inhibition in the hippocampus*. Neuropharmacology, 2006. 50(2): p. 209-18.
389. Schauwecker, P.E., *Galanin receptor 1 deletion exacerbates hippocampal neuronal loss after systemic kainate administration in mice*. PLoS One, 2010. 5(12): p. e15657.
390. Lu, X., E. Roberts, F. Xia, M. Sanchez-Alavez, T. Liu, R. Baldwin, S. Wu, J. Chang, C.G. Wasterlain, and T. Bartfai, *GalR2-positive allosteric modulator exhibits anticonvulsant effects in animal models*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(34): p. 15229-34.
391. Tellez-Zenteno, J.F. and L. Hernandez-Ronquillo, *A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy*. Epilepsy Res Treat, 2012. 2012: p. 630853.
392. Kanter-Schlifke, I., A. Toft Sorensen, M. Ledri, E. Kuteeva, T. Hokfelt, and M. Kokaia, *Galanin gene transfer curtails generalized seizures in kindled rats without altering hippocampal synaptic plasticity*. Neuroscience, 2007. 150(4): p. 984-92.
393. Chang, Y.T., P.C. Chen, I.J. Tsai, F.C. Sung, Z.N. Chin, H.T. Kuo, C.H. Tsai, and I.C. Chou, *Bidirectional relation between schizophrenia and epilepsy: a population-based retrospective cohort study*. Epilepsia, 2011. 52(11): p. 2036-42.

394. Qin, P., H. Xu, T.M. Laursen, M. Vestergaard, and P.B. Mortensen, *Risk for schizophrenia and schizophrenia-like psychosis among patients with epilepsy: population based cohort study*. *BMJ*, 2005. 331(7507): p. 23.
395. Nebel, R.A., D. Zhao, E. Pedrosa, J. Kirschen, H.M. Lachman, D. Zheng, and B.S. Abrahams, *Reduced CYFIP1 in Human Neural Progenitors Results in Dysregulation of Schizophrenia and Epilepsy Gene Networks*. *PLoS One*, 2016. 11(1): p. e0148039.
396. Caviness, V.S., Jr. and P. Rakic, *Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice*. *Annu Rev Neurosci*, 1978. 1: p. 297-326.
397. Del Rio, J.A., B. Heimrich, V. Borrell, E. Forster, A. Drakew, S. Alcantara, K. Nakajima, T. Miyata, M. Ogawa, K. Mikoshiba, P. Derer, M. Frotscher, and E. Soriano, *A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections*. *Nature*, 1997. 385(6611): p. 70-4.
398. Ross, C.A., R.L. Margolis, S.A. Reading, M. Pletnikov, and J.T. Coyle, *Neurobiology of schizophrenia*. *Neuron*, 2006. 52(1): p. 139-53.
399. Cardno, A.G. and Gottesman, II, *Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics*. *Am J Med Genet*, 2000. 97(1): p. 12-7.
400. Guermouche, A.D., M. Taleb, L. Blecha, and A. Benyamina, *Genetics and psychotic disorders: A fresh look at consanguinity*. *Eur J Med Genet*, 2015.
401. Mendez, M.F., R. Grau, R.C. Doss, and J.L. Taylor, *Schizophrenia in epilepsy: seizure and psychosis variables*. *Neurology*, 1993. 43(6): p. 1073-7.
402. Trimble, M., *The relationship between epilepsy and schizophrenia: a biochemical hypothesis*. *Biol Psychiatry*, 1977. 12(2): p. 299-304.
403. Fruchter, E., O. Kapara, A. Reichenberg, R. Yoffe, O. Fono-Yativ, Y. Kreiss, M. Davidson, and M. Weiser, *Longitudinal association between epilepsy and schizophrenia: a population-based study*. *Epilepsy Behav*, 2014. 31: p. 291-4.
404. Lindsay, J., C. Ounsted, and P. Richards, *Long-term outcome in children with temporal lobe seizures. III: Psychiatric aspects in childhood and adult life*. *Dev Med Child Neurol*, 1979. 21(5): p. 630-6.
405. Cascella, N.G., D.J. Schretlen, and A. Sawa, *Schizophrenia and epilepsy: is there a shared susceptibility?* *Neurosci Res*, 2009. 63(4): p. 227-35.
406. Kesim, Y.F., G.A. Uzun, E. Yucesan, F.N. Tuncer, O. Ozdemir, N. Bebek, U. Ozbek, S.A. Iseri, and B. Baykan, *Screening LGI1 in a cohort of 26 lateral temporal lobe epilepsy*

- patients with auditory aura from Turkey detects a novel de novo mutation.* Epilepsy Res, 2016. 120: p. 73-8.
407. Friedman, J.I., T. Vrijenhoek, S. Markx, I.M. Janssen, W.A. van der Vliet, B.H. Faas, N.V. Knoers, W. Cahn, R.S. Kahn, L. Edelmann, K.L. Davis, J.M. Silverman, H.G. Brunner, A.G. van Kessel, C. Wijmenga, R.A. Ophoff, and J.A. Veltman, *CNTNAP2 gene dosage variation is associated with schizophrenia and epilepsy.* Mol Psychiatry, 2008. 13(3): p. 261-6.
408. Rodenas-Cuadrado, P., N. Pietrafusa, T. Francavilla, A. La Neve, P. Striano, and S.C. Vernes, *Characterisation of CASPR2 deficiency disorder - a syndrome involving autism, epilepsy and language impairment.* BMC Med Genet, 2016. 17(1): p. 8.
409. Alcantara, S., M. Ruiz, G. D'Arcangelo, F. Ezan, L. de Lecea, T. Curran, C. Sotelo, and E. Soriano, *Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse.* J Neurosci, 1998. 18(19): p. 7779-99.
410. Pesold, C., F. Impagnatiello, M.G. Pisu, D.P. Uzunov, E. Costa, A. Guidotti, and H.J. Caruncho, *Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(6): p. 3221-6.
411. Finkbeiner, S., S.F. Tavazoie, A. Maloratsky, K.M. Jacobs, K.M. Harris, and M.E. Greenberg, *CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses.* Neuron, 1997. 19(5): p. 1031-47.
412. Teixeira, C.M., M.M. Kron, N. Masachs, H. Zhang, D.C. Lagace, A. Martinez, I. Reillo, X. Duan, C. Bosch, L. Pujadas, L. Brunso, H. Song, A.J. Eisch, V. Borrell, B.W. Howell, J.M. Parent, and E. Soriano, *Cell-autonomous inactivation of the reelin pathway impairs adult neurogenesis in the hippocampus.* J Neurosci, 2012. 32(35): p. 12051-65.
413. D'Arcangelo, G., G.G. Miao, S.C. Chen, H.D. Soares, J.I. Morgan, and T. Curran, *A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler.* Nature, 1995. 374(6524): p. 719-23.
414. Fatemi, S.H., *Reelin mutations in mouse and man: from reeler mouse to schizophrenia, mood disorders, autism and lissencephaly.* Mol Psychiatry, 2001. 6(2): p. 129-33.
415. Willemsen, M.H., L.E. Vissers, and M. Willemsen, *Mutations in DYNC1H1 cause severe intellectual disability with neuronal migration defects.* J Med Genet, 2012. 49: p. 179-183.

416. Fatemi, S.H., A.V. Snow, J.M. Stary, M. Araghi-Niknam, T.J. Reutiman, S. Lee, A.I. Brooks, and D.A. Pearce, *Reelin signaling is impaired in autism*. *Biol Psychiatry*, 2005. 57(7): p. 777-87.
417. Liu, J.S., *Molecular genetics of neuronal migration disorders*. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2011. 11(2): p. 171-8.
418. Fatemi, S.H., J.L. Kroll, and J.M. Stary, *Altered levels of Reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders*. *Neuroreport*, 2001. 12(15): p. 3209-15.
419. Imai, H., H. Shoji, M. Ogata, Y. Kagawa, Y. Owada, T. Miyakawa, K. Sakimura, T. Terashima, and Y. Katsuyama, *Dorsal Forebrain-Specific Deficiency of Reelin-Dab1 Signal Causes Behavioral Abnormalities Related to Psychiatric Disorders*. *Cereb Cortex*, 2016.
420. Hoppeler-Lebel, A., C. Celati, G. Bellett, M.M. Mogensen, L. Klein-Hitpass, M. Bornens, and A.M. Tassin, *Centrosomal CAP350 protein stabilises microtubules associated with the Golgi complex*. *J Cell Sci*, 2007. 120(Pt 18): p. 3299-308.
421. Stacey, M., H.H. Lin, K.L. Hilyard, S. Gordon, and A.J. McKnight, *Human epidermal growth factor (EGF) module-containing mucin-like hormone receptor 3 is a new member of the EGF-TM7 family that recognizes a ligand on human macrophages and activated neutrophils*. *J Biol Chem*, 2001. 276(22): p. 18863-70.
422. Bar, I., C. Lambert De Rouvroit, I. Royaux, D.B. Krizman, C. Deroncourt, D. Ruelle, M.C. Beckers, and A.M. Goffinet, *A YAC contig containing the reeler locus with preliminary characterization of candidate gene fragments*. *Genomics*, 1995. 26(3): p. 543-9.
423. Hirotsune, S., T. Takahara, N. Sasaki, K. Hirose, A. Yoshiki, T. Ohashi, M. Kusakabe, Y. Murakami, M. Muramatsu, S. Watanabe, and et al., *The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons*. *Nat Genet*, 1995. 10(1): p. 77-83.
424. Fatemi, S.H., *Reelin glycoprotein: structure, biology and roles in health and disease*. *Mol Psychiatry*, 2005. 10(3): p. 251-7.
425. Dazzo, E., M. Fanciulli, E. Serioli, G. Minervini, P. Pulitano, S. Binelli, C. Di Bonaventura, C. Luisi, E. Pasini, S. Striano, P. Striano, G. Coppola, A. Chiavegato, S. Radovic, A. Spadotto, S. Uzzau, A. La Neve, A.T. Giallonardo, O. Mecarelli, S.C. Tosatto, R. Ottman, R. Michelucci, and C. Nobile, *Heterozygous reelin mutations cause autosomal-dominant lateral temporal epilepsy*. *Am J Hum Genet*, 2015. 96(6): p. 992-1000.
426. Chai, X., S. Zhao, L. Fan, W. Zhang, X. Lu, H. Shao, S. Wang, L. Song, A.V. Failla, B. Zobiak, H.G. Mannherz, and M. Frotscher, *Reelin and cofilin cooperate during the*

- migration of cortical neurons: A quantitative morphological analysis.* Development, 2016.
427. Manoharan, M., S.A. Muhammad, and R. Sowdhamini, *Sequence Analysis and Evolutionary Studies of Reelin Proteins.* Bioinform Biol Insights, 2015. 9: p. 187-93.
428. Goffinet, A.M., *Events governing organization of postmigratory neurons: studies on brain development in normal and reeler mice.* Brain Res, 1984. 319(3): p. 261-96.
429. Goffinet, A.M., *The reeler gene: a clue to brain development and evolution.* Int J Dev Biol, 1992. 36(1): p. 101-7.
430. Negron-Oyarzo, I., A. Lara-Vasquez, I. Palacios-Garcia, P. Fuentealba, and F. Aboitiz, *Schizophrenia and reelin: a model based on prenatal stress to study epigenetics, brain development and behavior.* Biol Res, 2016. 49(1): p. 16.
431. Folsom, T.D. and S.H. Fatemi, *The involvement of Reelin in neurodevelopmental disorders.* Neuropharmacology, 2013. 68: p. 122-35.
432. Pantazopoulos, H. and S. Berretta, *In Sickness and in Health: Perineuronal Nets and Synaptic Plasticity in Psychiatric Disorders.* Neural Plast, 2016. 2016: p. 9847696.
433. Feher, A., A. Juhasz, M. Pakaski, J. Kalman, and Z. Janka, *Genetic analysis of the RELN gene: Gender specific association with Alzheimer's disease.* Psychiatry Res, 2015. 230(2): p. 716-8.
434. Guidotti, A., J. Auta, J.M. Davis, V. Di-Giorgi-Gerevini, Y. Dwivedi, D.R. Grayson, F. Impagnatiello, G. Pandey, C. Pesold, R. Sharma, D. Uzunov, and E. Costa, *Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study.* Arch Gen Psychiatry, 2000. 57(11): p. 1061-9.
435. Impagnatiello, F., A.R. Guidotti, C. Pesold, Y. Dwivedi, H. Caruncho, M.G. Pisu, D.P. Uzunov, N.R. Smalheiser, J.M. Davis, G.N. Pandey, G.D. Pappas, P. Tueting, R.P. Sharma, and E. Costa, *A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(26): p. 15718-23.
436. Carboni, G., P. Tueting, L. Tremolizzo, I. Sugaya, J. Davis, E. Costa, and A. Guidotti, *Enhanced dizocilpine efficacy in heterozygous reeler mice relates to GABA turnover downregulation.* Neuropharmacology, 2004. 46(8): p. 1070-81.
437. Tueting, P., E. Costa, Y. Dwivedi, A. Guidotti, F. Impagnatiello, R. Manev, and C. Pesold, *The phenotypic characteristics of heterozygous reeler mouse.* Neuroreport, 1999. 10(6): p. 1329-34.

438. Owens, E.M., P. Bachman, D.C. Glahn, and C.E. Bearden, *Electrophysiological Endophenotypes for Schizophrenia*. Harv Rev Psychiatry, 2016. 24(2): p. 129-47.
439. Zheutlin, A.B., R.W. Viehman, R. Fortgang, J. Borg, D.J. Smith, J. Suvisaari, S. Therman, C.M. Hultman, and T.D. Cannon, *Cognitive endophenotypes inform genome-wide expression profiling in schizophrenia*. Neuropsychology, 2016. 30(1): p. 40-52.
440. Wedenoja, J., A. Loukola, A. Tuulio-Henriksson, T. Paunio, J. Ekelund, K. Silander, T. Varilo, K. Heikkila, J. Suvisaari, T. Partonen, J. Lonnqvist, and L. Peltonen, *Replication of linkage on chromosome 7q22 and association of the regional Reelin gene with working memory in schizophrenia families*. Mol Psychiatry, 2008. 13(7): p. 673-84.
441. Gregorio, S.P., P.C. Sallet, K.A. Do, E. Lin, W.F. Gattaz, and E. Dias-Neto, *Polymorphisms in genes involved in neurodevelopment may be associated with altered brain morphology in schizophrenia: preliminary evidence*. Psychiatry Res, 2009. 165(1-2): p. 1-9.
442. Shifman, S., M. Johannesson, M. Bronstein, S.X. Chen, D.A. Collier, N.J. Craddock, K.S. Kendler, T. Li, M. O'Donovan, F.A. O'Neill, M.J. Owen, D. Walsh, D.R. Weinberger, C. Sun, J. Flint, and A. Darvasi, *Genome-wide association identifies a common variant in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women*. PLoS Genet, 2008. 4(2): p. e28.
443. Kuang, W.J., R.F. Sun, Y.S. Zhu, and S.B. Li, *A new single-nucleotide mutation (rs362719) of the reelin (RELN) gene associated with schizophrenia in female Chinese Han*. Genet Mol Res, 2011. 10(3): p. 1650-8.
444. Hong, S.E., Y.Y. Shugart, D.T. Huang, S.A. Shahwan, P.E. Grant, J.O. Hourihane, N.D. Martin, and C.A. Walsh, *Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations*. Nat Genet, 2000. 26(1): p. 93-6.
445. Chang, B.S., F. Duzcan, S. Kim, M. Cinbis, A. Aggarwal, K.A. Apse, O. Ozdel, M. Atmaca, S. Zencir, H. Bagci, and C.A. Walsh, *The role of RELN in lissencephaly and neuropsychiatric disease*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2007. 144B(1): p. 58-63.
446. Zaki, M., M. Shehab, A.A. El-Aleem, G. Abdel-Salam, H.B. Koeller, Y. Ilkin, M.E. Ross, W.B. Dobyns, and J.G. Gleeson, *Identification of a novel recessive RELN mutation using a homozygous balanced reciprocal translocation*. Am J Med Genet A, 2007. 143A(9): p. 939-44.
447. Kobow, K., I. Jeske, M. Hildebrandt, J. Hauke, E. Hahnen, R. Buslei, M. Buchfelder, D. Weigel, H. Stefan, B. Kasper, E. Pauli, and I. Blumcke, *Increased reelin promoter*

- methylation is associated with granule cell dispersion in human temporal lobe epilepsy.* J Neuropathol Exp Neurol, 2009. 68(4): p. 356-64.
448. Grayson, D.R., X. Jia, Y. Chen, R.P. Sharma, C.P. Mitchell, A. Guidotti, and E. Costa, *Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(26): p. 9341-6.
449. Zhou, Q., E.A. Obana, K.L. Radomski, G. Sukumar, C. Wynder, C.L. Dalgard, and M.L. Doughty, *Inhibition of the histone demethylase Kdm5b promotes neurogenesis and derepresses Reln (reelin) in neural stem cells from the adult subventricular zone of mice.* Mol Biol Cell, 2016. 27(4): p. 627-39.
450. Hellebrekers, D.M., A.W. Griffioen, and M. van Engeland, *Dual targeting of epigenetic therapy in cancer.* Biochim Biophys Acta, 2007. 1775(1): p. 76-91.
451. Phiel, C.J., F. Zhang, E.Y. Huang, M.G. Guenther, M.A. Lazar, and P.S. Klein, *Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen.* J Biol Chem, 2001. 276(39): p. 36734-41.
452. Grayson, D.R., Y. Chen, E. Costa, E. Dong, A. Guidotti, M. Kundakovic, and R.P. Sharma, *The human reelin gene: transcription factors (+), repressors (-) and the methylation switch (+/-) in schizophrenia.* Pharmacol Ther, 2006. 111(1): p. 272-86.
453. Genton, P., *[Unverricht-Lundborg disease (PME1)].* Rev Neurol (Paris), 2006. 162(8-9): p. 819-26.
454. Moulard, B., F. Darcel, D. Mignard, M. Jeanpierre, P. Genton, F. Cartault, J. Yaouanq, A. Roubertie, A. Biraben, C. Buresi, and A. Malafosse, *F0under effect in patients with Unverricht-Lundborg disease on reunion island.* Epilepsia, 2003. 44(10): p. 1357-60.
455. de Siqueira, L.F., *Progressive myoclonic epilepsies: review of clinical, molecular and therapeutic aspects.* J Neurol, 2010. 257(10): p. 1612-9.
456. Pennacchio, L.A., A.E. Lehesjoki, N.E. Stone, V.L. Willour, K. Virtaneva, J. Miao, E. D'Amato, L. Ramirez, M. Faham, M. Koskiniemi, J.A. Warrington, R. Norio, A. de la Chapelle, D.R. Cox, and R.M. Myers, *Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1).* Science, 1996. 271(5256): p. 1731-4.
457. Lehesjoki, A.E., M. Koskiniemi, P. Sistonen, J. Miao, J. Hastbacka, R. Norio, and A. de la Chapelle, *Localization of a gene for progressive myoclonus epilepsy to chromosome 21q22.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(9): p. 3696-9.

458. Lalioti, M.D., S.E. Antonarakis, and H.S. Scott, *The epilepsy, the protease inhibitor and the dodecamer: progressive myoclonus epilepsy, cystatin b and a 12-mer repeat expansion*. Cytogenet Genome Res, 2003. 100(1-4): p. 213-23.
459. Lalioti, M.D., M. Mirotsoou, C. Buresi, M.C. Peitsch, C. Rossier, R. Ouazzani, M. Baldy-Moulinier, A. Bottani, A. Malafosse, and S.E. Antonarakis, *Identification of mutations in cystatin B, the gene responsible for the Unverricht-Lundborg type of progressive myoclonus epilepsy (EPM1)*. Am J Hum Genet, 1997. 60(2): p. 342-51.
460. Lalioti, M.D., H.S. Scott, C. Buresi, C. Rossier, A. Bottani, M.A. Morris, A. Malafosse, and S.E. Antonarakis, *Dodecamer repeat expansion in cystatin B gene in progressive myoclonus epilepsy*. Nature, 1997. 386(6627): p. 847-51.
461. Borel, C., E. Migliavacca, A. Letourneau, M. Gagnebin, F. Bena, M.R. Sailani, E.T. Dermitzakis, A.J. Sharp, and S.E. Antonarakis, *Tandem repeat sequence variation as causative cis-eQTLs for protein-coding gene expression variation: the case of CSTB*. Hum Mutat, 2012. 33(8): p. 1302-9.
462. Lalioti, M.D., H.S. Scott, and S.E. Antonarakis, *What is expanded in progressive myoclonus epilepsy?* Nat Genet, 1997. 17(1): p. 17.
463. Berkovic, S.F., A. Mazarib, S. Walid, M.Y. Neufeld, J. Manelis, Y. Nevo, A.D. Korczyn, J. Yin, L. Xiong, M. Pandolfo, J.C. Mulley, and R.H. Wallace, *A new clinical and molecular form of Unverricht-Lundborg disease localized by homozygosity mapping*. Brain, 2005. 128(Pt 3): p. 652-8.
464. Saadah, M., M. El Beshari, L. Saadah, H. Hamdallah, Z. Alloub, A.A. Al Zaabi, A. Ben-Mussa, and A. Ben-Nour, *Progressive myoclonic epilepsy type 1: Report of an Emirati family and literature review*. Epilepsy Behav Case Rep, 2014. 2: p. 112-7.
465. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res, 1988. 16(3): p. 1215.
466. Moulard, B., P. Genton, D. Grid, M. Jeanpierre, R. Ouazzani, A. Mrabet, M. Morris, E. LeGuern, C. Dravet, F. Mauguier, B. Utermann, M. Baldy-Moulinier, H. Belaidi, F. Bertran, A. Biraben, A. Ali Cherif, T. Chkili, A. Crespel, F. Darcel, O. Dulac, C. Geny, V. Humbert-Claude, P. Kassiotis, C. Buresi, and A. Malafosse, *Haplotype study of West European and North African Unverricht-Lundborg chromosomes: evidence for a few founder mutations*. Hum Genet, 2002. 111(3): p. 255-62.
467. Hypponen, J., M. Aikia, T. Joensuu, P. Julkunen, N. Danner, P. Koskenkorva, R. Vanninen, A.E. Lehesjoki, E. Mervaala, and R. Kalviainen, *Refining the phenotype of Unverricht-Lundborg disease (EPM1): a population-wide Finnish study*. Neurology, 2015. 84(15): p. 1529-36.

468. Kalviainen, R., J. Khyuppenen, P. Koskenkorva, K. Eriksson, R. Vanninen, and E. Mervaala, *Clinical picture of EPM1-Unverricht-Lundborg disease*. *Epilepsia*, 2008. 49(4): p. 549-56.
469. Haltia, M., K. Kristensson, and P. Sourander, *Neuropathological studies in three Scandinavian cases of progressive myoclonus epilepsy*. *Acta Neurol Scand*, 1969. 45(1): p. 63-77.
470. Marsden, C.D., A.E. Harding, J.A. Obeso, and C.S. Lu, *Progressive myoclonic ataxia (the Ramsay Hunt syndrome)*. *Arch Neurol*, 1990. 47(10): p. 1121-5.
471. Ferlazzo, E., A. Magaudda, P. Striano, N. Vi-Hong, S. Serra, and P. Genton, *Long-term evolution of EEG in Unverricht-Lundborg disease*. *Epilepsy Res*, 2007. 73(3): p. 219-27.
472. Korja, M., V. Kaasinen, S. Lamusuo, R.J. Marttila, and R. Parkkola, *Hyperostosis frontalis interna as a novel finding in Unverricht-Lundborg disease*. *Neurology*, 2007. 68(13): p. 1077-8.
473. Joensuu, T., A.E. Lehesjoki, and O. Kopra, *Molecular background of EPM1-Unverricht-Lundborg disease*. *Epilepsia*, 2008. 49(4): p. 557-63.
474. Malafosse, A., A.E. Lehesjoki, P. Genton, P. Labauge, G. Durand, C.A. Tassinari, C. Dravet, R. Michelucci, and A. de la Chapelle, *Identical genetic locus for Baltic and Mediterranean myoclonus*. *Lancet*, 1992. 339(8801): p. 1080-1.
475. Virtaneva, K., J. Miao, A.L. Traskelin, N. Stone, J.A. Warrington, J. Weissenbach, R.M. Myers, D.R. Cox, P. Sistonen, A. de la Chapelle, and et al., *Progressive myoclonus epilepsy EPM1 locus maps to a 175-kb interval in distal 21q*. *Am J Hum Genet*, 1996. 58(6): p. 1247-53.
476. Lalioti, M.D., H.S. Scott, P. Genton, D. Grid, R. Ouazzani, A. M'Rabet, S. Ibrahim, R. Gouider, C. Dravet, T. Chkili, A. Bottani, C. Buresi, A. Malafosse, and S.E. Antonarakis, *A PCR amplification method reveals instability of the dodecamer repeat in progressive myoclonus epilepsy (EPM1) and no correlation between the size of the repeat and age at onset*. *Am J Hum Genet*, 1998. 62(4): p. 842-7.
477. Mazarib, A., L. Xiong, M.Y. Neufeld, M. Birnbaum, A.D. Korczyn, M. Pandolfo, and S.F. Berkovic, *Unverricht-Lundborg disease in a five-generation Arab family: instability of dodecamer repeats*. *Neurology*, 2001. 57(6): p. 1050-4.
478. Duarte, A.J., D. Ribeiro, J. Chaves, and O. Amaral, *Characterization of a rare Unverricht-Lundborg disease mutation*. *Mol Genet Metab Rep*, 2015. 4: p. 68-71.
479. Bassuk, A.G., R.H. Wallace, A. Buhr, A.R. Buller, Z. Afawi, M. Shimojo, S. Miyata, S. Chen, P. Gonzalez-Alegre, H.L. Griesbach, S. Wu, M. Nashelsky, E.K. Vladar, D. Antic,

- P.J. Ferguson, S. Cirak, T. Voit, M.P. Scott, J.D. Axelrod, C. Gurnett, A.S. Daoud, S. Kivity, M.Y. Neufeld, A. Mazarib, R. Strausberg, S. Walid, A.D. Korczyn, D.C. Slusarski, S.F. Berkovic, and H.I. El-Shanti, *A homozygous mutation in human PRICKLE1 causes an autosomal-recessive progressive myoclonus epilepsy-ataxia syndrome*. Am J Hum Genet, 2008. 83(5): p. 572-81.
480. Berkovic, S.F., L.M. Dibbens, A. Oshlack, J.D. Silver, M. Katerelos, D.F. Vears, R. Lullmann-Rauch, J. Blanz, K.W. Zhang, J. Stankovich, R.M. Kalnins, J.P. Dowling, E. Andermann, F. Andermann, E. Faldini, R. D'Hooge, L. Vadlamudi, R.A. Macdonell, B.L. Hodgson, M.A. Bayly, J. Savige, J.C. Mulley, G.K. Smyth, D.A. Power, P. Saftig, and M. Bahlo, *Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis*. Am J Hum Genet, 2008. 82(3): p. 673-84.
481. Lieuallen, K., L.A. Pennacchio, M. Park, R.M. Myers, and G.G. Lennon, *Cystatin B-deficient mice have increased expression of apoptosis and glial activation genes*. Hum Mol Genet, 2001. 10(18): p. 1867-71.
482. Kopitar-Jerala, N., *The Role of Stefin B in Neuro-inflammation*. Front Cell Neurosci, 2015. 9: p. 458.
483. Alakurtti, K., E. Weber, R. Rinne, G. Theil, G.J. de Haan, D. Lindhout, P. Salmikangas, P. Saukko, U. Lahtinen, and A.E. Lehesjoki, *Loss of lysosomal association of cystatin B proteins representing progressive myoclonus epilepsy, EPM1, mutations*. Eur J Hum Genet, 2005. 13(2): p. 208-15.
484. Dahdouh, A., *Recherche de variants génétiques de la schizophrénie et du trouble bipolaire chez des familles consanguines en Algérie.*, in *Faculté de médecine d'Oran*. Thèse 2014.
485. Miller, D.T., M.P. Adam, S. Aradhya, L.G. Biesecker, A.R. Brothman, N.P. Carter, D.M. Church, J.A. Crolla, E.E. Eichler, C.J. Epstein, W.A. Faucett, L. Feuk, J.M. Friedman, A. Hamosh, L. Jackson, E.B. Kaminsky, K. Kok, I.D. Krantz, R.M. Kuhn, C. Lee, J.M. Ostell, C. Rosenberg, S.W. Scherer, N.B. Spinner, D.J. Stavropoulos, J.H. Tepperberg, E.C. Thorland, J.R. Vermeesch, D.J. Waggoner, M.S. Watson, C.L. Martin, and D.H. Ledbetter, *Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies*. Am J Hum Genet, 2010. 86(5): p. 749-64.
486. Mefford, H.C., H. Muhle, P. Ostertag, S. von Spiczak, K. Buysse, C. Baker, A. Franke, A. Malafosse, P. Genton, P. Thomas, C.A. Gurnett, S. Schreiber, A.G. Bassuk, M. Guipponi, U. Stephani, I. Helbig, and E.E. Eichler, *Genome-wide copy number variation in epilepsy: novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies*. PLoS Genet, 2010. 6(5): p. e1000962.
487. Olson, H., Y. Shen, J. Avallone, B.R. Sheidley, R. Pinsky, A.M. Bergin, G.T. Berry, F.H. Duffy, Y. Eksioğlu, D.J. Harris, F.M. Hisama, E. Ho, M. Irons, C.M. Jacobsen, P. James,

- S. Kothare, O. Khwaja, J. Lipton, T. Loddenkemper, J. Markowitz, K. Maski, J.T. Megerian, E. Neilan, P.C. Raffalli, M. Robbins, A. Roberts, E. Roe, C. Rollins, M. Sahin, D. Sarco, A. Schonwald, S.E. Smith, J. Soul, J.M. Stoler, M. Takeoka, W.H. Tan, A.R. Torres, P. Tsai, D.K. Urion, L. Weissman, R. Wolff, B.L. Wu, D.T. Miller, and A. Poduri, *Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy*. *Ann Neurol*, 2014. 75(6): p. 943-58.
488. Wang, D., X. Li, S. Jia, Y. Wang, Z. Wang, X. Song, and L. Liu, *Copy number variants associated with epilepsy from gene expression microarrays*. *J Clin Neurosci*, 2015. 22(12): p. 1907-10.
489. Haeri, M., *Chromosomal microarray analysis, or comparative genomic hybridization: A high throughput approach*. *MethodsX*, 2016. 3: p. 8-18.
490. Redon, R., S. Ishikawa, K.R. Fitch, L. Feuk, G.H. Perry, T.D. Andrews, H. Fiegler, M.H. Shapero, A.R. Carson, W. Chen, E.K. Cho, S. Dallaire, J.L. Freeman, J.R. Gonzalez, M. Gratacos, J. Huang, D. Kalaitzopoulos, D. Komura, J.R. MacDonald, C.R. Marshall, R. Mei, L. Montgomery, K. Nishimura, K. Okamura, F. Shen, M.J. Somerville, J. Tchinda, A. Valsesia, C. Woodwark, F. Yang, J. Zhang, T. Zerjal, J. Zhang, L. Armengol, D.F. Conrad, X. Estivill, C. Tyler-Smith, N.P. Carter, H. Aburatani, C. Lee, K.W. Jones, S.W. Scherer, and M.E. Hurles, *Global variation in copy number in the human genome*. *Nature*, 2006. 444(7118): p. 444-54.
491. Hu, J., L. Zhang, and H.J. Wang, *Sequential model selection-based segmentation to detect DNA copy number variation*. *Biometrics*, 2016.
492. Striano, P., A. Coppola, R. Paravidino, M. Malacarne, S. Gimelli, A. Robbiano, M. Traverso, M. Pezzella, V. Belcastro, A. Bianchi, M. Elia, A. Falace, E. Gazzero, E. Ferlazzo, E. Freri, R. Galasso, G. Gobbi, C. Molinatto, S. Cavani, O. Zuffardi, S. Striano, G.B. Ferrero, M. Silengo, M.L. Cavaliere, M. Benelli, A. Magi, M. Piccione, F. Dagna Bricarelli, D.A. Coviello, M. Fichera, C. Minetti, and F. Zara, *Clinical significance of rare copy number variations in epilepsy: a case-control survey using microarray-based comparative genomic hybridization*. *Arch Neurol*, 2012. 69(3): p. 322-30.
493. Brownstein, C.A., R.J. Kleiman, E.C. Engle, M.C. Towne, E.J. D'Angelo, T.W. Yu, A.H. Beggs, J. Picker, J.M. Fogler, D. Carroll, R.C. Schmitt, R.R. Wolff, Y. Shen, V. Lip, K. Bilguvar, A. Kim, S. Tembulkar, K. O'Donnell, and J. Gonzalez-Heydrich, *Overlapping 16p13.11 deletion and gain of copies variations associated with childhood onset psychosis include genes with mechanistic implications for autism associated pathways: Two case reports*. *Am J Med Genet A*, 2016.
494. Mefford, H.C., *Finding the Missing Pieces: The Microdeletion Burden in GGE*. *Epilepsy Curr*, 2016. 16(1): p. 16-7.

495. Riikonen, R.S., T. Wallden, and H. Kokkonen, *Infantile spasms and 15q11.2q13.1 chromosome duplication in two successive generations*. Eur J Paediatr Neurol, 2016. 20(1): p. 164-7.
496. Jiang, Y., Y. Zhang, P. Zhang, T. Sang, F. Zhang, T. Ji, Q. Huang, H. Xie, R. Du, B. Cai, H. Zhao, J. Wang, Y. Wu, H. Wu, K. Xu, X. Liu, P. Chan, and X. Wu, *NIPA2 located in 15q11.2 is mutated in patients with childhood absence epilepsy*. Hum Genet, 2012. 131(7): p. 1217-24.
497. Shinawi, M., P. Liu, S.H. Kang, J. Shen, J.W. Belmont, D.A. Scott, F.J. Probst, W.J. Craigen, B.H. Graham, A. Pursley, G. Clark, J. Lee, M. Proud, A. Stocco, D.L. Rodriguez, B.A. Kozel, S. Sparagana, E.R. Roeder, S.G. McGrew, T.W. Kurczynski, L.J. Allison, S. Amato, S. Savage, A. Patel, P. Stankiewicz, A.L. Beaudet, S.W. Cheung, and J.R. Lupski, *Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size*. J Med Genet, 2010. 47(5): p. 332-41.
498. Lesca, G. and C. Depienne, *Epilepsy genetics: the ongoing revolution*. Rev Neurol (Paris), 2015. 171(6-7): p. 539-57.
499. Samanta, D., *Epilepsy with PCDH19 mutation masquerading as benign partial epilepsy in infancy*. Neurol India, 2016. 64(2): p. 327-8.
500. Nemos, C., A.C. Bursztejn, and P. Jonveaux, *[Management of the CNVs in constitutional human genetics using array CGH]*. Pathol Biol (Paris), 2008. 56(6): p. 354-61.
501. Itsara, A., G.M. Cooper, C. Baker, S. Girirajan, J. Li, D. Absher, R.M. Krauss, R.M. Myers, P.M. Ridker, D.I. Chasman, H. Mefford, P. Ying, D.A. Nickerson, and E.E. Eichler, *Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease*. Am J Hum Genet, 2009. 84(2): p. 148-61.
502. Shaikh, T.H., X. Gai, J.C. Perin, J.T. Glessner, H. Xie, K. Murphy, R. O'Hara, T. Casalunovo, L.K. Conlin, M. D'Arcy, E.C. Frackelton, E.A. Geiger, C. Haldeman-Englert, M. Imielinski, C.E. Kim, L. Medne, K. Annaiah, J.P. Bradfield, E. Dabaghyan, A. Eckert, C.C. Onyiah, S. Ostapenko, F.G. Otieno, E. Santa, J.L. Shaner, R. Skraban, R.M. Smith, J. Elia, E. Goldmuntz, N.B. Spinner, E.H. Zackai, R.M. Chiavacci, R. Grundmeier, E.F. Rappaport, S.F. Grant, P.S. White, and H. Hakonarson, *High-resolution mapping and analysis of copy number variations in the human genome: a data resource for clinical and research applications*. Genome Res, 2009. 19(9): p. 1682-90.
503. Andrieux, J., *[Array-CGH for routine diagnosis of cryptic chromosomal imbalances]*. Pathol Biol (Paris), 2008. 56(6): p. 368-74.

504. Lee, C., A.J. Iafrate, and A.R. Brothman, *Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders*. Nat Genet, 2007. 39(7 Suppl): p. S48-54.
505. Nashef, L., *Sudden unexpected death in epilepsy: terminology and definitions*. Epilepsia, 1997. 38(11 Suppl): p. S6-8.
506. Donner, E.J., B. Waddell, K. Osland, J.P. Leach, S. Duncan, L. Nashef, and M.C. Picot, *After sudden unexpected death in epilepsy: Lessons learned and the road forward*. Epilepsia, 2016. 57 Suppl 1: p. 46-53.
507. Langan, Y., L. Nashef, and J.W. Sander, *Sudden unexpected death in epilepsy: a series of witnessed deaths*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2000. 68(2): p. 211-3.
508. Nashef, L., S. Garner, J.W. Sander, D.R. Fish, and S.D. Shorvon, *Circumstances of death in sudden death in epilepsy: interviews of bereaved relatives*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1998. 64(3): p. 349-52.
509. Tomson, T., L. Nashef, and P. Ryvlin, *Sudden unexpected death in epilepsy: current knowledge and future directions*. Lancet Neurol, 2008. 7(11): p. 1021-31.
510. Nei, M., S. Mintzer, C. Skidmore, M.R. Sperling, and R.T. Ho, *Heart rate and blood pressure in sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP)*. Epilepsy Res, 2016. 122: p. 44-46.
511. Morse, A.M. and S.V. Kothare, *Pediatric Sudden Unexpected Death in Epilepsy*. Pediatr Neurol, 2016.
512. Tomson, T., R. Surges, R. Delamont, S. Haywood, and D.C. Hesdorffer, *Who to target in sudden unexpected death in epilepsy prevention and how? Risk factors, biomarkers, and intervention study designs*. Epilepsia, 2016. 57 Suppl 1: p. 4-16.
513. Goldman, A.M., E.R. Behr, C. Semsarian, R.D. Bagnall, S. Sisodiya, and P.N. Cooper, *Sudden unexpected death in epilepsy genetics: Molecular diagnostics and prevention*. Epilepsia, 2016. 57 Suppl 1: p. 17-25.
514. Bagnall, R.D., D.E. Crompton, S. Petrovski, L. Lam, C. Cutmore, S.I. Garry, L.G. Sadleir, L.M. Dibbens, A. Cairns, S. Kivity, Z. Afawi, B.M. Regan, J. Duflou, S.F. Berkovic, I.E. Scheffer, and C. Semsarian, *Exome-based analysis of cardiac arrhythmia, respiratory control and epilepsy genes in sudden unexpected death in epilepsy*. Ann Neurol, 2015.
515. Hawkins, N.A. and J.A. Kearney, *Hlf is a genetic modifier of epilepsy caused by voltage-gated sodium channel mutations*. Epilepsy Res, 2016. 119: p. 20-3.

516. Leu, C., S. Balestrini, B. Maher, L. Hernandez-Hernandez, P. Gormley, E. Hamalainen, K. Heggeli, N. Schoeler, J. Novy, J. Willis, V. Plagnol, R. Ellis, E. Reavey, M. O'Regan, W.O. Pickrell, R.H. Thomas, S.K. Chung, N. Delanty, J.M. McMahon, S. Malone, L.G. Sadleir, S.F. Berkovic, L. Nashef, S.M. Zuberi, M.I. Rees, G.L. Cavalleri, J.W. Sander, E. Hughes, J. Helen Cross, I.E. Scheffer, A. Palotie, and S.M. Sisodiya, *Genome-wide Polygenic Burden of Rare Deleterious Variants in Sudden Unexpected Death in Epilepsy*. *EBioMedicine*, 2015. 2(9): p. 1063-70.
517. Labate, A., P. Tarantino, G. Palamara, M. Gagliardi, F. Cavalcanti, E. Ferlazzo, M. Sturniolo, G. Incorpora, G. Annesi, U. Aguglia, and A. Gambardella, *Mutations in PRRT2 result in familial infantile seizures with heterogeneous phenotypes including febrile convulsions and probable SUDEP*. *Epilepsy Res*, 2013. 104(3): p. 280-4.
518. Ebrahimi-Fakhari, D., A. Saffari, A. Westenberger, and C. Klein, *The evolving spectrum of PRRT2-associated paroxysmal diseases*. *Brain*, 2015. 138(Pt 12): p. 3476-95.
519. Rossi, P., B. Sterlini, E. Castroflorio, A. Marte, F. Onofri, F. Valtorta, L. Maragliano, A. Corradi, and F. Benfenati, *Novel Topology of Proline-Rich Transmembrane Protein 2 (PRRT2): Hints for an Intracellular Function at the Synapse*. *J Biol Chem*, 2016.
520. Wu, H., X. Chen, J. Cheng, and Y. Qi, *SUMOylation and Potassium Channels: Links to Epilepsy and Sudden Death*. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2016. 103: p. 295-321.
521. Harding, A.E., *Classification of the hereditary ataxias and paraplegias*. *Lancet*, 1983. 1(8334): p. 1151-5.
522. Klebe, S., G. Stevanin, and C. Depienne, *Clinical and genetic heterogeneity in hereditary spastic paraplegias: from SPG1 to SPG72 and still counting*. *Rev Neurol (Paris)*, 2015. 171(6-7): p. 505-30.
523. Durr, A., C.S. Davoine, C. Paternotte, J. von Fellenberg, S. Cogilnicean, P. Coutinho, C. Lamy, S. Bourgeois, J.F. Prud'homme, C. Penet, J.L. Mas, J.M. Burgunder, J. Hazan, J. Weissenbach, A. Brice, and B. Fontaine, *Phenotype of autosomal dominant spastic paraplegia linked to chromosome 2*. *Brain*, 1996. 119 (Pt 5): p. 1487-96.
524. Pensato, V., B. Castellotti, C. Gellera, D. Pareyson, C. Ciano, L. Nanetti, E. Salsano, G. Piscoquito, E. Sarto, M. Eoli, I. Moroni, P. Soliveri, E. Lamperti, L. Chiapparini, D. Di Bella, F. Taroni, and C. Mariotti, *Overlapping phenotypes in complex spastic paraplegias SPG11, SPG15, SPG35 and SPG48*. *Brain*, 2014. 137(Pt 7): p. 1907-20.
525. Masciullo, M., A. Tessa, S. Perazza, F.M. Santorelli, A. Perna, and G. Silvestri, *Hereditary spastic paraplegia: Novel mutations and expansion of the phenotype variability in SPG56*. *Eur J Paediatr Neurol*, 2016.

526. Leonardi, L., L. Ziccardi, C. Marcotulli, A. Rubegni, A. Longobardi, M. Serrao, E. Storti, F. Pierelli, A. Tessa, V. Parisi, F.M. Santorelli, and C. Carlo, *Pigmentary degenerative maculopathy as prominent phenotype in an Italian SPG56/CYP2U1 family*. J Neurol, 2016.
527. Schule, R., S. Wiethoff, P. Martus, K.N. Karle, S. Otto, S. Klebe, S. Klimpe, C. Gallenmuller, D. Kurzwelly, D. Henkel, F. Rimmele, H. Stolze, Z. Kohl, J. Kassubek, T. Klockgether, S. Vielhaber, C. Kamm, T. Klopstock, P. Bauer, S. Zuchner, I. Liepelt-Scarfone, and L. Schols, *Hereditary Spastic Paraplegia -clinico-genetic lessons from 608 patients*. Ann Neurol, 2016.
528. Salinas, S., C. Proukakis, A. Crosby, and T.T. Warner, *Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms*. Lancet Neurol, 2008. 7(12): p. 1127-38.
529. Rydning, S.L., I.M. Wedding, J. Koht, M. Chawla, A.M. Oye, Y. Sheng, M.D. Vigeland, K.K. Selmer, and C.M. Tallaksen, *A founder mutation p.H701P identified as a major cause of SPG7 in Norway*. Eur J Neurol, 2016.
530. Schule, R., E. Brandt, K.N. Karle, M. Tsaousidou, S. Klebe, S. Klimpe, M. Auer-Grumbach, A.H. Crosby, C.A. Hubner, L. Schols, T. Deufel, and C. Beetz, *Analysis of CYP7B1 in non-consanguineous cases of hereditary spastic paraplegia*. Neurogenetics, 2009. 10(2): p. 97-104.
531. Alrayes, N., H.S. Mohamoud, M. Jelani, S. Ahmad, N. Vadgama, K. Bakur, M. Simpson, J.Y. Al-Aama, and J. Nasir, *Truncating mutation in intracellular phospholipase A(1) gene (DDHD2) in hereditary spastic paraplegia with intellectual disability (SPG54)*. BMC Res Notes, 2015. 8: p. 271.
532. Coutinho, P., J. Barros, R. Zemmouri, J. Guimaraes, C. Alves, R. Choroa, E. Lourenco, P. Ribeiro, J.L. Loureiro, J.V. Santos, A. Hamri, C. Paternotte, J. Hazan, M.C. Silva, J.F. Prud'homme, and D. Grid, *Clinical heterogeneity of autosomal recessive spastic paraplegias: analysis of 106 patients in 46 families*. Arch Neurol, 1999. 56(8): p. 943-9.
533. Ueda, M., Y. Katayama, T. Kamiya, M. Mishina, H. Igarashi, S. Okubo, M. Senda, K. Iwabuchi, and A. Terashi, *Hereditary spastic paraplegia with a thin corpus callosum and thalamic involvement in Japan*. Neurology, 1998. 51(6): p. 1751-4.
534. Kediha, M.I., S. Nouioua, A. Brice, S. Assami, G. Stevanin, and M. Tazir, *Paraplégies spastiques familiales: étude d'une série de 70 familles et corrélations phénotype/génotype*. Revue Neurologique, 2014. 170(S1): p. A151.
535. Belounnar, S., A. M'Zahem, N. Taghane, A. Fekraoui, A. Boulefkhad, and A. Hamri, *Paraplégie spastique familiale: étude phénotypique et génotypique de 14 familles algériennes*. Revue Neurologique, 2015. 171(1): p. A120-A121.

536. Boukhris, A., G. Stevanin, I. Feki, P. Denora, N. Elleuch, M.I. Miladi, C. Goizet, J. Truchetto, S. Belal, A. Brice, and C. Mhiri, *Tunisian hereditary spastic paraplegias: clinical variability supported by genetic heterogeneity*. Clin Genet, 2009. 75(6): p. 527-36.
537. Gigli, G.L., M. Diomedi, G. Bernardi, F. Placidi, M.G. Marciani, E. Calia, M.C. Maschio, and G. Neri, *Spastic paraplegia, epilepsy, and mental retardation in several members of a family: a novel genetic disorder*. Am J Med Genet, 1993. 45(6): p. 711-6.
538. Strumpell, A., *Beitrage zur Pathologie des Ruckenmarks*. Arch Psychiatr Nervenkr, 1880. 10: p. 676-717.
539. Webb, S., N. Flanagan, N. Callaghan, and M. Hutchinson, *A family with hereditary spastic paraparesis and epilepsy*. Epilepsia, 1997. 38(4): p. 495-9.
540. Al-Yahyaee, S., L.I. Al-Gazali, P. De Jonghe, H. Al-Barwany, M. Al-Kindi, E. De Vriendt, P. Chand, R. Koul, P.C. Jacob, A. Gururaj, L. Sztriha, A. Parrado, C. Van Broeckhoven, and R.A. Bayoumi, *A novel locus for hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum and epilepsy*. Neurology, 2006. 66(8): p. 1230-4.
541. Sommerfelt, K., M. Kyllerman, and G. Sanner, *Hereditary spastic paraplegia with epileptic myoclonus*. Acta Neurol Scand, 1991. 84(2): p. 157-60.
542. Seri, M., R. Cusano, P. Forabosco, R. Cinti, F. Caroli, P. Picco, R. Bini, V.B. Morra, G. De Michele, M. Lerone, M. Silengo, I. Pela, C. Borrone, G. Romeo, and M. Devoto, *Genetic mapping to 10q23.3-q24.2, in a large Italian pedigree, of a new syndrome showing bilateral cataracts, gastroesophageal reflux, and spastic paraparesis with amyotrophy*. Am J Hum Genet, 1999. 64(2): p. 586-93.
543. Orlacchio, A., T. Kawarai, F. Gaudiello, P.H. St George-Hyslop, R. Floris, and G. Bernardi, *New locus for hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1p31.1-1p21.1*. Ann Neurol, 2005. 58(3): p. 423-9.
544. Marzolini, C., E. Paus, T. Buclin, and R.B. Kim, *Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance*. Clin Pharmacol Ther, 2004. 75(1): p. 13-33.
545. Juliano, R.L. and V. Ling, *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochim Biophys Acta, 1976. 455(1): p. 152-62.
546. Aller, S.G., J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P.M. Harrell, Y.T. Trinh, Q. Zhang, I.L. Urbatsch, and G. Chang, *Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding*. Science, 2009. 323(5922): p. 1718-22.

547. Johnstone, R.W., A.A. Ruefli, and M.J. Smyth, *Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein?* Trends Biochem Sci, 2000. 25(1): p. 1-6.
548. Thiebaut, F., T. Tsuruo, H. Hamada, M.M. Gottesman, I. Pastan, and M.C. Willingham, *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(21): p. 7735-8.
549. Mahringer, A. and G. Fricker, *ABC transporters at the blood-brain barrier.* Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2016.
550. Boughrara, W., M. Aberkane, M. Fodil, A. Benzaoui, S. Dorgham, F. Zemani, C. Dahmani, E. Petit Teixeira, and A. Boudjema, *Impact of MTHFR rs1801133, MTHFR rs1801131 and ABCB1 rs1045642 polymorphisms with increased susceptibility of rheumatoid arthritis in the West Algerian population: A case-control study.* Acta Reumatol Port, 2014.
551. Kadioglu, O., M.E. Saeed, M. Valoti, M. Frosini, G. Sgaragli, and T. Efferth, *Interactions of human P-glycoprotein transport substrates and inhibitors at the drug binding domain: Functional and molecular docking analyses.* Biochem Pharmacol, 2016. 104: p. 42-51.
552. Sakaeda, T., T. Nakamura, and K. Okumura, *Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs.* Pharmacogenomics, 2003. 4(4): p. 397-410.
553. Verstuyft, C., M. Schwab, E. Schaeffeler, R. Kerb, U. Brinkmann, P. Jaillon, C. Funck-Brentano, and L. Becquemont, *Digoxin pharmacokinetics and MDR1 genetic polymorphisms.* Eur J Clin Pharmacol, 2003. 58(12): p. 809-12.
554. Peng, R., H. Zhang, Y. Zhang, and D.Y. Wei, *Impacts of ABCB1 (G1199A) polymorphism on resistance, uptake, and efflux to steroid drugs.* Xenobiotica, 2016: p. 1-5.
555. Stokanovic, D., V.N. Nikolic, S.S. Konstantinovic, J.B. Zvezdanovic, J. Lilic, S.R. Apostolovic, M. Pavlovic, V.S. Zivkovic, T. Jevtovic-Stoimenov, and S.M. Jankovic, *P-Glycoprotein Polymorphism C3435T Is Associated with Dose-Adjusted Clopidogrel and 2-Oxo-Clopidogrel Concentration.* Pharmacology, 2016. 97(3-4): p. 101-6.
556. Rauf, A., G. Uddin, M. Raza, B. Ahmad, N. Jehan, B.S. Siddiqui, J. Molnar, A. Csonka, and D. Szabo, *Reversal of Multidrug Resistance in Mouse Lymphoma Cells by Extracts and Flavonoids from Pistacia integerrima.* Asian Pac J Cancer Prev, 2016. 17(1): p. 51-5.

557. Li, H., B. Wang, C. Chang, M. Wu, Y. Xu, and Y. Jiang, *The roles of variants in human multidrug resistance (MDR1) gene and their haplotypes on antiepileptic drugs response: a meta-analysis of 57 studies*. PLoS One, 2015. 10(3): p. e0122043.
558. Liu, J., Y. He, J. Zhang, J. Li, X. Yu, Z. Cao, F. Meng, Y. Zhao, X. Wu, T. Shen, and Z. Hong, *Functionalized nanocarrier combined seizure-specific vector with P-glycoprotein modulation property for antiepileptic drug delivery*. Biomaterials, 2016. 74: p. 64-76.
559. Yu, L., W.P. Liao, Y.H. Yi, and G. Qiu, *ABCB1 G2677T/A polymorphism is associated with the risk of drug-resistant epilepsy in Asians*. Epilepsy Res, 2015. 115: p. 100-8.
560. Manna, I., A. Gambardella, A. Labate, L. Mumoli, E. Ferlazzo, F. Pucci, U. Aguglia, and A. Quattrone, *Polymorphism of the multidrug resistance 1 gene MDR1/ABCB1 C3435T and response to antiepileptic drug treatment in temporal lobe epilepsy*. Seizure, 2015. 24: p. 124-6.
561. Sun, G., X. Sun, and L. Guan, *Association of MDR1 gene C3435T polymorphism with childhood intractable epilepsy: a meta-analysis*. J Neural Transm (Vienna), 2014. 121(7): p. 717-24.
562. Siddiqui, A., R. Kerb, M.E. Weale, U. Brinkmann, A. Smith, D.B. Goldstein, N.W. Wood, and S.M. Sisodiya, *Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1*. N Engl J Med, 2003. 348(15): p. 1442-8.
563. Seo, T., T. Ishitsu, N. Ueda, N. Nakada, K. Yurube, K. Ueda, and K. Nakagawa, *ABCB1 polymorphisms influence the response to antiepileptic drugs in Japanese epilepsy patients*. Pharmacogenomics, 2006. 7(4): p. 551-61.
564. Keangpraphun, T., S. Towanabut, Y. Chinvarun, and P. Kijsanayotin, *Association of ABCB1 C3435T polymorphism with phenobarbital resistance in Thai patients with epilepsy*. J Clin Pharm Ther, 2015. 40(3): p. 315-9.
565. Haerian, B.S., K.S. Lim, H.J. Tan, E.H. Mohamed, C.T. Tan, A.A. Raymond, C.P. Wong, S.W. Wong, H. Omar, H. Roslan, and Z. Mohamed, *Association between ABCB1 polymorphism and response to sodium valproate treatment in Malaysian epilepsy patients*. Epileptic Disord, 2011. 13(1): p. 65-75.
566. Raguz, S., M.T. De Bella, M.J. Slade, C.F. Higgins, R.C. Coombes, and E. Yague, *Expression of RPIP9 (Rap2 interacting protein 9) is activated in breast carcinoma and correlates with a poor prognosis*. Int J Cancer, 2005. 117(6): p. 934-41.
567. Rountree, M.R., K.E. Bachman, J.G. Herman, and S.B. Baylin, *DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer*. Oncogene, 2001. 20(24): p. 3156-65.

568. Burmeister, D.W., E.H. Smith, R.T. Cristel, S.D. McKay, H. Shi, G.L. Arthur, J.W. Davis, and K.H. Taylor, *The expression of RUNDC3B is associated with promoter methylation in lymphoid malignancies*. Hematol Oncol, 2015.
569. Chinery, R., J.A. Brockman, D.T. Dransfield, and R.J. Coffey, *Antioxidant-induced nuclear translocation of CCAAT/enhancer-binding protein beta. A critical role for protein kinase A-mediated phosphorylation of Ser299*. J Biol Chem, 1997. 272(48): p. 30356-61.
570. Pless, O., E. Kowenz-Leutz, M. Knoblich, J. Lausen, M. Beyermann, M.J. Walsh, and A. Leutz, *G9a-mediated lysine methylation alters the function of CCAAT/enhancer-binding protein-beta*. J Biol Chem, 2008. 283(39): p. 26357-63.
571. Roy, S.K., J. Hu, Q. Meng, Y. Xia, P.S. Shapiro, S.P. Reddy, L.C. Platanius, D.J. Lindner, P.F. Johnson, C. Pritchard, G. Pages, J. Pouyssegur, and D.V. Kalvakolanu, *MEKK1 plays a critical role in activating the transcription factor C/EBP-beta-dependent gene expression in response to IFN-gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(12): p. 7945-50.
572. Cao, Z., R.M. Umek, and S.L. McKnight, *Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells*. Genes Dev, 1991. 5(9): p. 1538-52.
573. Fan, H.Y., Z. Liu, M. Shimada, E. Sterneck, P.F. Johnson, S.M. Hedrick, and J.S. Richards, *MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility*. Science, 2009. 324(5929): p. 938-41.
574. Pankratz, N., A. Dumitriu, K.N. Hetrick, M. Sun, J.C. Latourelle, J.B. Wilk, C. Halter, K.F. Doheny, J.F. Gusella, W.C. Nichols, R.H. Myers, T. Foroud, A.L. DeStefano, P. Psg, C. GenePd Investigators, and L. Molecular Genetic, *Copy number variation in familial Parkinson disease*. PLoS One, 2011. 6(8): p. e20988.
575. Remmers, E.F., F. Cosan, Y. Kirino, M.J. Ombrello, N. Abaci, C. Satorius, J.M. Le, B. Yang, B.D. Korman, A. Cakiris, O. Aglar, Z. Emrence, H. Azakli, D. Ustek, I. Tugal-Tutkun, G. Akman-Demir, W. Chen, C.I. Amos, M.B. Dizon, A.A. Kose, G. Azizlerli, B. Erer, O.J. Brand, V.G. Kaklamani, P. Kaklamanis, E. Ben-Chetrit, M. Stanford, F. Fortune, M. Ghabra, W.E. Ollier, Y.H. Cho, D. Bang, J. O'Shea, G.R. Wallace, M. Gadina, D.L. Kastner, and A. Gul, *Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behcet's disease*. Nat Genet, 2010. 42(8): p. 698-702.
576. Jostins, L., S. Ripke, R.K. Weersma, R.H. Duerr, D.P. McGovern, K.Y. Hui, J.C. Lee, L.P. Schumm, Y. Sharma, C.A. Anderson, J. Essers, M. Mitrovic, K. Ning, I. Cleynen, E. Theatre, S.L. Spain, S. Raychaudhuri, P. Goyette, Z. Wei, C. Abraham, J.P. Achkar, T. Ahmad, L. Amininejad, A.N. Ananthakrishnan, V. Andersen, J.M. Andrews, L. Baidoo, T. Balschun, P.A. Bampton, A. Bitton, G. Boucher, S. Brand, C. Buning, A. Cohain, S. Cichon, M. D'Amato, D. De Jong, K.L. Devaney, M. Dubinsky, C. Edwards,

- D. Ellinghaus, L.R. Ferguson, D. Franchimont, K. Fransen, R. Gearry, M. Georges, C. Gieger, J. Glas, T. Haritunians, A. Hart, C. Hawkey, M. Hedl, X. Hu, T.H. Karlsen, L. Kupcinskis, S. Kugathasan, A. Latiano, D. Laukens, I.C. Lawrance, C.W. Lees, E. Louis, G. Mahy, J. Mansfield, A.R. Morgan, C. Mowat, W. Newman, O. Palmieri, C.Y. Ponsioen, U. Potocnik, N.J. Prescott, M. Regueiro, J.I. Rotter, R.K. Russell, J.D. Sanderson, M. Sans, J. Satsangi, S. Schreiber, L.A. Simms, J. Sventoraityte, S.R. Targan, K.D. Taylor, M. Tremelling, H.W. Verspaget, M. De Vos, C. Wijmenga, D.C. Wilson, J. Winkelmann, R.J. Xavier, S. Zeissig, B. Zhang, C.K. Zhang, H. Zhao, I.B.D.G.C. International, M.S. Silverberg, V. Annese, H. Hakonarson, S.R. Brant, G. Radford-Smith, C.G. Mathew, J.D. Rioux, E.E. Schadt, M.J. Daly, A. Franke, M. Parkes, S. Vermeire, J.C. Barrett and J.H. Cho, *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. *Nature*, 2012. 491(7422): p. 119-24.
577. Park, H., J.I. Kim, Y.S. Ju, O. Gokcumen, R.E. Mills, S. Kim, S. Lee, D. Suh, D. Hong, H.P. Kang, Y.J. Yoo, J.Y. Shin, H.J. Kim, M. Yavartanoo, Y.W. Chang, J.S. Ha, W. Chong, G.R. Hwang, K. Darvishi, H. Kim, S.J. Yang, K.S. Yang, H. Kim, M.E. Hurler, S.W. Scherer, N.P. Carter, C. Tyler-Smith, C. Lee, and J.S. Seo, *Discovery of common Asian copy number variants using integrated high-resolution array CGH and massively parallel DNA sequencing*. *Nat Genet*, 2010. 42(5): p. 400-5.
578. Orivoli, S., E. Pavlidis, G. Cantalupo, M. Pezzella, F. Zara, L. Garavelli, F. Pisani, and B. Piccolo, *Xp11.22 Microduplications Including HUWE1: Case Report and Literature Review*. *Neuropediatrics*, 2016. 47(1): p. 51-6.
579. Donnelly, A.J., K.H. Choo, H.M. Kozman, A.K. Gedeon, D.M. Danks, and J.C. Mulley, *Regional localisation of a non-specific X-linked mental retardation gene (MRX19) to Xp22*. *Am J Med Genet*, 1994. 51(4): p. 581-5.
580. Froyen, G., M. Corbett, J. Vandewalle, I. Jarvela, O. Lawrence, C. Meldrum, M. Bauters, K. Govaerts, L. Vandeleur, H. Van Esch, J. Chelly, D. Sanlaville, H. van Bokhoven, H.H. Ropers, F. Laumonnier, E. Ranieri, C.E. Schwartz, F. Abidi, P.S. Tarpey, P.A. Futreal, A. Whibley, F.L. Raymond, M.R. Stratton, J.P. Fryns, R. Scott, M. Peippo, M. Sipponen, M. Partington, D. Mowat, M. Field, A. Hackett, P. Marynen, G. Turner, and J. Gecz, *Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase HSD17B10 and the E3 ubiquitin ligase HUWE1 are associated with mental retardation*. *Am J Hum Genet*, 2008. 82(2): p. 432-43.
581. Froyen, G., S. Belet, F. Martinez, C.B. Santos-Reboucas, M. Declercq, J. Verbeeck, L. Donckers, S. Berland, S. Mayo, M. Rosello, M.M. Pimentel, N. Fintelman-Rodrigues, R. Hovland, S. Rodrigues dos Santos, F.L. Raymond, T. Bose, M.A. Corbett, L. Sheffield, C.M. van Ravenswaaij-Arts, T. Dijkhuizen, C. Coutton, V. Satre, V. Siu, and P. Marynen, *Copy-number gains of HUWE1 due to replication- and recombination-based rearrangements*. *Am J Hum Genet*, 2012. 91(2): p. 252-64.
582. Madrigal, I., L. Rodriguez-Revengea, L. Armengol, E. Gonzalez, B. Rodriguez, C. Badenas, A. Sanchez, F. Martinez, M. Guitart, I. Fernandez, J.A. Arranz, M. Tejada,

- L.A. Perez-Jurado, X. Estivill, and M. Mila, *X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation*. BMC Genomics, 2007. 8: p. 443.
583. Jackson, A.P., H. Eastwood, S.M. Bell, J. Adu, C. Toomes, I.M. Carr, E. Roberts, D.J. Hampshire, Y.J. Crow, A.J. Mighell, G. Karbani, H. Jafri, Y. Rashid, R.F. Mueller, A.F. Markham, and C.G. Woods, *Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain*. Am J Hum Genet, 2002. 71(1): p. 136-42.
584. Trimborn, M., S.M. Bell, C. Felix, Y. Rashid, H. Jafri, P.D. Griffiths, L.M. Neumann, A. Krebs, A. Reis, K. Sperling, H. Neitzel, and A.P. Jackson, *Mutations in microcephalin cause aberrant regulation of chromosome condensation*. Am J Hum Genet, 2004. 75(2): p. 261-6.
585. Prasad, S.S., A. Garg, and A.K. Agarwal, *Enzymatic activities of the human AGPAT isoform 3 and isoform 5: localization of AGPAT5 to mitochondria*. J Lipid Res, 2011. 52(3): p. 451-62.
586. Lu, B., Y.J. Jiang, Y. Zhou, F.Y. Xu, G.M. Hatch, and P.C. Choy, *Cloning and characterization of murine 1-acyl-sn-glycerol 3-phosphate acyltransferases and their regulation by PPARalpha in murine heart*. Biochem J, 2005. 385(Pt 2): p. 469-77.
587. Palfree, R.G., L.C. Sadro, and S. Solomon, *The gene encoding the human corticostatin HP-4 precursor contains a recent 86-base duplication and is located on chromosome 8*. Mol Endocrinol, 1993. 7(2): p. 199-205.
588. Tanaka, S., M. Mori, Y. Sakamoto, M. Makuuchi, K. Sugimachi, and J.R. Wands, *Biologic significance of angiotensin-2 expression in human hepatocellular carcinoma*. J Clin Invest, 1999. 103(3): p. 341-5.
589. Ward, E.G., K. Grosios, A.F. Markham, and P.F. Jones, *Genomic structures of the human angiotensin-2 show polymorphism in angiotensin-2*. Cytogenet Cell Genet, 2001. 94(3-4): p. 147-54.
590. Munro, S., D.J. Cuthbertson, J. Cunningham, M. Sales, and P.T. Cohen, *Human skeletal muscle expresses a glycogen-targeting subunit of PP1 that is identical to the insulin-sensitive glycogen-targeting subunit G(L) of liver*. Diabetes, 2002. 51(3): p. 591-8.
591. Dunn, J.S., W.M. Mlynarski, M.G. Pezolesi, M. Borowiec, C. Powers, A.S. Krolewski, and A. Doria, *Examination of PPP1R3B as a candidate gene for the type 2 diabetes and MODY loci on chromosome 8p23*. Ann Hum Genet, 2006. 70(Pt 5): p. 587-93.
592. Claeys, I., M. Holvoet, B. Eyskens, P. Adriaensens, M. Gewillig, J.P. Fryns, and K. Devriendt, *A recognisable behavioural phenotype associated with terminal*

- deletions of the short arm of chromosome 8. Am J Med Genet, 1997. 74(5): p. 515-20.*
593. Faivre, L., N. Morichon-Delvallez, G. Viot, F. Narcy, S. Loison, L. Mandelbrot, M.C. Aubry, V. Raclin, P. Edery, A. Munnich, and M. Vekemans, *Prenatal diagnosis of an 8p23.1 deletion in a fetus with a diaphragmatic hernia and review of the literature. Prenat Diagn, 1998. 18(10): p. 1055-60.*
594. Digilio, M.C., B. Marino, P. Guccione, A. Giannotti, R. Mingarelli, and B. Dallapiccola, *Deletion 8p syndrome. Am J Med Genet, 1998. 75(5): p. 534-6.*
595. Shimokawa, O., N. Miyake, T. Yoshimura, N. Sosonkina, N. Harada, T. Mizuguchi, S. Kondoh, T. Kishino, T. Ohta, V. Remco, T. Takashima, A. Kinoshita, K. Yoshiura, N. Niikawa, and N. Matsumoto, *Molecular characterization of del(8)(p23.1p23.1) in a case of congenital diaphragmatic hernia. Am J Med Genet A, 2005. 136(1): p. 49-51.*
596. Paez, M.T., T. Yamamoto, K. Hayashi, T. Yasuda, N. Harada, N. Matsumoto, K. Kurosawa, Y. Furutani, S. Asakawa, N. Shimizu, and R. Matsuoka, *Two patients with atypical interstitial deletions of 8p23.1: mapping of phenotypical traits. Am J Med Genet A, 2008. 146A(9): p. 1158-65.*
597. Dobyns, W.B., G.W. Dewald, R.O. Carlson, D.D. Mair, and V.V. Michels, *Deficiency of chromosome 8p21.1----8pter: case report and review of the literature. Am J Med Genet, 1985. 22(1): p. 125-34.*
598. Nakayama, T., S. Nabatame, Y. Saito, E. Nakagawa, K. Shimojima, T. Yamamoto, Y. Kaneko, K. Okumura, H. Fujie, M. Uematsu, H. Komaki, K. Sugai, and M. Sasaki, *8p deletion and 9p duplication in two children with electrical status epilepticus in sleep syndrome. Seizure, 2012. 21(4): p. 295-9.*
599. Fang, Y.Y., S. Bain, E.A. Haan, H.J. Eyre, M. MacDonald, T.J. Wright, M.R. Altherr, O. Riess, G. Sutherland, and D.F. Callen, *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, 1997. 71(4): p. 453-7.*
600. Fryns, J.P., A. Kleczkowska, A. Vogels, and H. Van den Berghe, *Normal phenotype and slight mental retardation in de novo distal 8p deletion (8pter----8p23.1:). Ann Genet, 1989. 32(3): p. 171-3.*
601. Fagan, K., I. Wilkinson, M. Allen, and S. Brownlea, *The coagulation factor VII regulator is located on 8p23.1. Hum Genet, 1988. 79(4): p. 365-7.*
602. Hutchinson, R., M. Wilson, and L. Voullaire, *Distal 8p deletion (8p23.1----8pter): a common deletion? J Med Genet, 1992. 29(6): p. 407-11.*

603. Grohmann, A., K. Tanneberger, A. Alzner, J. Schneikert, and J. Behrens, *AMER1 regulates the distribution of the tumor suppressor APC between microtubules and the plasma membrane*. J Cell Sci, 2007. 120(Pt 21): p. 3738-47.
604. Edelmann, L., R.K. Pandita, E. Spiteri, B. Funke, R. Goldberg, N. Palanisamy, R.S. Chaganti, E. Magenis, R.J. Shprintzen, and B.E. Morrow, *A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11*. Hum Mol Genet, 1999. 8(7): p. 1157-67.
605. Courtens, W., I. Schramme, and A. Laridon, *Microduplication 22q11.2: a benign polymorphism or a syndrome with a very large clinical variability and reduced penetrance?--Report of two families*. Am J Med Genet A, 2008. 146A(6): p. 758-63.
606. Portnoi, M.F., *Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome*. Eur J Med Genet, 2009. 52(2-3): p. 88-93.
607. Schluth-Bolard, C., M. Till, P. Edery, and D. Sanlaville, *[New chromosomal syndromes]*. Pathol Biol (Paris), 2008. 56(6): p. 380-7.
608. Kim, E.H., M.S. Yum, B.H. Lee, H.W. Kim, H.J. Lee, G.H. Kim, Y.J. Lee, H.W. Yoo, and T.S. Ko, *Epilepsy and Other Neuropsychiatric Manifestations in Children and Adolescents with 22q11.2 Deletion Syndrome*. J Clin Neurol, 2016. 12(1): p. 85-92.
609. Wentzel, C., M. Fernstrom, Y. Ohrner, G. Anneren, and A.C. Thuresson, *Clinical variability of the 22q11.2 duplication syndrome*. Eur J Med Genet, 2008. 51(6): p. 501-10.
610. Vaz, S.O., R. Pires, L.M. Pires, I.M. Carreira, R. Anjos, P. Maciel, and L. Mota-Vieira, *A unique phenotype in a patient with a rare triplication of the 22q11.2 region and new clinical insights of the 22q11.2 microduplication syndrome: a report of two cases*. BMC Pediatr, 2015. 15: p. 95.
611. Verges, L., O. Molina, E. Gean, F. Vidal, and J. Blanco, *Deletions and duplications of the 22q11.2 region in spermatozoa from DiGeorge/velocardiofacial fathers*. Mol Cytogenet, 2014. 7(1): p. 86.
612. Alberti, A., C. Romano, M. Falco, F. Cali, P. Schinocca, O. Galesi, A. Spalletta, D. Di Benedetto, and M. Fichera, *1.5 Mb de novo 22q11.21 microduplication in a patient with cognitive deficits and dysmorphic facial features*. Clin Genet, 2007. 71(2): p. 177-82.
613. Hochstenbach, R., E. van Binsbergen, J. Engelen, A. Nieuwint, A. Polstra, P. Poddighe, C. Ruivenkamp, B. Sikkema-Raddatz, D. Smeets, and M. Poot, *Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands*. Eur J Med Genet, 2009. 52(4): p. 161-9.

614. Leu, C., A. Coppola, and S.M. Sisodiya, *Progress from genome-wide association studies and copy number variant studies in epilepsy*. *Curr Opin Neurol*, 2016. 29(2): p. 158-67.

Annexes

Annexe 1

Publications en rapport avec la thèse



Contents lists available at ScienceDirect

Seizure

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yseiz

Familial epilepsy in Algeria: Clinical features and inheritance profiles



Amina Chentouf^{a,*}, Aïcha Dahdouh^b, Michel Guipponi^{c,d}, Mohand Laïd Oubaiche^a,
Malika Chaouch^e, Hanan Hamamy^c, Stylianos E. Antonarakis^{c,d,f}

^a Department of Neurology, University Hospital of Oran, Algeria

^b Department of Psychiatry, University Hospital of Oran, Oran, Algeria

^c Department of Genetic Medicine and Development, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland

^d Department of Genetic Medicine and Laboratory, University Hospitals of Geneva, Geneva, Switzerland

^e Department of Neurology, Benaknoun University Hospital, Algiers, Algeria

^f Institute of Genetics and Genomics in Geneva (IGE3), Geneva, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 May 2015

Received in revised form 17 June 2015

Accepted 25 June 2015

Keywords:

Familial epilepsy
Inherited epilepsy
Consanguinity
Pedigree
Algeria

ABSTRACT

Purpose: To document the clinical characteristics and inheritance pattern of epilepsy in multigeneration Algerian families.

Methods: Affected members from extended families with familial epilepsy were assessed at the University Hospital of Oran in Algeria. Available medical records, neurological examination, electroencephalography and imaging data were reviewed. The epilepsy type was classified according to the criteria of the International League Against Epilepsy and modes of inheritance were deduced from pedigree analysis.

Results: The study population included 40 probands; 23 male (57.5%) and 17 female subjects (42.5%). The mean age of seizure onset was 9.5 ± 6.1 years. According to seizure onset, 16 patients (40%) had focal seizures and 20 (50%) had generalized seizures. Seizure control was achieved for two patients (5%) for 10 years, while 28 (70%) were seizure-free for 3 months. Eleven patients (27.5%) had prior febrile seizures, 12 were diagnosed with psychiatric disorders and four families had syndromic epilepsy. The consanguinity rate among parents of affected was 50% with phenotypic concordance observed in 25 families (62.5%). Pedigree analysis suggested autosomal dominant (AD) inheritance with or without reduced penetrance in 18 families (45%), probable autosomal recessive (AR) inheritance in 14 families (35%), and an X-linked recessive inheritance in one family.

Conclusion: This study reveals large Algerian families with multigenerational inheritance of epilepsy. Molecular testing such as exome sequencing would clarify the genetic basis of epilepsy in some of our families.

© 2015 British Epilepsy Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction:

Epilepsy is the most common neurological condition, affecting more than 50 million people in the world, with a 3% risk of developing epilepsy across all ages [1,2]. A genetic contribution to epilepsy has been recognized since Antiquity and is well established through twin studies [3–5]. Family studies have also suggested the involvement of genetic factors in different forms of generalized and partial epilepsies, showing a higher risk of epilepsy in proband's first-degree relatives (children, siblings and parents) as compared to the general population [6,7].

During the past three years, novel technologies and an unprecedented level of international collaboration has resulted in the discovery of novel genes for monogenic epilepsies. Indeed, the use of massive parallel sequencing technologies has allowed for the identification of *PRRT2* as the long-sought gene for Benign Familial Infantile Seizures (BFIS) [8,9], and the *KCNT1* mutations in Malignant Migrating Partial Seizures of Infancy (MMPSI) and severe Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy (ADNFLE) [10,11]. In addition, we have recently identified a novel gene in one family with monozygotic twins affected by temporal lobe epilepsy. Exome sequencing revealed a novel de novo mutation (p.A39E) in the galanin gene, which acts as a potent anticonvulsant and regulate epileptic seizures in animal models. Functional analysis of the mutant galanin peptide showed antagonist effects on galanin receptor 1 (GalR1) and reduced agonist effects on GalR2. These

* Corresponding author. Tel.: +213 554650521; fax: +213 41465869.
E-mail address: amina.chentouf@yahoo.com (A. Chentouf).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2015.06.015>

1059-1311/© 2015 British Epilepsy Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

findings could potentially have direct implications for the development of anti-epileptic treatment [12].

During our fieldwork, we have identified many additional families with several members affected with epilepsy. While consanguineous marriages comprise 22–39% [13–15] of all marriages in Algeria, which may predispose offspring to rare autosomal recessive conditions, to our knowledge, there have been no reports describing the inheritance patterns of familial epilepsy in Algeria.

In this paper, we present genealogical analysis, clinical characteristics and the probable patterns of inheritance in 40 Algerian families with epilepsy in order to perform further genetic analysis for the detection of the pathogenic variation that may help in carrier detection and family planning.

2. Materials and methods

2.1. Family recruitment, inclusion criteria and clinical evaluation

This is a prospective study done at the Neurology Department at Oran University Hospital, which is the main regional hospital in Oran, from June 2011 to June 2014. Families were included when their past history showed that there are other affected members in the extended family.

All possibly affected individuals available underwent clinical evaluation; and whenever possible, EEG and MRI were performed. A bilingual trained psychiatrist (French-Arabic) assessed individuals with psychiatric disorders using the Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI).

Forty families agreed to participate in the study. A three-generation pedigree with details regarding seizures, congenital malformations, comorbidities and consanguinity in parents was drawn for each family using “Genial Pedigree” software (<http://www.pedigreedraw.com/>), through a structured interview that took 50–60 min. Interviews were done either on the telephone or in person and responses were crosschecked with family members who were invited to participate in the study.

We excluded from the study five patients for whom a parent was not available due to death, divorce or other reasons leading to inability to take full family history and difficulty in constructing a pedigree.

Pedigree analysis concluded that the inheritance pattern in a family was classified as autosomal dominant if there were multiple generations affected in a vertical pattern, and if both males and females were affected. It was classified as autosomal recessive if the affected individuals were seen in only one generation in a horizontal pattern, if males and females were affected and if parents were related. It was classified as X-linked recessive if only males were affected, if the affected males were related through putative carrier females, and if there was no male-to-male transmission. Considering the possibility of endogamous marriages, we proposed AR as the probable mode of inheritance when there were multiple affected in a sibship with non-affected parents who both originate from the same small village.

2.2. Seizure type and epileptic syndrome identification

We obtained information regarding seizure manifestations from patients as well as observers. We reviewed all available medical records, neurological examination, electroencephalography and imaging data. Based on the combined results, each patient's epilepsy was characterized, and whenever possible, classified.

2.3. Definitions

Seizures and epilepsy syndromes were classified according to the International League against epilepsy recommendations

[16,17]. Families were classified according to the proband's epilepsy syndrome. To ensure comparability with previous studies on the same field, we did not use the recommendations of the ILAE/2010 classification for seizures and epilepsies.

The proband was defined as the first affected family member who sought medical attention at hospital and met the inclusion and exclusion criteria.

We considered as “familial epilepsy” the occurrence of epilepsy in at least two members of the same family including the proband. First-degree relatives comprised parents, siblings, and children; second-degree relatives comprised grandparents, aunts, and uncles; and third-degree relatives comprised first cousins.

In clinical genetics, consanguinity is defined as a marital relationship between two individuals who share the same ancestor and the degree of consanguinity is not beyond second cousins. In this study, however, further genetic relations were also considered when assessing the mode of inheritance in order to include any possible founder mutations in this highly consanguineous population. Families are defined as phenotypically concordant if all affected relatives have the same clinical feature (epileptic syndrome or seizure type, age at onset, response to treatment and EEG findings).

Age of onset was defined as the age when the patient, his/her family members or friends first noticed the disease. We defined controlled epilepsy as the absence of seizures for at least six months.

The likely modes of inheritance were based on the family pedigree that was documented in the file.

The purpose of the study was explained to the patient/family and informed consent was obtained from patients, parents or legal guardians.

2.4. Statistical analysis

The collected data were coded and entered into the SPSS 21.0 for Mac OS X. We conducted a descriptive analysis of cases involving the calculation of averages and standard deviations for quantitative variables and percentages for categorical variables.

3. Results

3.1. Family features

Forty families with two or more members affected by idiopathic epilepsy participated in the study. We collected data from 907 subjects, of whom 156 (17.2%) showed epilepsy. The mean number of individuals (both with and without epilepsy) was 22.7 per family with a mean of 4-affected individuals per family.

In addition to the 40 probands, 61 first-, 17 second- and 19 third-degree relatives had epilepsy. In the collected sample, only two sets of monozygotic twins were present. Consanguinity was reported among parents in 20 out of 40 families with 16 (40%) first cousins and 4 (10%) second cousins. In 25 families (62.5%) affected members shared the same phenotype for epilepsy, while the others appeared to have a range of different phenotypes.

With regard to epileptic features in general, pedigrees were compatible with autosomal dominant (AD) inheritance with or without reduced penetrance in 18 families (45%). In 14 families (35%), an autosomal recessive (AR) transmission could also be hypothesized, and an X-linked recessive inheritance (XR) was assigned in only one family. In the remaining families, the pedigree analysis was inconclusive or suggested more than one possible mode of inheritance (Fig. 1a and b).

3.2. Proband's clinical data

There were 23 male (57.5%) and 17 female subjects (42.5%) in the study group, with ages ranging from 4 to 59 years (mean

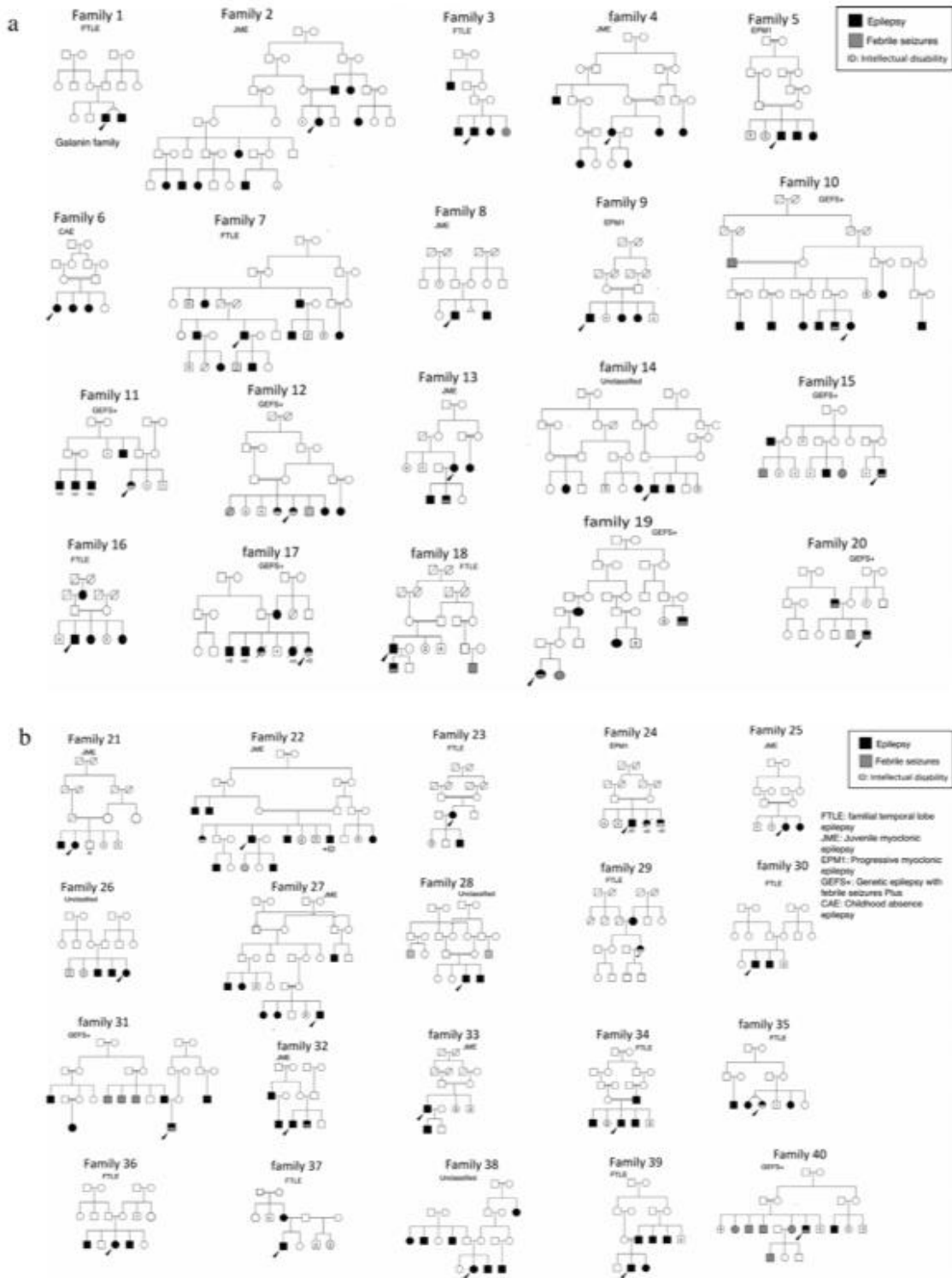


Fig. 1. Pedigrees of the 40 families.

27.7 ± 13.2 years). This was a predominantly adult population (72.5% were over 18 years). The age of seizure onset ranged from three months to 22 years (mean: 9.5 ± 6.1 years). According to seizure onset, 16 patients (40%) had focal seizures and 20 (50%) had generalized seizures. The remaining four patients (10%) could not be classified as having either focal or generalized seizures because both partial and generalized onset seizures were noted.

Among all probands, 11 (27.5%) had prior febrile seizures (FS) and 8 of them (72.7%) had family history of FS.

The distribution of probands with respect to ILAE epilepsy syndrome diagnosis is summarized in Table 1.

Twenty-four patients (60%) were on monotherapy, twelve (30%) were on two antiepileptic medications, and two (5%) were on

three antiepileptic drugs. The most common antiepileptic medications used were valproic acid (22/40, 55%), carbamazepin (11/40, 27.5%) and levetiracetam (8/40, 20%).

At the time of analysis, seizure control was achieved in 21 patients (52.5%) using mono or polytherapy. 28 (70%) were seizure-free for 3 months and two (5%) have been weaned for 10 years. The other twelve patients (30%) continued to experience seizures despite trials of several antiepileptic medications.

Two probands were diagnosed with intellectual disability and 12 with a psychiatric comorbidity: 4 with depression, 6 with anxiety, one with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and one with schizophrenia; all were under psychiatrist follow up (AD).

Table 1
Clinical features, EEG findings and the probable modes of inheritance in the 40 families.

Proband according to family number	Age at onset (years)	Seizure type	Epilepsy syndrome	EEG findings	Neurological examination	Probable mode of inheritance
1 (Galanin family)	13	Complex partial	FTLE	Focal temporal spikes	Normal	De novo [15]
2	15	Myoclonic	JME	Generalized polyspikes	Normal	AD reduced penetrance
3	18	Simple partial	FTLE	Focal slow waves	Normal	AD reduced penetrance
4	18	Myoclonic	JME	Generalized polyspikes	Normal	AD reduced penetrance? AR?
5	10	Myoclonic	EPM1	Generalized Polyspikes and waves photosensitivity	Dysarthria, ataxia	AR
6	5	Absence	CAE	Generalized 3Hz spike waves	Normal	AR
7	15	Complex partial	FTLE	Central and temporo-parietal spikes	Normal	AD
8	11	Myoclonic	JME	Generalized polyspikes waves	Normal	XR? AD with reduced penetrance?
9	11	Myoclonic	EPM1	Diffuse spikes and polyspikes	Cerebellar ataxia, ID	AR
10	2	Myoclonic	GEFS+	Photosensitivity	Normal	AD reduced penetrance? AR?
11	3	Generalized tonic-clonic	GEFS+	Generalized spike waves	Normal	AD
12	4	Unknown	GEFS+	Focal temporo-parietal epileptic activity	Normal	AR
13	5	Myoclonic	JME	Generalized polyspikes	Normal	AR
14	11	Generalised tonic clonic	Unclassified	Normal	Blindness, deafness, ID	AR
15	5	Complex partial	GEFS+	Focal parieto-occipital epileptic activity	Normal	AD reduced penetrance
16	16	Complex partial	FTLE	Focal spikes in temporo-parietal region	Normal	AD reduced penetrance
17	4	Generalised tonic clonic	GEFS+	Diffuse slowing	Spastic paraplegia IDAD	
18	1	Simple partial	FTLE	Frontal and temporal spikes	Normal	AD
19	1	Generalised tonic clonic	GEFS+	Focal temporo-parietal spikes	Normal	AD? AR?
20	12	Complex partial	GEFS+	Temporal spike-waves	Normal	AD
21	17	Myoclonic	JME	Generalized polyspikes	Normal	AR
22	17	Myoclonic	JME	Generalized polyspikes	Normal	AR
23	16	Complex partial	FTLE	Temporo-occipital spikes	Blindness	AD
24	6	Myoclonic	EPM1	Generalized polyspikes	Dysarthria, ataxia ID	AR
25	9	Myoclonic	JME	Generalized polyspikes	Normal	AR
26	22	Unknown	Unclassified	Normal	Normal	AD
27	9	Myoclonic	JME	Generalized polyspikes	Normal	AD reduced penetrance? AR?
28	15	Complex partial	Unclassified	Slow waves in occipital regions	Normal	AD reduced penetrance? AR?
29	3	Complex partial	FTLE	Temporal epileptic activity	Normal	AD?
30	10	Complex partial	FTLE	Fronto-temporal spikes	Normal	XR
31	1	Simple partial	GEFS+	Generalized epileptic activity	Normal	AR
32	8	Myoclonic	JME	Spike waves in frontal region	Normal	AD variable penetrance
33	1	Myoclonic	JME	Generalized polyspikes	Normal	AD
34	12	Complex partial	FTLE	Focal spikes in temporal region	Normal	AD? AR?
35	4	Unknown	FTLE	Normal	Normal	AD variable penetrance
36	15	Generalized tonic clonic	FTLE	Normal	Normal	AD
37	19	Simple partial	FTLE	Temporal spikes	Normal	AD
38	1	Unknown	Unclassified	Multifocal spikes	Microcephaly ID	AD variable penetrance
39	4	Complex partial	FTLE	Temporal and occipital spikes	Normal	AD
40	14	Complex partial	GEFS+	Frontal epileptic activity	Normal	AD

AD: Autosomal dominant, AR: autosomal recessive, XR: X-linked recessive, CAE: childhood absence epilepsy, JME: juvenile myoclonic epilepsy, EPM1: progressive myoclonic epilepsy type 1, GEFS+: genetic epilepsy with febrile seizure plus, FTLE: familial temporal lobe epilepsy, ID: intellectual disability, ADHD: attention deficit hyperactivity disorder.

Clinical features, neurological examination, EEG findings and the probable modes of inheritance are summarized in Table 1. Brain imaging (CT scan or MRI) was normal in all cases.

In families 5,9,14 and 24, epilepsy was associated with other manifestations such as intellectual disability, ataxia and blindness, probably due to undiagnosed autosomal recessive syndromes (Table 1).

4. Discussion

Familial epilepsy encompasses several different syndromes, which are generally diagnosed by clinical features. The key element in making the correct diagnosis is obtaining a comprehensive clinical history and establishing a detailed pedigree.

The availability of extensive genealogical data can provide large pedigrees, potentially very informative for genetic analysis.

We present here the clinical profile and inheritance pattern of familial idiopathic epilepsies in Algerian families. In this study, the population sample was taken from Oran, the major city on the northwestern Mediterranean coast of Algeria with a population of approximately 1,500,000. Many of our patients originate from Sidi Ali, a small village about 80 km away from Oran. Previous reports have ascertained a high rate of consanguineous unions of up to 34% in Tlemcen, a region about 150 km away from Oran [13]. Given the existence of numerous large and multigenerational pedigrees with several affected members, the Oran are thus emerging as an interesting population for genetic research on the epilepsies.

In this study, 40% of parents of affected individuals were first cousins. This is in line with the results of a recent study conducted in Oran and which recognized parental consanguinity as significant risk factor for both monogenic and polygenic epilepsies ($p = 0.029$) [18].

Similar results have been reported in other inbreeding populations. For instance, Masri et al. reported a high rate of parental consanguinity (61.3%) among 31 Jordanian families with familial childhood epilepsy [19]. Premarital counselling for couples who have a family history of epilepsy is recommended.

Epilepsy was more frequent in first- than in second-degree relatives. We have already shown in a previous study involving subjects belonging to the same region that family history of epilepsy in first-degree relatives increased significantly the risk of developing epilepsy ($p < 10^{-4}$) [18]. Similarly, in a large Turkish cohort of 3098 epileptic patients, 19.9% had at least one epileptic family member with first-degree relatives being twice more affected than second-degree relatives (202/94) [20].

Most families (62.5%) shared the same phenotype while the remaining appeared to have a range of different epilepsy phenotypes. This finding could have two possible interpretations: It could be that certain variants may predispose to a relatively narrow clinical phenotype while others result in a much more varied phenotype or that this clinical heterogeneity could reflect the possibility that individuals within some families may possess additional genetic variants or share non-genetic factors that influence phenotypic expression.

In our study population, there was a slight male predominance of 23M/17F. Most studies of epilepsy indicate that males are more frequently affected than females, although the difference is seldom statistically significant [21].

The mean age at seizure onset was around 10 years, probably because of the predominance in our sample of epilepsy syndromes starting in adolescence or later, such as juvenile myoclonic epilepsy [22], progressive myoclonic epilepsy [23,24], and familial temporal lobe epilepsy [25].

Among probands, 40% had partial seizures and 50% had generalized seizures. This is in agreement with studies from the Arab countries, which had found partial seizures less common than

generalized seizures [26] matching Asian and sub-Saharan African studies [27,28]. In USA, Abou Khalil reported that patients with generalized epilepsy were more likely to have first and second degree relatives with than those with partial epilepsy (40.2% versus 31.2%, $p = 0.001$) [29].

Prior febrile seizures (FS) were reported among 11 probands (27.5%), and three quarters of them had a family history of FS. These results are consistent with those of Abou Khalil et al., who reported that epileptic patients with prior FS were more likely to have a family history of FS than those without prior FS ($p < 0.000001$). In a multivariate analysis, Hwang identified family history of epilepsy as a significant predictor of unprovoked seizures after FS ($p = 0.019$) [30]. This finding suggests that FS represent an early expression of a low seizure threshold in patients genetically predisposed to epilepsy. Indeed, FS can be the gateway to numerous genetic epileptic syndromes such as Genetic Epilepsy with Febrile Seizures Plus (GEFS+) [31], epileptic syndrome by febrile infection (FIRE) [32], severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) [33] and temporal lobe epilepsy (TLE) [29,34].

Only 60% were seizure-free for three months, while 40% continued experiencing seizures. This could be explained by the fact that many patients had myoclonic epilepsy (juvenile or progressive) known to be drug-resistant or drug dependant. It should also be noted that some patients did not observe correctly the prescribed treatment.

Psychiatric comorbidities were reported among 12 probands (30%). In recent years, several studies have shown clear links between epilepsy and various neuropsychiatric disorders including psychosis and depression. Rates of mood disorders ranged from 25% to 48% and anxiety disorders from 14% to 31% [35,36]. Rates of major depressive episodes are increased in patients with epilepsy and range from 11% to 62%, compared with 3.7% to 6.7% for the general population [37]. Furthermore, the percentage of deaths by suicide in patients with epilepsy ranges from 11% to 33%, with an overall average of 11.5% [38]. The association of epilepsy with psychosis is also striking, where the prevalence of the interictal psychosis of epilepsy ranges in different studies between 4.3% and 44%. In a recent review, rates of 19.4% and 15.2% in generalized epilepsies (GE) and TLE groups, respectively, were reported [39].

Very recently, it has become clear that neuropsychiatric disorders may share common genetic variation with epilepsy. Indeed, genetic studies of copy number variants (CNVs) have shown that in some cases, the same CNV occurs in neuropsychiatric illness and epilepsy. Several studies have demonstrated an association between large rare recurrent CNVs and epilepsy, autism, schizophrenia, mental retardation, and attention deficit hyperactivity disorder [40,41]. Of particular relevance is the observation that an individual CNV can contribute risk to more than one type of neuropsychiatric disorder. This has led to the suggestion that schizophrenia, autism, and intellectual disability may be rather overlapping phenotypes from shared disturbed neural development [42].

There were 13 families with TLE: 7 families had features consistent with mesial TLE (simple partial seizures with intense feelings of déjà vu at times associated with dizziness or nausea, complex partial seizures with altered awareness and staring) and 6 families had autosomal dominant epilepsy with auditory features (ADEAF) previously denoted as autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. An AD trait was deduced in 76.9% of these families (Table 1). It is well known that ADEAF follows AD inheritance with decreased penetrance. Thus, by analysing data from 24 previously published families with ADEAF and mutations in the leucin-rich glioma inactivated gene (*LGI1*), Rosanoff and Otman found that the overall penetrance of the disorder was 67% and did not vary according to mutation type or location in the gene [43]. Hedera et al. reported a 4-generation Caucasian family in

which 11 living individuals had features consistent with mesial TLE. Three unaffected family members had affected offspring, suggesting AD inheritance with incomplete penetrance [44].

Juvenile myoclonic epilepsy (JME) was reported in 9 families. Pedigrees were compatible with a probable AD inheritance in 3 families and AR in 4 families. In the remaining two families, pedigree analysis suggested more than one possible mode of inheritance. The exact type of inheritance in JME is currently not known; the rare family and genetic studies indicate rather contradictory modes: AD, AR, maternal or complex [45].

Three families had Progressive Myoclonic Epilepsy type 1 (EPM1) with AR pattern of inheritance. EPM1 or Unverricht-Lundborg disease (ULD) is an AR neurodegenerative disorder characterized by action- and stimulus-sensitive myoclonus, tonic-clonic seizures, progressive cerebellar ataxia, preserved cognition, and poor outcome. Mutations in the gene encoding cystatin B (CSTB), a cysteine protease inhibitor, are responsible for the primary defect underlying EPM1 [46].

In our study population, there were 9 families with GEFS+ phenotype. Five families showed an AD probable mode of inheritance and two others an AR pattern. To our knowledge, all GEFS+ families, described in OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man—<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) data base, exclusively show an AD mode of inheritance. Recently, Belhedi et al. described the first consanguineous GEFS+ Tunisian family with a putative AR mode of inheritance, a transmission previously described in a Moroccan consanguineous family, showing FS and temporal lobe epilepsy phenotypes [47].

Only one family showed CAE with AR trait. Familial form of typical childhood absence epilepsy with an AR mode of inheritance was also reported in five Tunisian consanguineous families [48]. Four of our families (10%) had syndromic epilepsy with suggested autosomal recessive inheritance pointing to the significant role of consanguinity in the expression of rare recessive variants.

5. Limitations of the study

Our study has several limitations including the relatively small sample size. It was a clinic-based study and may not represent the full spectrum of familial epilepsies. Furthermore, patient and family recall of epilepsy carried an inherent risk of incompleteness or inaccuracy.

Due to the unavailability of ictal EEG recording, we were unable to classify seizure type in four patients with some atypical features.

6. Conclusion

This study confirms that there are large families in the Algerian population with multigenerational inheritance of familial epilepsy and phenotypic heterogeneity.

Seizures are well controlled in most cases except in myoclonic syndromes, which are more difficult to deal with despite trials of several antiepileptic drugs. Psychiatric disorders are often associated with epilepsy suggesting possible common genetic underpinnings.

Autosomal recessive mode of inheritance was proposed in 35% of our cases of familial epilepsy. The higher rate of consanguineous unions reported in our population probably contributes to the genetic epilepsy types encountered.

Our cohort of families with epilepsy represents a valuable resource for the identification of novel epilepsy genes. Further, molecular testing such as deep sequencing for rare variants could be used to clarify the genetic basis of epilepsy in some of our families.

Conflict of interest statement

The author has not received any financial support to produce this work, and has no relationship to people or organization that would influence this work. The author otherwise has nothing to disclose.

Acknowledgement

We are indebted to our patients with epilepsy and their families for their helpful cooperation and encouragement in our research.

References

- [1] Banerjee PN, Filippi D, Allen Hauser W. The descriptive epidemiology of epilepsy—a review. *Epilepsy Res* 2009;85(1):31–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2009.03.003> [PubMed: 19369037].
- [2] World Health Organization Fact sheet. World Health Organization; 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html> [accessed March 2013].
- [3] Corey LA, Berg K, Pellock JM, Solaas MH, Nance WE, DeLorenzo RJ. The occurrence of epilepsy and febrile seizures in Virginian and Norwegian twins. *Neurology* 1991;41(9):1433–6 [PubMed: 1891093].
- [4] Berkovic SF, Howell RA, Hay DA, Hopper JL. Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Ann Neurol* 1998;43(4):435–45 [PubMed: 9546323].
- [5] Helbig I, Scheffer IE, Mulley JC, Berkovic SF. Navigating the channels and beyond: unravelling the genetics of the epilepsies. *Lancet Neurol* 2008;7(3):231–45. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70039-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70039-5) [PubMed: 18275925].
- [6] Anderson VE, Wilcox KJ, Rich SS, et al. Twin studies in epilepsy. In: Beckmann-Gaeta G, Anderson VE, Doose H, Janz D, editors. *Genetics of the epilepsy*. Heidelberg: Springer; 1989. p. 145–55.
- [7] Ottman R, Engel J, Pedley TA, editors. *Family studies in epilepsy: a comprehensive textbook*. Lippincott-Raven Publ.; 1997. p. 177–83.
- [8] Heron SE, Crinton BE, Kivity S, et al. PRRT2 mutations cause benign familial infantile epilepsy and infantile convulsions with choreoathetosis syndrome. *Am J Hum Genet* 2012;90(1):152–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.12.003> [PubMed: 22243967].
- [9] Schubert J, Paravidino R, Becker F, et al. PRRT2 mutations are the major cause of benign familial infantile seizures. *Hum Mutat* 2012;33(10):1439–43. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.22126> [PubMed: 22623405].
- [10] Heron SE, Smith KR, Bahlo M, et al. Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene KCNT1 cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* 2012;44(11):1188–90. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2440> [PubMed: 23086396].
- [11] Barcia G, Fleming MR, Deligniere A, et al. De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nat Genet* 2012;44(11):1255–9. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2441> [PubMed: 23086397].
- [12] Guipponi M, Chentouf A, Kristin EB Webling, Freimann Krista, Crespel Arielle, Nobile Carlo. Galanin pathogenic mutations in temporal lobe epilepsy. *Hum Mol Genet* 2015;24(11):3082–91. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddv060> [PubMed: 25691535].
- [13] Zaoui S, Biémont C. Frequency of consanguineous unions in the Tlemcen area (West Algeria). *Sante* 2002;12(3):289–95 [PubMed: 12473522].
- [14] Benallègue A, Kedji F. Consanguinity and public health. Algerian study. *Arch Fr Pediatr* 1984;41(6):435–40 [PubMed: 6487047].
- [15] Anwar WA, Khyatti M, Hemminki K. Consanguinity and genetic diseases in North Africa and immigrants to Europe. *Eur J Public Health* 2014;24(Suppl 1):57–63. <http://dx.doi.org/10.1093/eurpub/cku104> [PubMed: 25107999].
- [16] Engel J. Report of the ILAE classification core group. *Epilepsia* 2006;47(9):1558–68 [PubMed: 16981873].
- [17] ILAE task force on classification and terminology. *Syndromes Epilepsies* 2008.
- [18] Chentouf A, Talhi R, Dahdouch A, et al. Consanguinity and epilepsy in Oran Algeria: a case-control study. *Epilepsy Res* 2015 Mar;111:10–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2009.03.003> [PubMed: 25769368].
- [19] Masri A, Hamamy H. Clinical and inheritance profile of familial childhood epilepsy in Jordan. *Seizure* 2013;22(6):443–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2013.02.017> [PubMed: 23522625].
- [20] Sozmen V, Baybas S, Dirican A, Koksak A, Ozturk M. Frequency of epilepsies in family members of patients with different epileptic syndromes. *Eur Neurol* 2011;65(1):4–9. <http://dx.doi.org/10.1159/000322125> [PubMed: 21109740].
- [21] Hauser WA, Annegers JF, Rocca WA. Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 1996;71:576–86 [PubMed: 8642887].
- [22] Emilija Cvetkovska, Panov Sasho, Kuzmanovski Igor. Clinical genetic study in juvenile myoclonic epilepsy. *Seizure* 2014;23:903–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2014.07.011> [PubMed: 25108570].
- [23] Shahwan A, Farrell M, Delanty N. Progressive myoclonic epilepsies: a review of genetic and therapeutic aspects. *Lancet Neurol* 2005;4(4):239–48 [PubMed: 15778103].

- [24] Magaouda A, Ferlazzo E, Nguyen VH, Genton P, Unverricht-Lundborg disease, a condition with self-limited progression: long-term follow-up of 20 patients. *Epilepsia* 2006;47(5):860–6 [PubMed: 16686650].
- [25] Aguglia U, Gambardella A, Le Plane E, et al. Mild nonlesional temporal lobe epilepsy. A common, unrecognized disorder with onset in adulthood. *Can J Neurol Sci* 1998;25(4):282–6 [PubMed: 9827228].
- [26] Hamdy NA. Prevalence of epilepsy in primary school children in Elminia city, Egypt. *Egypt J Neurol Psychiat Neurosurg* 2009;46(1):33–9.
- [27] Preux PM, Druet-Cabanac M. Epidemiology and aetiology of epilepsy in sub-Saharan Africa. *Lancet Neurol* 2005;4(1):21–31 [PubMed: 15620854].
- [28] Mac TL, Tran DS, Quet F, Odermatt P, Preux PM, Tan CT. Epidemiology, aetiology, and clinical management of epilepsy in Asia: a systematic review. *Lancet Neurol* 2007;6(6):533–43 [PubMed: 17509488].
- [29] Abou-Khalil B, Krei L, Lazenbya B, Harris PA, Haines JL, Hedera P. Familial genetic predisposition, epilepsy localization and antecedent febrile seizures. *Epilepsy Res* 2007;73(1):104–10 [PubMed: 17046202].
- [30] Hwang G, Kang HS, Park SY, Han KH, Kim SH. Predictors of unprovoked seizure after febrile seizure: short-term outcomes. *Brain Dev* 2015;37(3):315–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2014.06.003> [PubMed: 24985020].
- [31] Goldberg-Stern H, Aharoni S, Afawi Z, Bennett O, Appenzeller S, Pendizwiat M, et al. Broad phenotypic heterogeneity due to a novel SCN1A mutation in a family with genetic epilepsy with febrile seizures plus. *J Child Neurol* 2014;29(2):221–6. <http://dx.doi.org/10.1177/0883073813509016> [PubMed: 24257433].
- [32] Moreno de Flagge N. Simple febrile seizure, complex seizure, generalized epilepsy with febrile seizure plus, FIRES and new syndromes. *Medicina (B Aires)* 2013;73(1):63–70 [PubMed: 24072053].
- [33] Brunklaus Zuberi. Dravet syndrome from epileptic encephalopathy to chanelopathy. *Epilepsia* 2014;55(7):979–84. <http://dx.doi.org/10.1111/epi.12652> [PubMed: 24836964].
- [34] McClelland S, Dubé CM, Yang J, Baram TZ. Epileptogenesis after prolonged febrile seizures: mechanisms, biomarkers and therapeutic opportunities. *Neurosci Lett* 2011;497(3):155–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2011.02.032> [PubMed: 21356275].
- [35] Brandt C, Schoedienst M, Trentowska M, et al. Prevalence of anxiety disorders in patients with refractory focal epilepsy—a prospective clinic based survey. *Epilepsy Behav* 2010;17(2):259–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.12.009> [PubMed: 20075009].
- [36] Sanchez-Gistau V, Pintor L, Sugranyes G, et al. Prevalence of interictal psychiatric disorders in patients with refractory temporal and extratemporal lobe epilepsy in Spain. A comparative study. *Epilepsia* 2010;51(7):1309–13. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02464.x> [PubMed: 20041944].
- [37] Elliott B, O'Donovan J. Psychiatric disorders. In: Shorvon S, Andermann F, Guerrini R, editors. *The causes of epilepsy*. Cambridge: Cambridge Univ. Press; 2011. p. 593–606.
- [38] Verrotti A, Ciconetti A, Scorrano B, Ferro F. Epilepsy and suicide: pathogenesis, risk factors and prevention. *Neuropsychiatric Disord Treat* 2008;4(2):337–70 [PubMed: 18728742].
- [39] Elliott B, Joyce E, Shorvon S. Delusions, illusions and hallucinations in epilepsy: 2. Complex phenomena and psychosis. *Epilepsy Res* 2009;85(2–3):172–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2009.03.017> [PubMed: 19442490].
- [40] Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 2007;316(5823):445–9 [PubMed: 17363630].
- [41] Heinzen EL, Radtke RA, Urban TJ, et al. Rare deletions at 16p13.11 predispose to a diverse spectrum of sporadic epilepsy syndromes. *Am J Hum Genet* 2010;86:707–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.03.018> [PubMed: 20398883].
- [42] Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL, et al. Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Arch Gen Psychiatry* 2009;66:947–56. <http://dx.doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.80> [PubMed: 19736351].
- [43] Rosanoff M, Ottman R. Penetrance of LGII mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology* 2008;71(8):567–71. <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000323926.77565.ee> [PubMed: 18711109].
- [44] Hedera P, Blair MA, Andermann E, et al. Familial mesial temporal lobe epilepsy maps to chromosome 4q13.2-q21.3. *Neurology* 2007;68(24):2107–12 [PubMed: 17377072].
- [45] Cvetkovska E, Panov S, Kuzmanovski I. Clinical genetic study in juvenile myoclonic epilepsy. *Seizure* 2014;23(10):903–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2014.07.011> [PubMed: 25108570].
- [46] Lehesjoki AE. Clinical features and genetics of Unverricht-Lundborg disease. *Adv Neurol* 2002;89:193–7 [PubMed: 11968445].
- [47] Belhedi N, Bena F, Mrabet A, Guipponi M, Souissi C, Khiari H. A new locus on chromosome 22q13.31 linked to recessive genetic epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) in a Tunisian consanguineous family. *BMC Genet* 2013 Sep 25;14:93. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2156-14-93> [PubMed: 24067191].
- [48] Abouda H, Hizem Y, Gargouri A, et al. Familial form of typical childhood absence epilepsy in a consanguineous context. *Epilepsia* 2010;51(9):1889–93. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02649.x> [PubMed: 20561625].



Consanguinity and epilepsy in Oran, Algeria: A case–control study



Amina Chentouf^{a,*}, Randa Talhi^b, Aicha Dahdouh^c,
Latifa Benbihi^a, Soumia Benilha^b, Mohand Laid Oubaiche^a,
Malika Chaouch^d

^a Department of Neurology, Oran University Hospital, 31000, Algeria

^b Department of Biostatistics, Faculty of Medicine, Oran 31000, Algeria

^c Department of Psychiatry, Oran University Hospital, 31000, Algeria

^d Department of Neurologie, Benaknoun University Hospital, Algiers 16000, Algeria

Received 15 September 2014; received in revised form 27 December 2014; accepted 30 December 2014
Available online 8 January 2015

KEYWORDS

Epilepsy;
Consanguinity;
Risk factors;
Oran;
Algeria

Summary

Purpose: The goal of this case–control study was to identify the significance of consanguinity and other risk factors for epilepsy in Oran, Algeria.

Methods: Unrelated epileptic patients upwards of 16 years, who attended the Neurology Department between October 2013 and March 2014 were included in the study. Controls, matched for age and sex, were selected among non-epileptic patients attending the same department during the same period. The risk factors evaluated were: consanguinity, family history of epilepsy, perinatal complications, infection of the central nervous system, mental retardation, neurological impairment, history of febrile seizures, severe head trauma, cerebrovascular diseases, and addiction.

Results: 101 cases and 202 controls participated in the study. Multivariate logistic regression identified five factors significantly associated with epilepsy: first-degree of consanguinity (odds ratio (OR) = 2.15), history of epilepsy in first-degree relatives (OR = 4.03), antecedent of febrile seizures (OR = 5.38), severe head injury (OR = 2.94) and mental retardation (OR = 9.32).

Conclusion: Consanguinity, family history of epilepsy, history of febrile seizures, severe head trauma and mental retardation are risk factors for epilepsy. The implementation of a strategy for prevention and awareness of the impact of consanguineous marriages as well as genetic counseling for couples with a family history of epilepsy are needed.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Department of Neurology, University Hospital, Oran 31000, Algeria. Tel.: +213 41465869; fax: +213 41465869.
E-mail address: amina.chentouf@yahoo.com (A. Chentouf).

Introduction

Consanguinity is a reproductive relationship between two individuals who share a common ancestor. In other words, consanguineous marriages refer to marriages contracted between individuals biologically related. These unions are still widespread especially in the Middle East and North Africa where they are favored by traditions and cultural practices (Dahdouh-Guermouche et al., 2013). Such inbreeding is associated with an increased rate of birth defects and perinatal mortality. In addition, the offspring of consanguineous marriages are at increased risk of recessive diseases due to the expression of autosomal recessive genetic mutations inherited from a common ancestor. The closer the biological relationship between the parents, the greater the likelihood that their offspring will inherit one or more of the same harmful recessive genes copies (Hamamy et al., 2011).

Epilepsy is a brain disease defined by any of the following conditions: (1) at least two unprovoked (or reflex) seizures occurring >24 h apart; (2) one unprovoked (or reflex) seizure and a probability of further seizures similar to the general recurrence risk (at least 60%) after two unprovoked seizures, occurring over the next 10 years; (3) diagnosis of an epilepsy syndrome (Fisher et al., 2014). According to data from WHO, there are 50 million people with epilepsy worldwide, 80% in developing countries (World Health Organization, 2005). Despite new exploration techniques, the etiology remains unknown in almost two thirds of cases (Sander, 2003). Over the past three decades, several case-control studies on epilepsy have been conducted (Rocca et al., 1987; Casetta et al., 2002; Ogunniyi et al., 1987; Edwards et al., 2008). Although these studies have identified numerous risk factors associated with epilepsy, the results were highly variable. While stroke and head injury have been implicated as factors for adults from high-income countries (Guekht et al., 2010; Pi et al., 2014), epilepsy was associated with parasitic diseases, perinatal insults and central nervous system (CNS) infections in developing countries (Ogunrin et al., 2013; Asadi-Pooya and Hojabri, 2005; Osakwe et al., 2014).

The association of epilepsy with inbreeding has been poorly studied in developed countries probably because of the scarcity of family inbreeding in these populations (0.2% in the U.S., 0.8% in France, 1.1% in Italy and 0.2% in Australia) (Romeo et al., 1981; Port and Bittles, 2001). In the Arab world where first-degree consanguineous marriages represent more than 60% of all unions (Etude, 2007), the association to epilepsy has been suggested by some studies (Asadi-Pooya, 2005; Choueiri et al., 2001; Khedr et al., 2013; Benamer and Grosset, 2009; Bourrous et al., 2010) and refuted by others (Daoud et al., 2003; Cansu et al., 2007; Huseyinoglu et al., 2012; Yemadje et al., 2012).

In Algeria, where the prevalence of epilepsy is estimated at 8.32/1000 (Moualek et al., 2012) and the rate of inbreeding at 38% (18% in Oran) (Fondation, 2007), very few epidemiological studies on epilepsy have been published and none has evaluated the association with risk factors.

Given the important role attributed to inbreeding in the development of birth defects and genetically determined diseases such as hemoglobinopathies, hereditary hearing loss, G6PD deficiency, encephalopathies and schizophrenia

(Dahdouh-Guermouche et al., 2013); and given also the heterogeneity of existing data, it seemed necessary to conduct an epidemiological survey based on two aims – assessing the relationship between epilepsy and inbreeding in those patients 16 years and older treated at the Neurology Department of Oran University Hospital; and identifying other risk factors associated with epilepsy in the same population.

Materials and methods

We conducted an analytical retrospective matched case-control study over six months – from October 1st, 2013 to March 31st, 2014.

Study population

We included 101 unrelated epileptic patients aged 16 years and over, presenting to the Neurology Department of Oran University Hospital (the main general Neurology clinic in this city) between October 1st, 2013 and March 31st, 2014. Patients having a history of febrile convulsions without epilepsy were not included in the study.

202 controls having no personal history of epilepsy, matched for age and sex, were selected among patients attending the same clinic during the same period but for another neurological disorder.

The number of subjects needed (2 controls per case) was calculated by the software BiostaTGV using a first order risk of 5%, a power of 80%, and taking as reference the lowest OR (2.11 found in an Indian study, Nair and Thomas, 2004) and the frequency of inbreeding in Oran (18% according to data from the National Foundation for the Promotion of Health and Development Research in 2007).

Data of cases and controls were obtained using a pre-validated and structured questionnaire conducted through personal interviews after an informed consent was signed.

Definitions

Epilepsy definition and seizure type description followed the criteria of the International League Against Epilepsy (Berg et al., 2005). Inbreeding was defined as a reproductive relationship between two individuals who share the same ancestor. The degree of consanguinity was determined by the total number of generations separating two individuals from their common ancestor (Dahdouh-Guermouche et al., 2013). A family history of epilepsy was considered positive if at least one family member (among first-, second- or third-degree relatives) was affected by epilepsy in addition to the proband. First-degree relatives comprise parents, siblings, and children; second-degree relatives comprise grandparents, grandchildren, aunts, uncles, nieces and nephews; and third-degree relatives comprise cousins. Febrile seizures were defined as seizures accompanied by fever (temperature $\geq 100.4^{\circ}\text{F}$ or 38°C by any method) without CNS infection, that occurs in infants and children from 6 to 60 months of age (Subcommittee on Febrile Seizures and American Academy of Pediatrics, 2011). Head injury was considered severe if accompanied by loss of consciousness for more than 24 h, subdural hematoma or brain contusion

(Lowenstein, 2009). History of CNS infection was considered significant if meningitis or encephalitis was confirmed by lumbar puncture showing an inflammatory cellular response. The presence of perinatal insults was based on history of admission to a neonatal intensive care facility or respiratory distress at birth. Mental retardation (MR) was defined according to the classification system of the DSM IVTR by an intelligence quotient (IQ) less than 70, onset before age 18, and the existence of deficits or alterations in the functioning adaptive (Juhel, 1997).

Statistical analysis

The collected data were coded and entered into the SPSS 21.0 for Mac OS X. First, we conducted a descriptive analysis of cases involving the calculation of averages and standard deviations for quantitative variables and percentages for categorical variables. Univariate analysis (chi-square) was carried out to determine factors influencing the patient and control groups. The relative risk factors included in the univariate analysis were estimated by odds ratio (OR) and the 95% confidence interval (CI) calculated. Variables significant at the 5% nominal level were considered for multivariate analysis by logistic regression backward: conditional.

Results

A total of 303 individuals including 101 cases and 202 controls participated in the study. The M/F ratio in both case and control patients was 1.29. The mean age was 37 years and six months \pm 14 years, ranging from 16 to 67 years. Thirty-eight subjects (9.2%) were under 20 years and twenty-three (7.6%) were older than 60 years. The rate of parental consanguinity was 36.6% in cases and 17.3% in controls.

The mean duration of follow-up in cases was 7 years and 4 months \pm 4 years, with a minimum of two years and a maximum of 25 years. The medium age at seizure onset was 17 \pm 9 years. Table 1 shows clinical characteristics of cases.

Univariate analysis

In univariate analysis, consanguinity, family history of epilepsy in first- and second-degree relatives, history of febrile seizures, antecedent of CNS infection, severe head trauma and mental retardation were found to be significantly associated with epilepsy (Table 2). Those factors were entered into multiple logistic regression models, with probability for entry of the variables fixed at 0.05 and that for removal at 0.10.

Multiple regression analysis

In the final multivariate model, first-degree consanguinity (2.15, 1.08–4.30, $P=0.029$), history of epilepsy in first-degree relatives (4.03, 1.88–8.66, $P=0.000$), antecedent of febrile seizures (5.38, 1.65–17.56, $P=0.005$), mental retardation (9.32, 1.91–45.5, $P=0.006$) and severe head trauma (2.94, 1.18–7.27, $P=0.020$) emerged as strong independent risk factors of epilepsy (Table 3).

Table 1 Characteristics of 101 cases.

Characteristics of cases	N (%)
Type of seizures	
Generalized	52 (51.5)
Focal	45 (44.5)
Unclassified	3 (4.0)
Status epilepticus	8 (7.9)
Syndromic classification	
Genetic	21 (20.9)
Familial temporal lobe epilepsy	10 (9.9)
Progressive myoclonic epilepsy	3 (3)
Juvenile myoclonic epilepsy	4 (4)
Genetic epilepsy with febrile seizures plus	3 (3)
Juvenile absence epilepsy	1 (1)
Structural/metabolic	32 (31.6)
Unknown	48 (47.5)
Seizure control	83 (82.2)
Antiepileptic drug	
Valproic acid	32 (31.7)
Carbamazepin	24 (23.7)
Levetiracetam	19 (18.8)
Lamotrigin	9 (8.9)
Polytherapy	17 (16.8)

Discussion

The determination by a country of its own risk factors for epilepsy will make an important contribution to the fight against epilepsy. In this study, we caution that controls were not healthy individuals but patients with other neurological disorders such as Parkinson's disease, migraine, neuropathy and myasthenia.

The male-to-female ratio was 1.29. This male predominance is inline with previous reports (Attia-Romdhane et al., 1993; Al Rajeh et al., 2001).

Idiopathic epilepsies represent up to 47% of all epilepsies and they are assumed to have a strong genetic component, being monogenic or oligo/polygenic with different recurrence risks in the same family (Helbig et al., 2008). However, even in monogenic epilepsy, additional genes and non-genetic factors may modulate its expression, thus resulting in incomplete penetrance and variable phenotype. Previous twin studies have shown higher concordance in monozygotic than dizygotic pairs; and estimates of heritability vary between studies, with some estimates reaching 70% (Berkovic et al., 1998; Kjeldsen et al., 2003; Miller et al., 1998).

These data are consistent with the strong association we found with family history of epilepsy and further supported by previous research conducted in Iran (Asadi-Pooya and Hojabri, 2005), Jordan (Daoud et al., 2003), Tanzania (Matuja et al., 2001), Kenya (Mung'ala-Odera et al., 2008) and India (Nair and Thomas, 2004; Kanno et al., 2009) which also highlighted this association. However, it is well known that epilepsy is a multifactorial disease, and we recognize that members of the same family may also share other non-genetic factors such as socio-economic status,

Table 2 Univariate analysis of the distribution of risk factors between controls and cases.

Variables with $P < 20\%$	OR	CI 95%	P
Gender			
Female	1		
Male	1.20		NS
Consanguinity			
No	1	—	
First-degree	2.71	[1.48–4.94]	0.001
Second-degree	2.93	[1.08–7.94]	0.034
Family history of epilepsy			
No	1	—	
First-degree relatives	5.37	[2.64–10.91]	0.000
Second-degree relatives	3.87	[1.27–7.39]	0.017
Third-degree relatives	1.77	[0.68–4.74]	NS
Perinatal insults			
No	1	—	
Yes	1.60	[0.58–4.42]	NS
Cerebrovascular diseases			
No	1	—	
Yes	1.18	[0.45–3.10]	NS
History of febrile seizures			
No	1	—	
Yes	4.81	[1.62–14.27]	0.005
CNS infection			
No	1	—	
Yes	5.21	[1.21–27.33]	0.051
Severe head trauma			
No	1	—	
Yes	2.56	[1.10–5.95]	0.028
Mental retardation			
No	1	—	
Yes	14.62	[3.23–66.20]	0.000
Neurological impairment			
No	1	—	
Yes	1.10	[0.53–2.25]	NS
Chronic alcoholism			
No	1	—	
Yes	0.28	[0.03–1.81]	NS
Illicit drug use			
No	1	—	
Yes	6.15	[0.63–59.91]	0.19

infectious diseases, malnutrition and consumption of alcohol or drugs (Birbeck et al., 2007; Noronha et al., 2007).

Earlier studies of the link between consanguinity and epilepsy have produced conflicting results. Asadi-Pooya (2005) reported that the risk of epilepsy was 2.2 times higher if parents were first cousins and 3.8 times higher if they were second cousins. Choueiri et al. (2001) compared the rate of inbreeding among patients with incidental seizures, patients with febrile seizures and patients with epilepsy. Inbreeding rates were respectively 0%, 4% and 19.5%. Another study by Ramasundrum and Tan, also found an increased risk of

idiopathic and cryptogenic epilepsy in children born to consanguineous marriages (Ramasundrum and Tan, 2004). These results are in contrast with those of Daoud et al. (2003) who did not find a significant association. Differences in sampling methods, inclusion criteria and statistical analysis strategies might explain the different results found in those studies.

In our study, the higher rate of consanguineous marriages among cases (36.6%) vs controls (17.3%) may reflect the social stigma toward individuals with epilepsy in Algeria, making it more convenient to enter into intra-familial relationships.

Table 3 Results of multiple logistic regression analysis.

Variables with $P < 5\%$	Adjusted OR	CI 95%	P
Consanguinity			
No	1	—	
1st degree	2.15	[1.08–4.30]	0.029
2nd degree	2.31	[0.77–6.91]	NS
Family history of epilepsy			
No	1	—	
1st degree relatives	4.03	[1.88–8.66]	0.000
2nd degree relatives	2.90	[0.91–9.25]	NS
3rd degree relatives	1.20	[0.40–3.61]	NS
History of febrile seizures			
No	1	—	
Yes	5.38	[1.65–17.56]	0.005
Severe head trauma			
No	1	—	
Yes	2.94	[1.18–7.27]	0.020
Mental retardation			
No	1	—	
Yes	9.32	[1.91–45.5]	0.006

First-degree parental consanguinity seems to increase the risk of developing both monogenic and polygenic epilepsies by a factor of 2.15. There are several reasons why this variable should be expected to have a significant effect:

- First, some epileptic syndromes in our sample are probably monogenic and inherited as an autosomal recessive trait. Indeed, it is admitted that consanguineous unions increase the rate of homozygosity according to the principle of identical by descent (Woods et al., 2006).
- On the other hand, recent progress in genetic analysis revealed that only about 1–2% of genetic epilepsies seem to be monogenic, whereas most of them are believed to be polygenic, such as childhood absence epilepsy (CAE), juvenile absence epilepsy (JAE), juvenile myoclonic epilepsy (JME), and epilepsy with generalized tonic–clonic seizures on awakening (Weber and Lerche, 2008; Steinlein, 2008; Lowenstein and Messing, 2007). Even in these forms of epilepsy, consanguinity has an important role. Indeed, during the last decade several studies have demonstrated the significant effect of inbreeding not only on single gene disorders but also on numerous polygenic and multifactorial traits (Rudan et al., 2006). Moreover, according to Bittles' explanations, consanguinity would be expected to exert a great influence on the etiology of complex diseases if rare autosomal recessive alleles are causally implicated (Bittles and Black, 2010).

History of febrile seizures increased five-fold the risk of developing epilepsy, which is consistent with results of previous studies (Daoud et al., 2003; Cansu et al., 2007). The strong association with febrile seizures does not reflect a causal relationship, but may mean that febrile seizures represent an early expression of a low seizure threshold in patients genetically predisposed to epilepsy. Indeed, febrile seizures can be the gateway to a numerous genetic epileptic

syndromes such as Genetic Epilepsy with Febrile Seizures Plus (GEFS+) (Goldberg-Stern et al., 2014), epileptic syndrome by febrile infection (FIRES) (Moreno de Flagge, 2013), severe myoclonic epilepsy in infancy (Dravet syndrome) (Brunklau and Zuberi, 2014) and temporal lobe epilepsy (McClelland et al., 2011; Abou-Khalil et al., 2007).

In this study, the strong positive association found between mental retardation and epilepsy ($P=0.006$) confirms literature data. Several studies have reported an increased prevalence of epilepsy among subjects with MR compared to the general population with rates ranging from 14% to 44% (Bowley and Kerr, 2000). Other studies have shown an increased rate of MR in epileptic children compared to healthy children (Wakamoto et al., 2000; Camfield and Camfield, 2007). This may be explained by the existence of genetic factors contributing to vulnerability to both conditions simultaneously. Indeed, syndromic entities with monogenic forms of epilepsy and mental retardation are typical situations of this comorbidity (Carrascosa-Romero et al., 2012). Additionally, the cognitive decline observed in some epileptic patients could be a secondary consequence of anti-epileptic drugs, repeated injuries or anoxic episodes during status epilepticus (Abou-Khalil and Schmidt, 2012; Krsek et al., 2004).

The incidence of epilepsy after traumatic brain injury has been studied in both adults and children (Cansu et al., 2007). Generally these studies show an increased risk of epilepsy after severe head injury. In line with these results, our study showed that subjects with a history of severe head trauma had a three times higher risk of developing epilepsy compared to their controls. Yemadje et al. (2012) found no significant association between head trauma and epilepsy. However, they defined head trauma as head injury after road accident or war, with or without coma and this broad definition may explain their results.

In contrast with results reported by previous studies (Daoud et al., 2003; Kanno et al., 2009), we did not find significant association between epilepsy and perinatal complications. In our study 66.3% of cases and 68.3% of controls were born in a suitable private or public facility which could justify our results.

The concept of vascular epilepsy is not new. It was conceptualized by John Hughlings Jackson in 1864 and William Gowers in 1885, the latter having reported on 66 cases of what he called "post-hemiplegic epilepsy". Since the work of these pioneers, several epidemiological studies have shown that stroke was the leading cause of epilepsy beginning after the age of 60 years (Chen et al., 2012; Menon and Shorvon, 2009). In line with the study of Ogunniyi et al. (1987) we have not found significant differences between the two groups with regard to cerebrovascular disease. We acknowledge though that the 60–67 years age group represented only 7.4% of our study population.

Yemadje and colleagues found a strong association between epilepsy and CNS infection but as pointed out by the author, Benin is an endemic area and the population is exposed to inappropriate self-medication (Yemadje et al., 2012). In our study, although the CNS infection was five times more frequent in cases than in controls, the association was not statistically significant. This is probably due to the fact that our study included all types of CNS infections whereas other studies supporting statistical significance excluded aseptic meningitis (Cansu et al., 2007).

We did not find an association between chronic alcoholism, illicit drug intake and epilepsy. We believe that the percentage of alcoholics and drug addicts among cases and controls is underestimated – the majority of patients will not admit consumption of these products since it remains a taboo subject within our society.

Contrary to previous reports (Cansu et al., 2007), we did not find any association between neurological deficit and epilepsy, probably because control patients were recruited at the Neurology Department where they were already being treated for a chronic disease.

The limitations of our study should be highlighted. This was a hospital-based study so the study population was not representative of general population. Nevertheless we believe the findings of this study will draw attention to the possible risk factors of epilepsy within our everyday clinical environment. The study was retrospective and was thus exposed to bias in data collection. Although we made several efforts to obtain complete patient details and verify the accuracy of this information against official records, such efforts were not entirely successful. For example, it was difficult to obtain birth history, particularly for elderly patients, more than a third of whom were born at home and had no document to confirm their statements. This exposed the study to recall bias. The study also lacks genetic analysis because of financial and technical impediments.

Conclusion

While this retrospective study has some limitations, it is the first report from Algeria studying the relationship between consanguinity and epilepsy. First-degree parental consanguinity, family history of epilepsy, history of febrile

convulsions, severe head trauma and mental retardation were shown to have a statistically significant association with epilepsy in patients attending Oran University Hospital. Our results provide support for the interplay between genetic predisposition and acquired environmental factors in the pathogenesis of epilepsy. These findings deserve special attention and require the implementation of a strategy for prevention and awareness of the adverse consequences of inter family marriages. Increasing public literacy about consanguinity could be achieved by providing proper education and training to primary health care workers on all health and social issues related to inbreeding. Genetic counseling for couples with a family history of epilepsy is also necessary. We believe that further prospective investigations into the above clinical and genetic factors are bound to improve our understanding of the biological and clinical phenomenology associated with epilepsy. Based on these findings, we plan to establish a research program in order to identify susceptibility genes to epilepsy in consanguineous families where several individuals are affected. The identification of these genes could lead to a better understanding of epilepsy mechanisms.

Acknowledgments

We thank all the patients for their voluntary participation in the present study. We are grateful to Michael Sexton, Amel Chentouf, Farouk Mesli, Mohamed Bouziani and Adnane Abdelouahab for carefully reviewing the manuscript.

References

- Abou-Khalil, B., Schmidt, D., 2012. Antiepileptic drugs: advantages and disadvantages. 1. *Handb. Clin. Neurol.* 108, 723–739.
- Abou-Khalil, B., Krei, L., Lazenby, B., Harris, P.A., Haines, J.L., Hedera, P., 2007. Familial genetic predisposition, epilepsy localization and antecedent febrile seizures. *Epilepsy Res.* 73, 104–110.
- Al Rajeh, S., Awada, A., Bademosi, O., Ogunniyi, A., 2001. The prevalence of epilepsy and other seizure disorders in an Arab population: a community-based study. *Seizure* 10, 410–414.
- Asadi-Pooya, A.A., 2005. Epilepsy and consanguinity in Shiraz, Iran. *Eur. J. Pediatr. Neurol.* 9, 383–386.
- Asadi-Pooya, A.A., Hojabri, K., 2005. Risk factors for childhood epilepsy: a case-control study. *Epilepsy Behav.* 6, 203–206.
- Attia-Romdhane, N., Mrabet, A., Ben, H.M., 1993. Prevalence of epilepsy in Kelibia, Tunisia. *Epilepsia* 34, 1028–1032.
- Benamer, H.T., Grosset, D.G., 2009. A systematic review of the epidemiology of epilepsy in Arab countries. *Epilepsia* 50 (10), 2301–2304.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, H., van Emde Boas, W., et al., 2005–2009. Révision Terminologique et Conceptuelle de l'organisation des crises épileptiques et des épilepsies: Rapport de la Commission de ILAE sur la Classification et la Terminologie.
- Berkovic, S.F., Howell, R.A., Hay, D.A., Hopper, J.L., 1998. Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Ann. Neurol.* 43 (4), 435–445.
- Birbeck, G., Chomba, E., Atadzhanov, M., Mbeve, E., Haworth, A., 2007. The social and economic impact of epilepsy in Zambia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* 6 (1), 39–44.
- Bittles, A.H., Black, M.L., 2010. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: consanguinity, human evolution and

- complex diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 1779–1786.
- Bourrous, M., Elibrahimi, I., Draiss, G., Safini, F., Amine, M., Bouskraoui, M., 2010. Caractéristiques des enfants ayant une épilepsie suivis au CHU de Marrakech. *Rev. Neurol.* 166, 921–926.
- Bowley, C., Kerr, M., 2000. Epilepsy and intellectual disability – a review. *J. Intell. Disabil. Res.* 44, 1–15.
- Brunklaus, A., Zuberi, S.M., 2014. Dravet syndrome – from epileptic encephalopathy to channelopathy. *Epilepsie* 55 (7), 979–984.
- Camfield, C.S., Camfield, P.R., 2007. Preventable and unpreventable causes of childhood-onset epilepsy plus mental retardation. *Pediatrics* 120, 52–55.
- Cansu, A., Serdaroglu, A., Yüksel, D., Doğan, V., İl Özkan, S., Hırfanoğlu, T., et al., 2007. Prevalence of some risk factors in children with epilepsy compared to their controls. *Seizure* 16, 338–344.
- Carrascosa-Romero, M.C., Suela, J., Alfaro-Ponce, B., Cepillo-Boluda, A.J., 2012. X-chromosome-linked ichthyosis associated to epilepsy, hyperactivity, autism and mental retardation, due to the Xp22.31 microdeletion. *Rev. Neurol.* 54 (February (4)), 241–248.
- Casetta, I., Monetti, V.C., Malagù, S., 2002. Risk factors for cryptogenic and idiopathic partial epilepsy: a community-based case–control study in Copparo, Italy. *Neuroepidemiology* 21, 251–254.
- Chen, T.-C., Chen, Y.-Y., Cheng, P.-Y., Lai, C.-H., 2012. The incidence rate of post-stroke epilepsy: a 5-year follow-up study in Taiwan. *Epilepsy Res.* 102 (3), 188–194.
- Choueiri, R.N., Fayad, M.N., Farah, A., Mikati, M.A., 2001. Classification of epilepsy syndromes and role of genetic factors. *Pediatr. Neurol.* 24 (1), 37–43.
- Dahdouh-Guermouche, A., Taleb, M., Courtet, P., Semaoune, B., Malafosse, A., 2013. Consanguinité, schizophrénie et trouble bipolaire. *Ann. médico-psychol.* 171, 246–250.
- Daoud, A.S., Batiha, A., Bashtawi, M., El-Shanti, H., 2003. Risk factors for childhood epilepsy: a case–control study from Irbid, Jordan. *Seizure* 12 (April (3)), 171–174.
- Edwards, T., Scoot, A.G., Munyoki, G., 2008. Active convulsive epilepsy in a rural district of Kenya: a study of prevalence and possible risk factors. *Lancet Neurol.* 7, 50–56.
- Etude de la consanguinité dans la population marocaine. Impact sur le profil de la santé., 2007. *Antropo*.
- Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel Jr., J., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., Hesdorffer, D.C., Lee, B.I., Mathem, G.W., Moshé, S.L., Perucca, E., Scheffer, I.E., Tomson, T., Watanabe, M., Wiebe, S., 2014. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55 (April (4)), 475–482.
- Fondation Nationale pour la Promotion de la Santé et le Développement de la Recherche, 2007.
- Goldberg-Stem, H., Aharoni, S., Afawi, Z., Bennett, O., Appenzeller, S., Pendziwiat, M., et al., 2014. Broad phenotypic heterogeneity due to a novel SCN1A mutation in a family with genetic epilepsy with febrile seizures plus. *J. Child Neurol.* 29 (February (2)), 221–226.
- Guekht, A., Allen Hauser, W., Milchakova, L., Churillín, Y., Shpak, A., Gusev, E., 2010. The epidemiology of epilepsy in the Russian Federation. *Epilepsy Res.* 92, 209–218.
- Hamamy, H., Antonarakis, S.E., Cavalli-Sforza, L.L., Temtamy, S., Romeo, G., Ten Kate, L.P., et al., 2011. Consanguineous marriages, pearls and perils: Geneva International Consanguinity Workshop Report. *Genet. Med.* 13 (September (9)), 841–847.
- Helbig, I., Scheffer, I.E., Mulley, J.C., Berkovic, S.F., 2008. Navigating the channels and beyond: unravelling the genetics of the epilepsies. *Lancet Neurol.* 7 (March (3)), 231–245.
- Huseyinoglu, N., Ozben, S., Arhan, E., Palanci, Y., Gunes, N., 2012. Prevalence and risk factors of epilepsy among school children in eastern Turkey. *Pediatr. Neurol.* 47, 13–18.
- Juהל, J.-C., 1997. la déficience intellectuelle: connaître, comprendre, intervenir. Les Presses de l'Université Laval, pp. 395.
- Kannoth, S., Unnikrishnan, J.P., Santhosh Kumar, T., Sarma, P.S., Radhakrishnan, K., 2009. Risk factors for epilepsy: a population-based case–control study in Kerala southern India. *Epilepsy Behav.* 16, 58–63.
- Khedr, E.M., Shawky, O.A., Ahmed, M.A., Abo Elfetoh, N., Al Attar, G., Ali, A.M., et al., 2013. A community based epidemiological study of epilepsy in Assiut Governorate/Egypt. *Epilepsy Res.* 103, 294–302.
- Kjeldsen, M.J., Corey, L.A., Christensen, K., Friis, M.L., 2003. Epileptic seizures and syndromes in twins: the importance of genetic factors. *Epilepsy Res.* 55 (June–July (1–2)), 137–146.
- Krsek, P., Mikulecka, A., Druga, R., Kubova, H., Hlinak, S., Suchomelova, L., Mares, P., 2004. Long-term behavioural and morphological consequences of non-convulsive status epilepticus in rats. *Epilepsy Behav.* 5, 180–191.
- Lowenstein, D.H., 2009. Epilepsy after head injury: an overview. *Epilepsia* 50, 4–9.
- Lowenstein, D., Messing, R., 2007. Epilepsy genetics: yet more exciting news. *Ann. Neurol.* 62, 549–550.
- Matuja, W.B., Kilonzo, G., Mbena, P., Mwangombola, R.L., Wong, P., Goodfellow, P., et al., 2001. Risk factors for epilepsy in a rural area in Tanzania. A community-based case–control study. *Neuroepidemiology* 20 (4), 242–247.
- McClelland, S., Dubé, C.M., Yang, J., Baram, T.Z., 2011. Epileptogenesis after prolonged febrile seizures: mechanisms, biomarkers and therapeutic opportunities. *Neurosci. Lett.* 497 (3), 155–162.
- Menon, B., Shorvon, S.D., 2009. Ischaemic stroke in adults and epilepsy. *Epilepsy Res.* 87 (1), 1–11.
- Miller, L.L., Pellock, J.M., De Lorenzo, R.J., Meyer, J.M., Corey, L.A., 1998. Univariate genetic analyses of epilepsy and seizures in a population-based twin study: the Virginia Twin Registry. *Genet. Epidemiol.* 15, 33–49.
- Moreno de Flagge, N., 2013. Simple febrile seizure, complex seizure, generalized epilepsy with febrile seizure plus, FİRES and new syndromes. *Medicina (B Aires)* 73 (1), 63–70.
- Moualek, D., Ali Pacha, L., Abrouk, S., Kediha, M.I., Nouioua, S., Ait Aissa, L., et al., 2012. Multicenter transversal two-phase study to determine a national prevalence of epilepsy in Algeria. *Neuroepidemiology* 39, 131–134.
- Mung'ala-Odera, V., White, S., Meehan, R., et al., 2008. Prevalence, incidence and risk factors of epilepsy in older children in rural Kenya. *Seizure* 17, 396–404.
- Nair, R.R., Thomas, S.V., 2004. Genetic liability to epilepsy in Kerala state, India. *Epilepsy Res.* 62, 157–164.
- Noronha, A.L.A., Borges, M.A., Marques, L.H.N., Zanetta, D.M.T., Fernandes, P.T., de Boer, H., et al., 2007. Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. *Epilepsia* 48 (5), 880–885.
- Ogunniyi, A., Osuntokun, B.O., Bademosi, O., Adejuga, A.O.G., Schoenberg, B.S., 1987. Risk factors for epilepsy: case–control study in Nigerians. *Epilepsia* 28, 280–285.
- Ogunrin, O.A., Ademola, A., Philomena, A., 2013. Etiologies of epilepsy and health-seeking itinerary of patients with epilepsy in a resource poor setting: analysis of 342 Nigerian Africans. *Seizure* 22, 572–576.
- Osakwe, C., Otte, W.M., Chimhurumanya, A., 2014. Epilepsy prevalence, potential causes and social beliefs in Ebonyi State and Benue State, Nigeria. *Epilepsy Res.* 108 (February (2)), 316–326.
- Pi, X., Zhou, L., Cui, L., Liu, A., Zhang, J., Ma, Y., et al., 2014. Prevalence and clinical characteristics of active epilepsy in southern Han Chinese. *Seizure* 23 (September (8)), 636–640.

- Port, K.E., Bittles, A.H., 2001. A population-based estimate of the prevalence of consanguineous marriage in Western Australia. *Community Genet.* 4, 97–101.
- Ramasundrum, V., Tan, C.T., 2004. Consanguinity and risk of epilepsy. *Neurol. Asia* 9 (1), 10.
- Rocca, W.A., Sharbrough, F.W., Hauser, W.A., Annegers, J.F., Schoenberg, B.S., 1987. Risk factors for absence seizures: a population-based case-control study in Rochester, Minnesota. *Neurology* 37, 1309–1314.
- Romeo, G., Menozzi, P., Mastella, G., Giunta, A., Lodi, G., Costantini, D., et al., 1981. Studio genetico ed epidemiologico della fibrosi cistica in Italia. *Riv. Ital. Pediatr.* 7, 201–209.
- Rudan, I., Campbell, H., Carothers, A.D., Hastie, N.D., Wright, A.F., 2006. Contribution of consanguinity to polygenic and multifactorial diseases. *Nat. Genet.* 38, 1224–1225.
- Sander, J.W., 2003. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr. Opin. Neurol.* 16, 165–170.
- Steinlein, O.K., 2008. Genetics and epilepsy. *Dialogues Clin. Neurosci.* 10, 29–38.
- Subcommittee on Febrile Seizures, American Academy of Pediatrics, 2011. Neurodiagnostic evaluation of the child with a simple febrile seizure. *Pediatrics* 127 (February (2)), 389–394.
- Wakamoto, H., Nagao, H., Hayashi, M., Morimoto, T., 2000. Long-term medical, educational, and social prognoses of childhood-onset epilepsy: a population-based study in a rural district of Japan. *Brain Dev.* 22, 246–255.
- Weber, Y.G., Lerche, H., 2008. Genetic mechanisms in idiopathic epilepsies. *Dev. Med. Child Neurol.* 50 (September (9)), 648–654.
- Woods, C.G., Cox, J., Springell, K., Hampshire, D.J., Mohamed, M.D., McKibbin, M., 2006. Quantification of homozygosity in consanguineous individuals with autosomal recessive disease. *Am. J. Hum. Genet.* 78 (May (5)), 889–896.
- World Health Organization, 2005. Atlas: Epilepsy Care in the World 2005. WHO Press, Geneva, pp. 11–13.
- Yemadje, L.P., Houinato, D., Boumediène, F., Ngougou, E.B., Preux, P.M., Druet-Cabanac, M., 2012. Prevalence of epilepsy in the 15 years and older in Benin: a door-to-door nationwide survey. *Epilepsy Res.* 99, 318–326.



Early Predictors of Refractory Epilepsy in Oran, Algeria: A Case-Control Study

Amina Chentouf¹, Aicha Dahdouh², Souad Ghomari¹, Mohand Laid Oubaich¹, Malika Chaouch³

¹Department of Neurology, University Hospital of Oran, Algeria

²Department of Psychiatry, University Hospital of Oran, Algeria

³Department of Neurology, Benaknoun University Hospital in Algiers, Algeria

*Corresponding author: Dr. Amina Chentouf, Department of Neurology, University Hospital of Oran, Algeria,

E-mail: amina.chentouf@yahoo.com

Abstract

Purpose: The goal of this retrospective study is to identify early predictors of intractable epilepsy.

Methods: This case-control study conducted from January 2007 to December 2012 included 106 patients with drug-resistant epilepsy and 212 controls with well-controlled epilepsy. Univariate and multivariate analysis of predictive factors of refractoriness were performed using logistic regression.

Results: In the final model, four factors significantly associated with intractable epilepsy were identified: aetiology ($p = 0.001$) high initial seizure frequency ($p < 10^{-4}$), status epilepticus ($p = 0.002$), and initial myoclonic seizures ($p < 10^{-4}$).

Conclusion: Our findings suggest that the risk of developing drug resistant epilepsy could be predicted at an early stage of the disease by some clinical features. This could help the clinicians to make the best therapy decisions and improve patient's quality of life.

Received Date: February 24, 2016

Accepted Date: April 04, 2016

Published Date: April 08, 2016

Citation: Chentouf, A., et al. Early Predictors of Refractory Epilepsy in Oran, Algeria: A Case-Control Study. (2016) Int J Neurol Brain Disord 3(2): 1- 5.

DOI: 10.15436/2377-1348.16.030



Introduction

Epilepsy is a common neurological disease characterized by recurrent and unprovoked seizures. According to data from WHO, there is more than 50 million people with epilepsy worldwide^[1]. In 2/3 of cases, seizures can be well controlled by anti-epileptic drugs (AEDs), but in the remaining third, seizures still un-controlled^[2,3]. Patients in this latter group are defined as having intractable epilepsy and are at increased risk of injury and death due to poorly controlled seizures. They also are subject to multiple trials of AEDs, often at high doses that result in adverse effects. Furthermore, they have higher rates of cognitive, physical and psychiatric comorbidities; tend to be socially isolated; face social stigma; and have poorer quality of life than those with non-intractable epilepsy^[4,5]. Early identification of drug resistant epilepsy (DRE) is essential to avoid further futile therapies that could be harmful, to optimize long-term outcomes, and to decrease the burden of care.

Although several studies have investigated the predictors of medical intractability, the results were highly variable. Differences in sampling methods, inclusion criteria and particularly in DRE definitions might explain the discrepant results^[6-10]. In Algeria, the magnitude of drug resistant epilepsy (DRE) is unknown. Indeed, very few epidemiological studies on epilepsy have been published^[11] and there is no data available on predictors of refractory epilepsy. Early identification of these patients would be essential in a developing country such as Algeria, where neurologists are facing challenges in both medical and surgical management of DRE.

Materials and Methods

This retrospective case-control study was carried-out at the Department of Neurology in Oran, Algeria from January 2007 to December 2012, in consecutive age matched patients who attended our epilepsy unit. The study included patients from 3 to 75 years of age. All were diagnosed with epilepsy by the same epileptologist (AC).

We excluded patients whose seizures were uncontrolled due to poor treatment adherence or subtherapeutic serum drug levels.

Cases with intractable epilepsy were consecutively recruited. Controls consisted of consecutive age matched patients sat-



Copyrights: © 2016 Chentouf, A. This is an Open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License.

tending our epilepsy unit, who had no seizures during the last six months. Both cases and controls were evaluated regularly every three months.

Definitions

Epilepsy was defined as a predisposition to unprovoked seizures. For each patient, epileptic syndrome and seizures were defined according to the International League against Epilepsy (ILAE) Commission on Classification and Terminology 2005–2009 Report^[12].

DRE was defined as the failure of adequate trials of two tolerated, appropriately chosen and used antiepileptic drug (AED) schedules (whether as mono-therapies or in combination) to achieve sustained seizure freedom^[13]. An AED trial was considered a failure if seizures persisted at the maximally tolerated dose. We defined controlled epilepsy as the absence of seizures for at least six months.

Status epilepticus was defined according to ILAE as any seizure lasting at least 30 minutes or repeated seizures over a period of 30 minutes or more, without recovery of consciousness^[14]. A family history of epilepsy was defined as unprovoked seizures occurring in first-degree relatives. Neurodevelopmental delay was diagnosed based on clinical assessment completed by a neuropsychological evaluation. Neuroimaging was classified as normal or abnormal.

Data collection

Both of the epileptic groups were questioned on their medical history, and the clinical features of seizures were noted. These included: gender, perinatal history, history of febrile/neonatal seizures, age at onset of seizures, initial seizure type, and initial seizure frequency before treatment, outcome of the first AED trial, history of inaugural status epilepticus, neurodevelopmental status, severe head trauma and family history of seizure disorders. According to patient's history, clinical features, electroencephalography (EEG) records and brain imaging findings, the aetiology was classified as genetic, structural/metabolic, or unknown. The appropriate antiepileptic drug was prescribed taking into account seizures type, side effects, and interaction profiles of the available drugs.

All patients enrolled in this study provided their written informed consent.

Statistical analysis

Demographic details, clinical characteristics and other relevant data were analysed using statistical package SPSS (version 21.0 for Mac OS X). The association of each factor to the dependent variable was calculated from 2 × 2 tables, using a χ^2 test of association, and a p-value of < 0.05 was considered significantly. A univariate comparison between controls and cases was done for each potential predictor to calculate Odds Ratio (OR) and 95% Confidence Interval (CI). Finally, variables significant at the 5% nominal level were considered for multivariate analysis by logistic regression stepwise.

Results

Patient profiles

A total of 303 individuals including 106 cases (with DRE epilepsy) and 212 controls (with well controlled epilepsy) participated

in the study. The mean age was 33.8 ± 14 years, ranging from 3 to 75 years. In both case and control patients, there was a slight male predominance.

Clinical features

A comparison between cases and controls regarding clinical characteristics revealed several statistically significant differences (Table 1). Most controls (90.1%) began their seizures after age two years, while 21% of cases had a seizure onset before the age of two years. Generalized seizures were more frequent in controls than in cases ($p < 10^{-4}$). Epileptic syndromes were classified as structural/metabolic in more than third of cases, whereas in controls, there was a clear predominance of genetic epilepsies. 85% of controls were on monotherapy and around 90% of cases were on more than one AED.

Table 1: Comparison of clinical features between cases and controls.

Clinical features	Cases (n = 106)	Controls (n = 212)	P-Value
Age at onset			
< 2 years	24 (20.8%)	21 (9.9%)	0.008
> 2 years	84 (79.2%)	191 (90.1%)	
Gender			
Male	61 (57.5%)	111 (52.4%)	0.380
Female	45 (42.5%)	101 (47.6%)	
Initial seizure type			
Generalized	42 (42.9%)	145 (70%)	0.000
Focal	49 (50%)	60 (29%)	
Generalized and focal	7 (7.1%)	2 (1%)	
Aetiology			
Genetic	34 (32.1%)	97 (45.8%)	0.000
Structural/ Metabolic	40 (37.7%)	46 (21.7%)	
Unknown	32 (30.2%)	69 (32.5%)	
Current number of antiepileptic drug			
0	0 (0%)	9 (4.2%)	0.000
Monotherapy	12 (11.3%)	179 (84.4%)	
Bitherapy	79 (74.5%)	24 (11.3%)	
polytherapy	15 (14.2%)	0 (0%)	
Current seizure frequency			
1-4/month	43 (40.6%)		
1-6/week	49 (46.2%)		
>1/day	14 (13.2%)		

Univariate analysis

In univariate analysis, age at onset, initial myoclonic seizures, seizure frequency before treatment, aetiology, history of neonatal seizures, history of status epilepticus, neurodevelopmental delay and neurological abnormalities, were found to be significantly associated with DRE (Table 2). Those factors were entered into multiple logistic regression models, with probability for entry of the variables fixed at 0.05 and that for removal at 0.10.

Predictors of Refractory Epilepsy in Oran

Table 2: Univariate analysis

Variables with p < 20%	OR	CI95%	P-Value
Gender			
Female	1	-	NS
Male	0.81	[0.51-1.30]	
Age at onset			
> 2 years	1	-	0.009
< 2 years	2.38	[1.24-4.57]	
Seizure frequency before treatment			
<1/month	1	-	0.000
>1/month	2.73	[1.83-3.63]	
Initial myoclonic seizures			
No	1	-	0.000
Yes	3.78	[1.81-7.90]	
Aetiology			
Genetic	1	-	0.017
Unknown	1.36	[0.76-2.45]	
Structural/Metabolic	2.29	[1.29-4.05]	
Initial status epilepticus			
No	1	-	0.000
Yes	5.42	[2.61-11.26]	
Family history of epilepsy			
No	1	-	NS
Yes	1.02	[0.58-1.80]	
History of febrile seizures			
No	1	-	NS
Yes	1.91	[0.99-3.66]	
Neonatal seizures			
No	1	-	0.048
Yes	5.30	[1.01-9.59]	
Neurologic impairment			
No	1	-	0.000
Yes	4.99	[2.25-11.05]	
Neurodevelopmental delay			
No	1	-	0.004
Yes	2.66	[1.37-5.17]	
Failure of first AED			
No	1	-	0.000
Yes	21.89	[11.99-39.97]	

Multiple regression analysis

As failure of adequate AED trials is incorporated in the definition of intractability, this variable is inextricably linked to intractable epilepsy and can no longer be considered as a prognostic factor. Furthermore, we found multi-collinearity between several variables such as aetiology, focal seizures, neurologic impairment and brain imaging abnormalities; so we decided not to enter the last three variables in the initial model. We also examined interactions between variables, such as age at onset and aetiology.

In the final multivariate model by stepwise logistic regression, high initial seizure frequency ($p < 10^{-4}$), initial myoclonic seizures ($p < 10^{-4}$), a previous history of status epilepticus ($p = 0.002$), and aetiology ($p = 0.001$) emerged as strong inde-

pendent prognostic factors of intractability in patients with epilepsy (Table 3).

Table 3: Multivariate analysis

Variables with p < 5%	OR a	CI95%	P-Value
Initial seizure frequency			
< 1/month	1	-	0.000
> 1 /month	2.58	[1.68-3.48]	
Initial status epilepticus			
No	1	-	0.002
Yes	3.94	[1.66-9.36]	
Aetiology			
Genetic	1	-	0.001
Unknown	2.91	[1.38-6.16]	
Structural/Metabolic	3.75	[1.80-7.85]	
Initial myoclonic seizures			
No	1	-	0.000
Yes	8.33	[3.27-21.21]	

Discussion

Determining the prognosis of patients with epilepsy is a challenging task. The risk assessment of a patient can be useful in adapting the therapeutic strategy.

Refractory patients have a higher risk of premature death, trauma, psychosocial difficulties, and reduced quality of life^[15]. These patients are generally treated with multiple AEDs, which in combination can lead to cognitive and behavioural disorders. Knowledge of prognostic factors at an early therapeutic stage of epilepsy could facilitate patient management.

Previous studies have reported a slight predominance of epilepsy in males than in females^[16]. The exact cause of this male predominance is not known. However, gender was not a predictor of drug resistance in the present study. This result is in agreement with the findings of Kwan and Brodie^[17].

The first factor strongly correlated in the literature with the risk of developing refractoriness is the aetiology of epilepsy. Our study showed that the aetiology of epilepsy is an important predictor of treatment response. This is in agreement with findings by Berg et al who reported intractable seizures in 34.6% of children with symptomatic/cryptogenic and 2.7% with idiopathic generalized childhood epilepsy. In their prospective evaluation of 613 patients, a symptomatic aetiology was significantly frequent in the group with DRE^[18]. Furthermore, several large cohort studies have been performed on the prediction of seizure remission, among which the UK National General Practice Study of Epilepsy^[19] and the Dutch Study of Epilepsy in Childhood^[20]. These identified prognostic factors such as idiopathic aetiology, related to long lasting seizure remission as the opposite of intractability. In a previous report aiming to document the clinical characteristics and inheritance pattern of genetic epilepsy in Algerian families, seizure control was achieved in 21 patients (52.5%) using mono or polytherapy. Twenty-eight (70%) were seizure-free for 3 months and two (5%) have been weaned for 10 years^[21]. These results might suggest that genetic aetiology is predictive of better seizure control.

In the present study, the high seizures frequency before initiation of the first AED was shown to be a predictive factor of

refractory epilepsy. This is in line with the results of Chawla et al. Who observed that 76% of cases vs 22% of controls had one or more seizures per day ($P < 0.001$)^[22]. In the sample of Taesung and Holmes, daily seizures were reported in 50.7% of cases and 25.6% of controls ($p < 0.001$)^[23]. In their multivariate analysis, Huang et al. reported a high risk of refractoriness (OR: 6.54, CI: 3.13–13.7) in patients who have experienced more than ten seizures before treatment^[24]. The high initial seizure frequency could cause brain injuries leading to intractability.

Previous studies have shown that myoclonic seizures were predictive of drug resistance^[22,25] while others have found no relationship between DRE and seizure type^[26]. In our study, initial myoclonic seizures were significantly associated with intractability ($p < 10^{-4}$). Indeed, most epilepsies with myoclonic seizures such as juvenile myoclonic epilepsy, progressive myoclonic epilepsy and severe myoclonic epilepsy in infancy are drug-resistant or drug dependent.

Initial status epilepticus was an important factor for predicting development of DRE, which was in agreement with several studies^[23,27]. However, some studies did not confirm this association^[28]. Nevertheless, we cannot conclude whether status epilepticus history is a predictor of drug resistance or the consequence of poor seizure control. Further prospective studies may provide answers to this question.

A significant proportion of available studies observed a higher risk of DRE in patients whose disease has appeared at a young age^[18,29,30]. In our study, this association was observed in univariate analysis, however, without statistical significance in multivariate analysis.

History of neonatal seizures was also correlated with DRE but only in univariable analysis^[6,8,22,31]. Similarly, in our sample, we observed a significant tendency towards a higher risk of refractory epilepsy in this situation, but the association was not significant in multivariable analysis.

Developmental delay was observed in 20.8% of cases vs. 9% of controls, but significant association was obtained only in univariate analysis. This is in line with results of several studies^[32,33].

We have not found any predictive value for family history of epilepsy in first-degree relatives. Studies aiming to assess the association between family history and intractability failed to reach statistical significance of this association^[3].

This could be explained by the fact that genetic epilepsies are probably of better prognosis than symptomatic epilepsies.

The incidence of febrile seizures (FS) in the general population is 3 to 4%. In our study, FS were found in 19% of cases vs. 10% of controls. Despite this result, FS were not predictive of unfavourable outcome. Some authors have even concluded that the history of FS was a protective factor against intractability^[18].

The present study has several limitations: it was conducted in an epilepsy unit, where patients with refractory epilepsies are often referred for reassessment, so the study population was not representative of the population concerned. In addition, although we collected data prospectively, the study could be subject to recall bias. We believe that additional prospective population-based studies, considering also new predictors such as pharmacological, genetic, neurobiological, and immunological factors, are warranted. Such studies could facilitate patient

management and stimulate the development of more effective therapeutic strategies, reducing the medico-social and economic burden of intractable epilepsy.

In conclusion, our findings suggest that some clinical features can predict intractability in patients with epilepsy. Early identification of these patients allows their transfer to specialized centres where a neurosurgical treatment should be considered.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

References

- World Health Organization (WHO). "Epilepsy". (2014) WHO Factsheet: 999.
- Kwan, P., Sander, J.W. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. (2004) *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75(10): 1376–1381.
- Sillanpaa, M., Remission of Seizures and Predictors of Intractability in Long-term follow-up. (1993) *Epilepsia* 34(5): 930–936.
- Tellez-Zenteno, J.F., Ronquillo, L.H., Wiebe, S., Sudden unexpected death in epilepsy: evidence-based analysis of incidence and risk factors. (2005) *Epilepsy Res* 65(1-2): 101–115.
- Tomson, T., Beghi, E., Sundqvist, A., et al. Medical risks in epilepsy: a review with focus on physical injuries, mortality, traffic accidents and their prevention. (2004) *Epilepsy Res* 60(1): 1–16.
- Berg, A.T., Levy, S.R., Novotny, E.J., et al. Predictors of intractable epilepsy in childhood: a case-control study. (1996) *Epilepsia* 37(1): 24–30.
- Kwan, P., Brodie, M.J., Early identification of refractory epilepsy. (2000) *N Engl J Med* 342(5): 314–319.
- Kwong, K.L., Sung, W.Y., Wong, S.N., et al. Early predictors of medical intractability in childhood epilepsy. (2003) *Pediatr Neurol* 29(1): 46–52.
- Gunraj, A., Sztriha, L., Hertecant, J., et al. Clinical predictors of intractable childhood epilepsy. (2006) *J Psychosom Res* 61(3): 343–347.
- Singhvi, J.P., Sawhney, I.M., Lal, V., et al. Profile of intractable epilepsy in a tertiary referral center. (2000) *Neurol India* 48(4): 351–356.
- Chentouf, A., Talhi, R., Dahdouh, A., et al. Consanguinity and epilepsy in Oran, Algeria: A case-control study. (2015a) *Epilepsy Res* 111: 10–17.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. (2010) *Epilepsia* 51(4): 676–685.
- Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A.T., et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. (2010) *Epilepsia* 51(6): 1069–1077.
- Commission on Epidemiology and Prognosis of the International League Against Epilepsy. Guidelines for epidemiological studies on epilepsy. (1993) *Epilepsia* 34(4): 592–596.
- Hao, X.T., Wong, I.S., Kwan, P., Interrater reliability of the international consensus definition of drug-resistant epilepsy: a pilot study. (2011) *Epilepsy Behav* 22 (2): 388–390.

Predictors of Refractory Epilepsy in Oran

16. Hauser, E., Freilinger, M., Seidl, R., et al. Prognosis of Childhood Epilepsy in newly referred Patients. (1996) *J of Child Neurol* 11(3): 201-204.
17. Kwan, P., Brodie, M.J., Clinical trials of antiepileptic medications in newly diagnosed patients with epilepsy. (2003) *Neurology* 60 (11 Suppl 4): S2-12.
18. Berg, A.T., Shinnar, S., Levy, S.R., et al. Early development of intractable epilepsy in children: a prospective study. (2001) *Neurology* 56(11): 1445-1452.
19. Cockerell, O.C., Johnson, A.L., Sander, J.W., Shorvon, et al. Prognosis of epilepsy: a review and further analysis of the first nine years of the British National General Practice Study of Epilepsy, a prospective population-based study. (1997) *Epilepsia* 38 (1): 31-46.
20. Geerts, A., Arts, W.F., Stroink, H., et al. Course and outcome of childhood epilepsy: a 15-year follow-up of the Dutch Study of Epilepsy in Childhood. (2010) *Epilepsia* 51(7): 1189-1197.
21. Chentouf, A., Dahdouh, A., Guipponi, M., et al. Familial epilepsy in Algeria: Clinical features and inheritance profiles. (2015b) *Seizure*.31: 12-18.
22. Chawla, S., Aneja, S., Kashyap, R., et al. Etiology and clinical predictors of intractable epilepsy. (2002) *Pediatr Neurol* 27(3): 186-191.
23. Tae-Sung, K.o., Holmes, G.L., EEG and clinical predictors of medically intractable childhood epilepsy. (1999) *Clin Neurophysiol* 110(7): 1245-1251.
24. Huang, L., Li, S., He, D., et al. A predictive risk model for medical intractability in epilepsy. (2014) *Epilepsy Behav* 37:282-286.
25. Eriksson, K.J., Koivikko, M.J., Prevalence, classification, and severity of epilepsy and epileptic syndromes in children. (1997) *Epilepsia* 38(12): 1275-1282.
26. Camfield, C., Camfield, P., Gordon, K., et al. Outcome of childhood epilepsy: A population-based study with a simple predictive scoring system for those treated with medication. (1993) *The Journal of Pediatrics* 122(6): 861-868.
27. Ohtsuka, Y., Yoshinaga, H., Kobayashi, K., et al. Predictors and underlying causes of medically intractable localization-related epilepsy in childhood. (2001) *Pediatr Neurol* 24(3): 209-213.
28. Akhondian, J., Heydarian, F., Jafari, S.A., Predictive factors of pediatric intractable seizures. (2006) *Arch Iran Med* 9(3): 236-239.
29. Casetta, I., Granieri, E., Monetti, V.C., et al. Early predictors of intractability in childhood epilepsy: a community-based case-control study in Copparo, Italy. (1999) *Acta Neurol Scand* 99(6): 329-333.
30. Voll, A., Hernández-Ronquillo, L., Buckley, S., et al. Predicting drug resistance in adult patients with generalized epilepsy: A case-control study. (2015) *Epilepsy Behav* 53: 126-130.
31. Ohtsuka, Y., Yoshinaga, H., Kobayashi, K. Refractory childhood epilepsy and factors related to refractoriness. (2000) *Epilepsia* 41 Suppl 9: 14-17.



Human Molecular Genetics, 2015, Vol. 24, No. 11 3082–3091

doi: 10.1093/hmg/ddv060

Advance Access Publication Date: 17 February 2015

Original Article

ORIGINAL ARTICLE

Galanin pathogenic mutations in temporal lobe epilepsy

Michel Guipponi^{1,*}, Amina Chentouf², Kristin E.B. Webling³, Krista Freimann^{3,4}, Arielle Crespel⁵, Carlo Nobile⁶, Johannes R. Lemke^{7,8}, Jörg Hansen⁹, Thomas Dorn⁹, Gaetan Lesca^{10,11,12,13}, Philippe Ryvlin^{14,15,16}, Edouard Hirsch¹⁷, Gabrielle Rudolf¹⁷, Dominique Sarah Rosenberg¹⁸, Yvonne Weber¹⁹, Felicitas Becker¹⁹, Ingo Helbig^{20,21}, Hiltrud Muhle²⁰, Annick Salzmann¹, Malika Chaouch²², Mohand Laid Oubaiche², Serena Ziglio²³, Corinne Gehrig¹, Federico Santoni¹, Massimo Pizzato²³, Ülo Langel³ and Stylianos E. Antonarakis^{1,24}

¹Department of Genetic Medicine and Development, University of Geneva Medical School and University Hospitals of Geneva, Geneva, Switzerland, ²Department of Neurology, University Hospital of Oran, Oran 31000, Algeria, ³Department of Neurochemistry, Arrhenius Laboratories for Natural Science, Stockholm University, Stockholm, Sweden, ⁴Institute of Technology, University of Tartu, Tartu, Estonia, ⁵Epilepsy Unit, Montpellier University Hospital, Montpellier, France, ⁶CNR-Institute of Neurosciences, Section of Padua, Padova, Italy, ⁷Division of Human Genetics, University Children's Hospital Inselspital, Bern, Switzerland, ⁸Institute of Human Genetics, University of Leipzig, Leipzig, Germany, ⁹Swiss Epilepsy Center, Zurich, Switzerland, ¹⁰Department of Medical Genetics, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, ¹¹Claude Bernard Lyon I University, Lyon, France, ¹²CRNL, CNRS UMR 5292, Lyon, France, ¹³INSERM U1028, Lyon, France, ¹⁴Department of Clinical Neurosciences, CHUV, Lausanne, Switzerland, ¹⁵Lyon's Neuroscience Research Center, INSERM U1028, CNRS 5292, UCBL, Lyon, France, ¹⁶Department of Functional Neurology and Epileptology, HCL, Lyon, France, ¹⁷IGBMC UMR7104 INSERM U964, University of Strasbourg, Strasbourg, France, ¹⁸Service de Neurologie et Neurophysiologie Clinique, IGCNC - EA 7282, UMR 6284 ISIT, Université d'Auvergne, Clermont Université, CHU Clermont-Ferrand, Hôpital Gabriel Montpied, Clermont-Ferrand, France, ¹⁹Department of Neurology and Epileptology, Hertie Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, Tübingen 72076, Germany, ²⁰Department of Neuropediatrics, University Medical Center Schleswig-Holstein (UKSH), Kiel, Germany, ²¹Division of Neurology, The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA, USA, ²²Department of Neurology, Benaknoun University Hospital, Algiers 16000, Algeria, ²³Centre for Integrative Biology (CIBIO), University of Trenton, Trenton, Italy and ²⁴Institute of Genetics and Genomics in Geneva (iGE3), Geneva, Switzerland

*To whom correspondence should be addressed at: Department of Genetic Medicine and Development, University of Geneva Medical School and University Hospitals of Geneva, 1, rue Michel-Servet, 1211 Geneva 4, Switzerland. Tel: +41 223795809; Email: michel.guipponi@unige.ch

Abstract

Temporal lobe epilepsy (TLE) is a common epilepsy syndrome with a complex etiology. Despite evidence for the participation of genetic factors, the genetic basis of TLE remains largely unknown. A role for the galanin neuropeptide in the regulation of epileptic seizures has been established in animal models more than two decades ago. However, until now there was no report

Received: December 16, 2014. Revised and Accepted: February 11, 2015

© The Author 2015. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

3082

Downloaded from <http://hmg.oxfordjournals.org/> at CERIST on July 15, 2015

of pathogenic mutations in *GAL*, the galanin-encoding gene, and therefore its role in human epilepsy was not established. Here, we studied a family with a pair of monozygotic twins affected by TLE and two unaffected siblings born to healthy parents. Exome sequencing revealed that both twins carried a novel *de novo* mutation (p.A39E) in the *GAL* gene. Functional analysis revealed that the p.A39E mutant showed antagonistic activity against galanin receptor 1 (GalR1)-mediated response, and decreased binding affinity and reduced agonist properties for GalR2. These findings suggest that the p.A39E mutant could impair galanin signaling in the hippocampus, leading to increased glutamatergic excitation and ultimately to TLE. In a cohort of 582 cases, we did not observe any pathogenic mutations indicating that mutations in *GAL* are a rare cause of TLE. The identification of a novel *de novo* mutation in a biologically-relevant candidate gene, coupled with functional evidence that the mutant protein disrupts galanin signaling, strongly supports *GAL* as the causal gene for the TLE in this family. Given the availability of galanin agonists which inhibit seizures, our findings could potentially have direct implications for the development of anti-epileptic treatment.

Introduction

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common partial epilepsy in adults (1). Originally considered as an acquired condition, twin studies and the description of familial forms have demonstrated the importance of genetic factors in TLE (2,3). Up to date, two genes (*LG11* and *DEPDC5*) have been found mutated in familial temporal lobe epilepsies; the *LG11* gene (leucine-rich, glioma inactivated 1) has been found mutated in autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy (ADTLE), and these mutations lead to failure of glutamate re-uptake resulting in elevated glutamate concentration and increased activation of NMDA receptors in the pyramidal neurons, causing epileptic seizures (4). Recently, the *DEPDC5* gene (dishvelled, Egl-10 and pleckstrin domain-containing protein 5) has been found mutated in familial partial epilepsy with variable foci (FPEVF) (5). *DEPDC5* is part of the GATOR complex and negatively regulates the mTOR pathway which controls numerous functions including cellular proliferation, protein synthesis, and transcription (6).

The galanin neuropeptide was discovered more than 30 years ago and described as being able to contract smooth muscle and cause hyperglycemia (7). Galanin is 30-amino-acid peptide produced from the cleavage of a 123-amino-acid protein precursor encoded by the galanin/GMAP prepropeptide gene (*GAL*; NM_015973.3). The *GAL* gene contains 5 coding exons among which exons 2 and 3 encode for galanin. The galanin neuropeptide acts as a cellular messenger within the central and peripheral nervous systems, modulating diverse physiological functions (8). In 1992, Mazarati and collaborators first demonstrated that galanin has anticonvulsant activity in rodents (9). Over the past two decades, significant progress has been made in the understanding of the role of galanin as an endogenous inhibitor of epileptic activity as well as in deciphering the involvement of three G-protein-coupled galanin receptors (GalR1, 2 and 3). Galanin, which is highly expressed in the hippocampus, exerts an inhibitory effect on glutamatergic transmission through the activation of GalR1 and GalR2, ultimately inhibiting epileptic seizures (10). The anticonvulsant effects of galanin have prompted the development of agonists as well as encapsulated galanin-producing cells in the prospect of designing galanin-based anti-epileptic strategy (11,12). Despite all the past knowledge and advanced understanding of the anticonvulsant properties of galanin, there has not been yet any evidence for pathogenic mutations in the human galanin gene related to epilepsy.

Here, we report on the identification of a missense mutation (p.A39E) in exon 2 of the *GAL* gene, which encodes for galanin, in patients with TLE. We have shown that this galanin mutant affects galanin binding to receptors and downstream signaling and may ultimately lead to TLE. The results of our study further

strengthen the role of galanin in epilepsy and could have direct implications for patient care.

Results

Exome sequencing data

Whole exome sequencing was carried out on the parents-child trio (individuals I-1, I-2 and II-3; Fig. 1). On average, we produced 262 (± 9.3 SD) million reads per sample, 255 (± 8.8 SD) million were properly paired and mapped uniquely to the reference genome (hg19), 233 (± 8.2 SD) million reads remained after removal of duplicate reads, and among these, 165 (± 5.3 SD) million were on target. This resulted in an average coverage of at least 8x for 97.43% (± 0.04 SD) of the coding part of the RefSeq genes. An average of 27 412 (± 210 SD) variants was detected per individual. Supplementary Material, Table S1 provides a summary of the exome sequencing results for each individual.

Identification of *de novo* and recessive variants

In the absence of positive family history of seizures or other neurological manifestations, we hypothesized that the affected monozygotic twins were sporadic cases and looked for pathogenic *de novo* mutations in one member of the twin pair (individual II-3). We identified 2 *de novo* single nucleotide variants (SNVs) (Table 1). All small insertions/deletions (indels) classified as *de novo* were rejected during visual inspection mainly due to miscalling of indels in homopolymer tracts or trinucleotide repeats (data not shown). The first *de novo* SNV resulted in an aspartic acid to glycine change at position 137 of the cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2 precursor (*CRISPLD2*) gene (c.A410G; p.D137G). The second variant caused an alanine to glutamic acid substitution at position 39 of the galanin/GMAP prepropeptide (*GAL*) gene (c.C116A; p.A39E). These two variants were novel, not present in dbSNPv138 nor in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) database and were classified as damaging by SIFT, Polyphen2 and Mutation taster (Table 1). Up to date, *CRISPLD2* has never been associated with seizures or epilepsy but with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in several studies (13–15) except for one (16). The unaffected sister (II-1) did not carry this variant. However, as none of the twins presented with this condition, this gene was not further considered.

We also investigated the possibility of a recessive model and looked for the presence of homozygote or compound heterozygote mutations in the twins. We identified three genes (*BCR*, *MYO9A* and *SH3TC1*) with mutations compatible with an

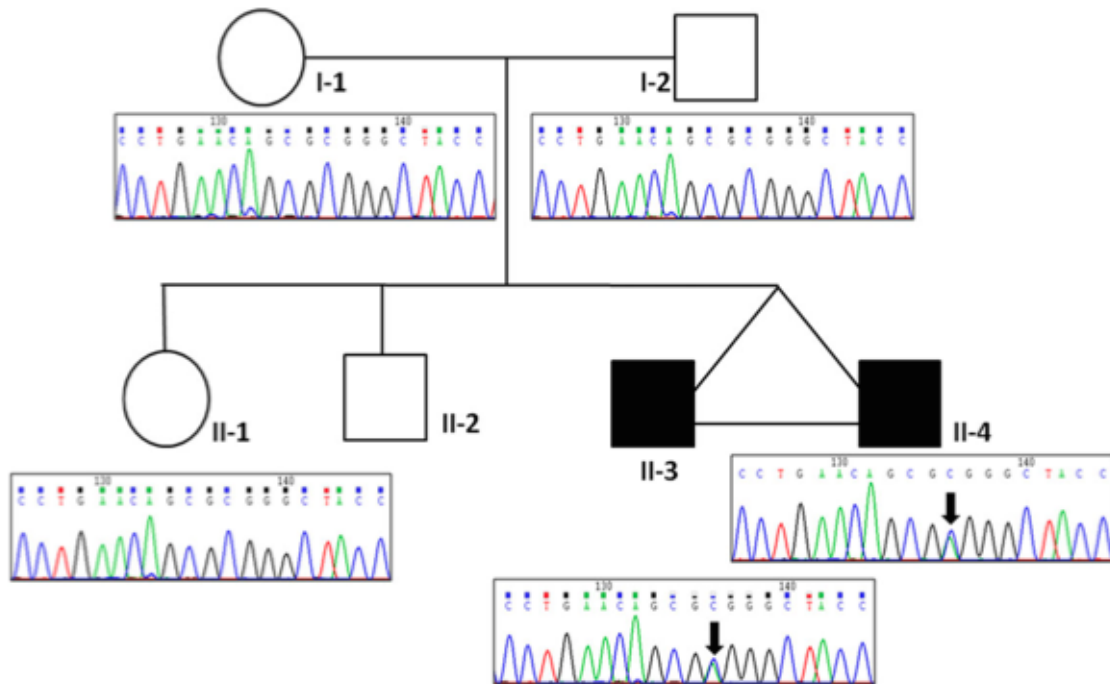


Figure 1. Pedigree structure of family EPI-ORA-AFF. Sanger sequencing traces showing the c.C116A (p.A39E) mutation in exon 2 of the GAL gene. The black arrows indicate the variant present in both affected twins (II-3 and II-4).

Table 1. List of validated *de novo* variants

Chr	Position	Gene (Acc. number)	Nucl. change	AA change	Cov. ^a	SIFT	PP2	MT	GERP
11	68'453'096	GAL (NM_015973.3)	c.C116A	p.A39E	370	0	0.93	0.98	2.45
16	84'883'042	CRISPLD2 (NM_031476.3)	c.A410G	p.D137G	140	0.02	0.99	0.99	5.03

SIFT, Sorting Intolerant from Tolerant algorithm; PP2, Polyphen2; MT, MutationTaster; GERP, Genomic Evolutionary Rate Profiling score.

Cov.^a: Number of reads after the removal of duplicates that covers this position.

DP4^b: Number of reads after the removal of duplicates that supports from left to right: forward reference allele—reverse reference allele—forward mutant allele—reverse mutant allele. Sum can be smaller than coverage because low-quality bases are not counted.

autosomal recessive mode of inheritance (Supplementary Material, Table S2). However, none of these genes has been linked to epilepsy. The BCR gene is the site of breakpoints used in the generation of the 2 alternative forms of the Philadelphia chromosome translocation found in chronic myeloid leukemia and acute lymphocytic leukemia (OMIM#151410). The MYO9A and SH3TC1 genes have not been associated with disorders. These genes were not further considered.

The galanin neuropeptide was found to act as a potent anticonvulsant and regulate epileptic seizures in animal models (17, for review). However, until now its role in human epilepsy was not established. All family members were subsequently screened for the p.(A39E) mutation using Sanger sequencing. We confirmed the wild-type allele in both parents and the unaffected sister and the mutated allele in both affected twins (Fig. 1).

The 30-amino-acid galanin is located at position 33 to 62 of the 123-amino-acid galanin/GMAP prepropeptide which also comprises a 5'-hydrophobic signal peptide and a 3'-galanin message-associated peptide (GMAP). These peptides are released upon cleavage at two Lysine-Arginine (KR) dibasic sites located

on either side of galanin (18). The p.(A39E) mutation affects the alanine at position 39 of the GAL prepropeptide (galanin precursor), which corresponds to the 7th residue of the 30-amino-acid mature galanin peptide. The first 15 residues of galanin are highly conserved throughout evolution and crucial for its biological activity (Fig. 2). The last 15 residues, which are less conserved, lack receptor affinity and are believed to protect the C-terminal half from proteolysis (19–21).

Screening of the GAL gene for mutations in patients with focal epilepsy (FE)

To further appreciate the contribution of galanin mutations in FE in humans, we performed mutation analysis of coding sequences and splice site junctions of exons 2 and 3 of the GAL gene, which encode for the galanin neuropeptide, in 530 individuals with TLE and 52 patients with various types of focal epilepsies. We also analyzed exon 1 to seek for potential nonsense and frameshift mutations. We did not find any potential pathogenic mutations suggesting that GAL mutations are a rare cause of TLE.

Human	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Gibbon	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Baboon	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Marmoset	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Gorilla	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Squirrel_monkey	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Crab-eating_macaque	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Lesser_Egyptian_jerboa	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Chinese_tree_shrew	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Mouse	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Rat	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Chinese_hamster	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Cape_golden_mole	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Guinea_pig	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Chinchilla	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Frailie_vole	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Fika	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Squirrel	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Pig	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
White_rhinoceros	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Alpaca	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Bactrian_camel	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Dolphin	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Killer_whale	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Cat	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Dog	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Cow	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Ferret	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Pacific_walrus	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Sheep	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Domestic_goat	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Weddell_seal	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
David's_nyctis_bat	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Microbat	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Big_brown_bat	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Tibetan_antelope	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Horse	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Shrew	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Elephant	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Cape_elephant_shrew	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Wallaby	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Opossum	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Armadillo	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Aardvark	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Tasmanian_devil	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Zebra_finch	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Tibetan_ground_jay	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Turkey	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Spiny_softshell_turtle	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Green_seaturtle	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Medaka	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Lamprey	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Spotted_gar	GWTLSN A GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS

Figure 2. Multiple species alignment of the predicted amino-acid sequences of the galanin peptide and flanking cleavage sites produced using the 100-way multiZ new (hg19) option in Galaxy (<https://usegalaxy.org/>). The flanking dibasic Arg-lys (KR) cleavage sites are depicted in green. Red arrows point to the residue found mutated in TLE patients (p.A39E).

Functional analysis of the p.(A39E) mutation

Galanin-receptor affinity analysis

Displacement studies of 125 I-galanin with hGal(WT) or hGal(A39E) peptides, were performed on cell membranes from human Bowes melanoma cells endogenously expressing human GalR1 (hGalR1), CHO cells stably transfected with human GalR2 (hGalR2) and finally Flp-In T-REX 293 cells with inducible expression of human GalR3 (hGalR3). When compared to that of hGal(WT), hGal(A39E) peptide showed similar binding affinities to hGalR1 (t-test two-tailed P-value = 0.25) and hGalR3 (t-test two-tailed; P-value = 0.10) but significantly decreased affinities to

hGalR2 (t-test two-tailed P-value = 0.03; Fig. 3 and Table 2). hGal(A39E) peptide also showed preferred binding to hGalR1 with a 8-fold selectivity when compared to hGalR2 and 259-fold selectivity when compared to hGalR3 (Table 2).

Galanin signaling analysis

Bowes cells expressing hGalR1 were pre-incubated with increasing concentrations of hGal(A39E) peptide (from 0.1 nM to 10 μ M) for 1 h before being stimulated with 100 nM hGal(WT). Cell index was monitored before and after the addition of the peptides. hGal(WT) peptide showed a half maximal effective

concentration (EC_{50}) value of 22.4 ± 2.56 nM (Fig. 4). hGal(A39E) peptide exhibited a dose-dependent inhibition of the hGal(WT) response, with a half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value of 486.5 ± 12.46 nM, suggesting that hGal(A39E) acts as an antagonist of galanin GalR1-mediated signaling (Fig. 4).

Signal transduction was examined by assessing the ability to stimulate inositol phosphate (IP) production in CHO cells expressing hGalR2. Both hGal(WT) and hGal(A39E) peptides stimulated IP production (Fig. 5). hGal(WT) stimulated IP production with a EC_{50} value of 17.1 ± 9.37 nM, whereas hGal(A39E) showed a statistically significant higher EC_{50} value of 124.3 ± 103 nM (t-test two-tailed, P-value = 0.0005) indicating that this mutant is a 7-fold less potent activator of hGalR2 (Fig. 5). The additive effect of different concentrations of hGal(A39E) on IP production obtained with 100 nM hGal(WT) was also assessed. hGal(A39E) showed a statistically significant additive effect starting from concentration of 1 μ M (one-way ANOVA, P-value < 0.001; Fig. 6). Indeed, an increase in IP production was observed when CHO cells were co-stimulated with hGal(WT) and hGal(A39E) compared to stimulation with hGal(WT) alone suggesting that hGal(A39E) acts as a

hGalR2 agonist (Fig. 6). hGal(A39E) at concentration below than 1 μ M did not show significant synergistic effect on the IP production induced by 100 nM hGal(WT) (Fig. 6).

Discussion

Here, we report on the identification of a *de novo* p.(A39E) mutation in the galanin/GMAP prepropeptide (GAL) gene in a family with TLE. The GAL gene encodes for the galanin neuropeptide which possesses anticonvulsant activities in animal models. Functional analysis of the mutant galanin peptide showed that it impairs galanin function in a dominant negative manner.

A role of galanin in epilepsy was first demonstrated 22 years ago by Mazarati and collaborators who showed that galanin decreased the severity of picrotoxin-kindled convulsions in rats and that seizures-induced galanin depletion may contribute to the maintenance of seizure activity, whereas the increase of galanin concentration may favor the cessation of seizures (9,22). In addition, transgenic mice that overexpress galanin showed increased resistance to seizure induction, whereas mice deficient for galanin showed higher seizure susceptibility (23). Galanin elicits a range of biological effects by interactions with three G-protein-coupled receptors (GalR). Both GalR1 and GalR2, which are expressed in the hippocampus, mediate anticonvulsant effect of galanin (24). GalR3, which is mainly expressed in the preoptic/hypothalamic area, has not been reported to play a role in epilepsy (25). The hippocampal formation, which is involved in seizures underlying TLE, receives galaninergic and excitatory glutamatergic innervations. Galanin fibers suppress this excitatory action through the opening of potassium channel which triggers membrane hyperpolarization and eventually inhibits glutamate release from presynaptic terminals (26). Our data on the function of the p.A39E mutant are consistent with this model; indeed, the p.A39E mutant, which has been shown to reduce galanin signaling, is predicted to increase neuronal excitability in the hippocampus, ultimately leading to TLE. The discovery of galanin mutations suggests that genetic variation in galanin may be important in TLE.

Analysis of GAL for mutations in 530 individuals with TLE and 52 patients with various types of focal epilepsies did not reveal additional pathogenic mutations indicating that galanin mutations are not important contributors to the genetics of TLE. However, mutation screening of other genes involved in galanin signaling, for instance the galanin receptors, would be necessary to comprehensively assess the contribution of galaninergic system to the genetics of TLE. Indeed, GalR1 has been shown to exacerbate hippocampal neuronal loss after status epilepticus (27) and CYM2503, a GalR2-positive allosteric modulator, has been shown to exhibit anticonvulsant effects in animal models (11).

Seventy two missense and loss-of-function mutations in the galanin/GMAP prepropeptide (GAL) gene have been reported by ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>). Among these mutations, only ten were predicted to affect galanin synthesis and/or

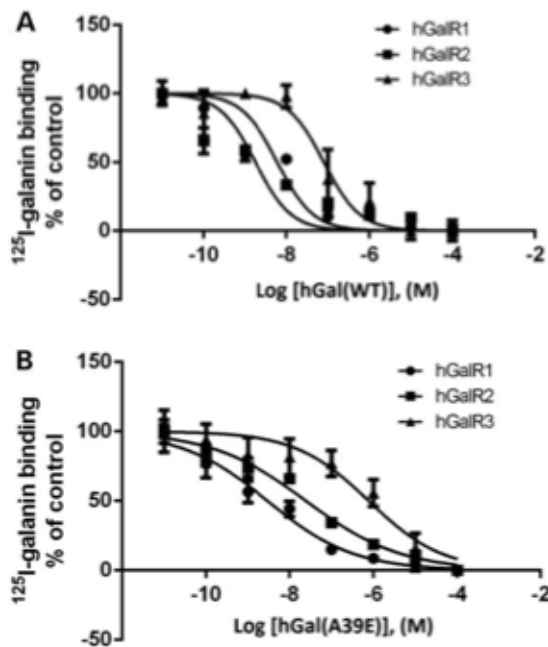


Figure 3. Galanin-receptors binding studies: Displacement of porcine-[125 I]-galanin from membranes by peptide hGal(WT) (A) or hGal(A39E) (B). Membranes were from human Bowes melanoma cells expressing GalR1 (closed circle), CHO cells expressing GalR2 (closed square) and Flp-InT-REx 293 cells expressing GalR3 (closed triangle). The data are from three representative experiments performed in duplicates, presented as mean \pm SEM.

Table 2. K_i values of hGal(WT) and hGal(A39E) towards galanin receptors 1, 2 and 3 (GalR1, 2 and 3)

Ki (nM; mean \pm SEM)	GalR1	GalR2	GalR3	Ki GalR2/ Ki GalR1	Ki GalR3/ Ki GalR1
hGal(WT)	6.071 ± 2.134	1.789 ± 0.684	80.90 ± 27.08	0.29	13.32
hGal(A39E)	3.001 ± 0.848	24.90 ± 7.01	780 ± 337	8.29	259.91
P-value (t-test)	0.252	0.03	0.1		

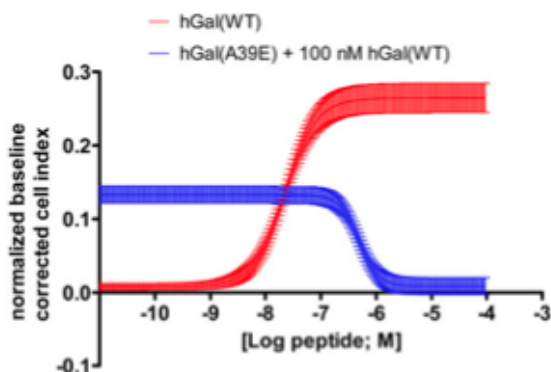


Figure 4. Inhibition of hGal(WT) stimulation by hGal(A39E) peptide. Serum-starved Bowes cells expressing GalR1 were pre-incubated for 1 h with hGal(A39E) peptide (0.1 nM to 10 μ M). Subsequently, cells were stimulated with 100 nM hGal(WT). Data are presented as mean \pm SEM. Cell index values were normalized with respect to the cell index at the time of ligand addition and baseline-corrected by subtracting the cell index obtained with PBS treatment.

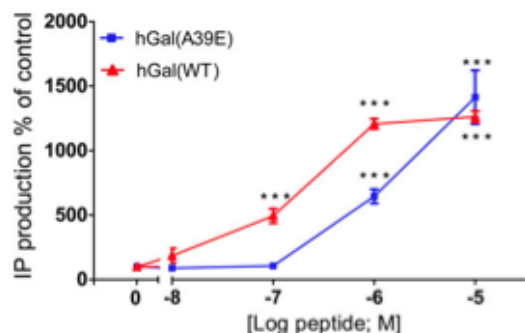


Figure 5. Inositol phosphate production in CHO cells expressing human GalR2. CHO cells were pre-incubated with 1 μ Ci [3 H]-myo-inositol for 24 h before being stimulated with peptides hGal(WT) or hGal(A39E) at increasing concentrations. Data are presented as percent of control (no peptide) and mean \pm SEM of three separate experiments. Significant level compared to controls: *** P < 0.001; one-way ANOVA, Tukey HSD post hoc comparison test.

function including six loss-of-function mutations and four missense mutations (Supplementary Material, Table S3). For instance, the p.Trp25leufsTer47 frameshift mutation is predicted to disrupt the synthesis of the galanin peptide which is located at position 33 to 62 of the 123-amino-acid galanin/GMAP prepropeptide. The other variants in the galanin/GMAP prepropeptide were missense mutations located in exons which do not encode for galanin and were therefore unlikely to affect galanin function. The pathogenic significance of these 10 variants is currently unknown as (i) there is no experimental data on their potential effect on galanin function and (ii) the phenotypic status of the carriers is not available. Even if considering that they are all pathogenic, their cumulative allele frequency was calculated at 0.0246% which is well-below the prevalence of TLE estimated at 0.17% (28). Our functional analysis of the hGal(A39E) mutant favored dominant negative effect over haploinsufficiency as a potential mechanism for causation. Among the ten variants predicted to affect galanin, the missense mutations are most likely to act in a dominant negative manner. Their cumulative frequency was calculated at 0.0075% which is compatible with their involvement as a very rare cause of TLE.

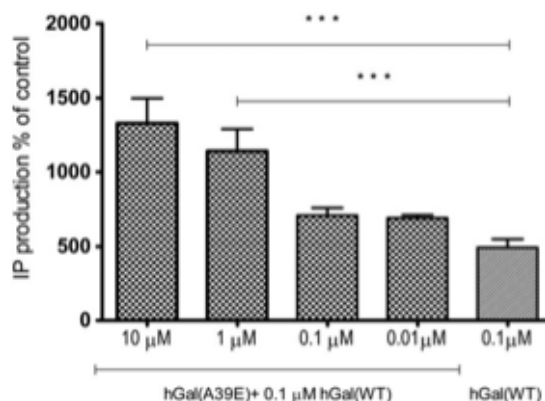


Figure 6. Inositol phosphate production in CHO cells expressing human GalR2. CHO cells were pre-incubated with 1 μ Ci [3 H]-myo-inositol for 24 h before being stimulated with increasing concentrations of hGal(A39E) in the presence of 100 nM of hGal(WT). Data are presented as percent of control (no peptide) and mean \pm SEM of three separate experiments. *** P < 0.001; one-way ANOVA, Tukey HSD post hoc comparison test.

The anticonvulsant effects of galanin have prompted the development of various approaches targeting the galanin system for the treatment of epilepsy. For example, Lu et al. (11) have developed a GalR2-positive allosteric modulator, which potentiates the galanin action. Rodents with induced seizures that had received this compound showed increased seizures threshold and reduced seizures duration. The p.A39E mutant, which showed antagonist effects on GalR1 and reduced agonist effects on GalR2, is likely to have direct implications for the development of galanin-based anti-epileptic molecules.

Materials and Methods

Monozygotic twins with TLE

Monozygotic twins affected by TLE, born to healthy and non-consanguineous parents, were evaluated by one of the authors (AC) at the Neurology Department of Oran University Hospital (Algeria) (Fig. 1). Clinical data for the other members of the family (with the exception of II-2) were obtained in a field trip during which history and examination were performed by the same neurologist. All members of this family underwent an electroencephalography (EEG). All family members gave their informed consent for this study.

Based on detailed clinical seizure description in the twins, the diagnosis of TLE was established. Patient II-3, now 30 years old, denied both febrile seizures (FS) and central nervous system (CNS) infections. He has had a normal development. He started having isolated auras characterized by abdominal discomfort, incoherent speech, palpitations and blurred vision for one or two minutes at the age of 13 years. He did not come to medical attention until he had his first secondarily generalized seizure one year later. His EEG activity showed burst of theta oscillations in the temporal lobe. He had complex partial seizures at 19 years of age. Brain MRI did not show hippocampal sclerosis or any other anomalies. He is treated with carbamazepine (600 mg/day) and is seizure-free.

Patient II-4 is treated for TLE since the age of 13 years. His seizure description was suggestive of mesial temporal origin (auditory hallucinations, slow ideation, forced thoughts and

déjà-vu). The complex partial seizures included loss of awareness and staring. On occasion, they evolved into generalized tonic-clonic seizures. EEG showed a temporal focus and photosensitivity. Brain MRI analysis did not show hippocampal sclerosis or other anomalies. He became seizure-free with Levetiracetam (1 g/day).

Samples for screening of galanin mutations

Patients with partial epilepsy

Hundred and eighty-one unrelated individuals of European ancestry were admitted to the Epilepsy Unit at Montpellier University Hospital (France) with a diagnosis of FE according to ILAE Classification of 1989 (29). These patients suffered from a severe form of epilepsy with poor seizure control, although they were treated by anti-epileptic drugs (AEDs). Diagnosis was based on patient history, clinical examination, interictal and ictal EEG analysis carried out with monitoring video-EEG, and magnetic resonance imaging. The study group consisted of patients who suffered from non-lesional and lesional FE (including vascular malformation, cortical dysplasia, and nervous system tumor). These FE patients showed the following distribution of epilepsy syndromes: 129 patients with TLE (71.4%), 25 patients with frontal epilepsy (13.7%), 12 patients with frontotemporal epilepsy (6.6%), 4 patients with temporo-occipital epilepsy (2.2%), 3 patients with mesial-parietal epilepsy (1.6%), 2 patients with parietal epilepsy (1.1%), 2 patients with parieto-occipital epilepsy (1.1%), 1 patient with multifocal epilepsy (0.5%), 1 patient with temporo-parietal epilepsy (0.5%) and 2 patients with undetermined FE (1.1%). This study was approved by the ethics committee of the University Hospitals of Montpellier.

Thirty-seven unrelated patients were recruited in Lyon (n = 14) (GL, PR), Strasbourg (n = 18) (GR, EH) and Clermont Ferrand (n = 5) (DSR) through a multicenter research project (Projet Hospitalier de Recherche Clinique 2007-A00481-52 from the French ministry of health, coordinator Dr Philippe Ryvlin) that was approved by the local Ethics Committee (CPP SUD-EST IV). All these patients had a diagnosis of drug-resistant TLE based on patient history, clinical examination, interictal and ictal EEG analysis carried out with monitoring video-EEG, and magnetic resonance imaging.

Hundred and thirty-one unrelated adult individuals of European ancestry were recruited at the Swiss Epilepsy Center in Zurich (Switzerland). All individuals were diagnosed with TLE, two of which had a bilateral temporal focus. Within this cohort, severity of phenotypes, subgroups of TLE, familiarity as well as response to AEDs was diverse. The study was approved by the ethics committee of the Kanton Zurich.

Hundred and fifty-nine patients with sporadic lateral temporal epilepsy (LTE) were collected as part of a collaborative study supported by the Genetics Commission of the Italian League Against Epilepsy (LICE). Diagnosis of LTE was made according to a clinical history of at least two lifetime seizures with auditory symptoms such as ringing, humming, sounds, voices, music, or sudden hearing loss. Sporadic LTE patients were selected according to the following inclusion criteria: (i) absence of first and second-degree relatives (siblings, children, parents, grandparents, aunts and uncles) with epileptic seizures; (ii) absence of neuro-radiological abnormalities including mesial temporal sclerosis; (iii) absence of mutations in the *LGII* gene. Exclusion criteria were an insufficient or doubtful family history and lack of neuroimaging data. All patients underwent repeated EEG recordings according to the 10–20 International System during wakefulness and, when possible, during diurnal sleep induced by sleep

deprivation. Each patient underwent high resolution MRI scan of the brain. This study was approved by LICE and local ethics committees.

Sixty-four unrelated patients were recruited at the Department of Neurology and Epileptology (Tübingen) and Department of Neuropediatrics (Kiel). Thirty-two children were diagnosed with focal epilepsies (FE), 18 children with TLE, 10 of which had abnormal MRI scan (mesial temporal sclerosis (n = 1), cortical dysplasia (n = 5), 1 with heterotopia (n = 1), arachnoidal cysts (n = 2), proencephalic cyst temporal (n = 1)). Among these 18 TLE patients, 11 had normal intelligence, 6 had intellectual disability and 1 was not assessed. Six patients were diagnosed with frontal lobe epilepsy (FLE), two of which had abnormal MRI scan (cortical dysplasia frontal lobe (n = 1), unspecific gliosis (n = 1)). Among these six FLE patients, one had behavior problems, one had mild intellectual disability and four had normal intelligence. Eight children with undetermined focal seizures (unclassified focal seizures/secondary generalized seizures), two of which had abnormal MRI scan [subcortical heterotopias suspected with hippocampus malrotation (n = 1), unspecific anomalies (n = 1)]. Among these eight patients, one had behavior problems, one had mild intellectual disability and six had normal intelligence.

Forty-nine unrelated Caucasian individuals (mainly of German origin) with mesial TLE were recruited as a part of the genetic and pharmacogenetic studies which were approved by the local Ethics Committee (Department of Neurology and Epileptology University of Tübingen). All reported patients gave written informed consent previous to the study inclusion. The diagnosis of mesial TLE occurred according to patient history, clinical examination, EEG analysis and magnetic resonance imaging. A hippocampal sclerosis was detected in almost all cases (n = 48; 97%). Most of the patients (n = 40, 81%) suffered from refractory epilepsy, only 14% became seizure-free (n = 5 without surgery and n = 2 after surgery). In two cases, the outcome was unknown. Before study inclusion, the patients had an average of 5.4 (n = 49) trials of anti-epileptic medication and 6.6 (n = 42) seizures per month on average.

Exome capture and sequencing

Exome capture from the parents and one of the twins of family EPI-ORA-AFF (Fig. 1, individuals I-1, I-2 and II-3) was carried out on 2 µg of genomic DNA extracted from blood using the SureSelect Human ALL Exon v5 kit (Agilent Technologies). High-throughput sequencing was performed on a HiSeq2000. Demultiplexed fastq files were obtained for each sample using the Illumina CASAVA v1.8.2 software and processed by our 'in-house' pipeline running on the Vital-IT Center for high-performance computing of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB; (<http://www.vital-it.ch>)). Specifically, Burrows-Wheeler Aligner (BWA) was used to align the sequencing reads to the human reference genome NCBI build (GRCh37/hg19). SAMtools was used to remove duplicate reads. SNVs and small insertions and deletions (INDELS) were called using bcftools and Pindel 0.2.4, respectively. The minimum number of reads required for allele calling was set at eight. SNVs and INDELS variants were then functionally annotated using the ANNOVAR package.

Identification of *de novo* and recessive variants

Potential pathogenic variants under *de novo* or recessive models were identified using VariantMaster (30). Variants detected in the proband with Samtools and PINDEL quality scores ≥ 150 and ≥ 600 , respectively were retained for subsequent analysis. These

variants were further filtered so as to exclude variants found outside of exons or splice sites (± 2) and variants with a minimum allele frequency greater than 0.02 in dbSNPv138 (Database of Single Nucleotide Polymorphism) and/or the Exome Variant Server (EVS) database. VariantMaster used the raw data (BAM files) to robustly estimate the probability of the remaining variants to be present in the parents and siblings. Variants were classified as *de novo* only if both parents were found to be homozygous for the reference allele. Homozygote or compound heterozygote variants in the proband that were predicted as damaging by at least two of the three prediction algorithms used (SIFT, Polyphen2 and Mutation Taster) were classified as recessive only if both parents were carriers and the genotype of the unaffected sister was different from that of the proband. All variants classified as *de novo* or recessive by VariantMaster, were subsequently visually inspected using the SAMtools text alignment viewer. The remaining candidate variants were then validated using Sanger sequencing on an ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Peptide synthesis

Peptides (Human galanin 1–30 wild type [hGal(WT)]: GWTLSA GYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTSS and Human galanin A39E mutant [hGal(A39E)]: GWTLSSEG YLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTSS) were synthesized at 0.1 mmol scale on an automated microwave peptide synthesizer (Biotage® Initiator + Alstra™) using Fmoc (fluorenylmethyloxycarbonyl) solid-phase peptide synthesis strategy with HMPB-ChemMatrix 0.4 mmol/g resin as solid phase to obtain peptide acid. The first amino acid was attached to resin using symmetrical anhydride. All other coupling reactions were carried out using OxymaPure/DIC in DMF with DIEA as an activator base. The final cleavage was performed using standard protocol (95% TFA/2.5% TIS/2.5% H₂O). Peptides were purified by reversed-phase HPLC using BioBasic C-8 column (Thermo Scientific, Sweden) and a gradient of 20–80% acetonitrile/water containing 0.1% TFA. The identity of peptides was analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry Voyager-DE STR (Applied Biosystems) in positive linear mode using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix.

Galanin-receptor binding assays

Cells for ¹²⁵I-galanin-receptor displacement studies were seeded in 150-mm dishes and cultured 3–4 days until confluent. Cell dishes were washed and scraped in to phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged twice at 4°C, 3000 g for 5 min. The pellet was re-suspended in assay buffer (20 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, pH 7.4) supplemented with EDTA (5 mM EDTA) and incubated on ice for 45 min before centrifugation at 4°C, 8500 g for 15 min. After washing, the pellet was re-suspended in assay buffer supplemented with 1% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to a protein concentration of 1 mg/ml. Protein concentration was determined according to Lowry (BioRad, Stockholm, Sweden). Displacement studies on cell membranes were performed in a final volume of 200 μ l, containing 0.15 nM porcine-[¹²⁵I]-galanin (2200 Ci/mmol; Perkin-Elmer Life Science, Boston, MA, USA), 30 μ g cell membrane and various concentrations of peptide (10^{-5} – 10^{-9} M). Peptide solutions were made in assay buffer supplemented with 0.3% bovine serum albumin (BSA). Samples were shaken at 37°C for 30 min and filtered through a MultiScreen-FB filter plate (Millipore, Billerica, MA, USA) pre-soaked in 0.3% polyethylenimine solution (Sigma-Aldrich). The filters were washed thrice with assay buffer and the

retained radioactivity was determined in a β -counter (Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer, model 2500 TR; Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA) using OptiPhase Supermix Cocktail (Perkin-Elmer Life Science, Boston, MA, USA) as scintillation fluid. IC₅₀ values for the peptides were calculated using Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and converted into K_i values using the equation of Cheng-Prusoff (31).

xCELLigence cellular impedance assay

The impedance-based readout used by the xCELLigence System (Roche Applied Science) is based on the principle that the adhesion of cultured cells directly onto microelectrodes induces changes in the local ionic environment at the electrode/solution interface, conferring an increase in electrode impedance. As a result, any changes in cell physiological properties that modulate the physical contact between cell and electrode will be reflected by changes in the measured impedance, defined by the cell index variable. xCELLigence System can be used for functional screening of G-protein-coupled receptors (GPCRs) activity, based on its ability to modulate the actin cytoskeleton and cell adhesion (32–34). Bowes cells expressing GalR1 were seeded at 20000 cells per well on 96-well E-Plates (ACEA Biosciences Inc.) and placed on the Real-time xCELLigence Cell Analyzer (Roche Applied Science) platform at 37°C and 5% CO₂. After 24 h incubation, growth media was changed for assay buffer (HBSS containing 0.1% BSA). Three hours later, hGal(A39E) peptide was added (0.1 nM to 10 μ M), after 1 h incubation, hGal(WT) was added at 100 nM. The xCELLigence System was employed to measure changes in cellular impedance following ligand stimulation. Resulting dose-response relationships were plotted using mean values from four replicates. Cell index values were normalized by dividing the cell index at the time of ligand addition and baseline-corrected by subtracting the cell index obtained with PBS treatment. Data analysis was done with built-in xCELLigence System software and presented with GraphPad Prism.

Inositol phosphate accumulation assay

CHO cells stably expressing human GalR2 were seeded in 12-well plates and cultured until confluent. Then cells were incubated 24 h with 1 μ Ci [³H]-myo-inositol in M-199 medium containing 100 U ml⁻¹ penicillin and 100 μ g ml⁻¹ streptomycin. CHO GalR2 cells were washed twice with HEPES Krebs Ringer (HKR) buffer (5 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 2.05 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 1 g/l glucose, pH 7.4) followed by 10 min pre-incubation in 800 μ l HKR buffer with 10 mM LiCl at 37°C. hGal(A39E) peptide (10^{-5} – 10^{-8} M) with or without hGal(WT) (10^{-7} M) was added to a final volume of 1000 μ l and incubated for 60 min at 37°C. The reaction was terminated by addition of 200 μ l ice cold 20% perchloric acid followed for 10 min followed by the addition of 1.5 M KOH/75 mM HEPES (pH 7). Anion exchange chromatography was performed over 1 cm 50:50 Dowex (AG 1-X8 Resin, 200–400 mesh formate; BioRad, Hercules, CA, USA). The columns were washed with 5 ml distilled water before the IPs were eluted with 5 ml of 0.1 M formic acid/1.2 M ammonium formate. Radioactivity of the eluate was determined using scintillation counting in a β -counter (Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer, model 2500 TR, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA) using Ultima Flo AF (Perkin-Elmer Life Science, Boston, MA, USA) as scintillation fluid. Each sample was normalized against the total count obtained before anion exchange chromatography.

Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

Acknowledgements

We thank Dr Michael Lang and Prof. Dr Herbert Schreiber (Practice for Neurology and Psychiatry, Ulm, Germany) for their contribution to the recruitment of the patients from Tübingen.

Conflict of interest statement. None declared.

Funding

We thank the Swiss National Science Foundation (SNF-144082) and NCCR Synapsy grant for supporting the S.E.A. laboratory. C. N. was supported by Telethon-Italy (Grant no. GGP12078) and by the LICE Genetics Commission. U.L. is supported by the Swedish research Council.

References

- Manford, M., Hart, Y.M., Sander, J.W. and Shorvon, S.D. (1992) National General Practice Study of Epilepsy (NGPSE): partial seizure patterns in a general population. *Neurology*, **42**, 1911–1917.
- Berkovic, S.F., McIntosh, A., Howell, R.A., Mitchell, A., Sheffield, L.J. and Hopper, J.L. (1996) Familial temporal lobe epilepsy: a common disorder identified in twins. *Ann. Neurol.*, **40**, 227–235.
- Vadlamudi, L., Scheffer, I.E. and Berkovic, S.F. (2003) Genetics of temporal lobe epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **74**, 1359–1361.
- Schulte, U., Thumfart, J.O., Klocker, N., Sailer, C.A., Bildl, W., Biniossek, M., Dehn, D., Deller, T., Eble, S., Abbass, K. et al. (2006) The epilepsy-linked *Lgi1* protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kv β 1. *Neuron*, **49**, 697–706.
- Dibbens, L.M., de Vries, B., Donatello, S., Heron, S.E., Hodgson, B.L., Chintawar, S., Crompton, D.E., Hughes, J.N., Bellows, S.T., Klein, K.M. et al. (2013) Mutations in *DEPDC5* cause familial focal epilepsy with variable foci. *Nat. Genet.*, **45**, 546–551.
- Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Cherniack, A.D., Chen, W.W., Ottina, K.A., Grabiner, B.C., Spear, E.D., Carter, S.L., Meyerson, M. and Sabatini, D.M. (2013) A tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science*, **340**, 1100–1106.
- Tatemoto, K., Rokaeus, A., Jornvall, H., McDonald, T.J. and Mutt, V. (1983) Galanin—a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett.*, **164**, 124–128.
- Mechenthaler, I. (2008) Galanin and the neuroendocrine axes. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 1826–1835.
- Mazarati, A.M., Halaszi, E. and Telegdy, G. (1992) Anticonvulsive effects of galanin administered into the central nervous system upon the picrotoxin-kindled seizure syndrome in rats. *Brain Res.*, **589**, 164–166.
- Lerner, J.T., Sankar, R. and Mazarati, A.M. (2008) Galanin and epilepsy. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 1864–1871.
- Lu, X., Roberts, E., Xia, F., Sanchez-Alavez, M., Liu, T., Baldwin, R., Wu, S., Chang, J., Wasterlain, C.G. and Bartfai, T. (2010) GalR2-positive allosteric modulator exhibits anticonvulsant effects in animal models. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*, **107**, 15229–15234.
- Nikitidou, L., Torp, M., Fjord-Larsen, L., Kusk, P., Wahlberg, L. U. and Kokaia, M. (2014) Encapsulated galanin-producing cells attenuate focal epileptic seizures in the hippocampus. *Epilepsia*, **55**, 167–174.
- Chiquet, B.T., Lidral, A.C., Stal, S., Mulliken, J.B., Moreno, L.M., Arcos-Burgos, M., Valencia-Ramirez, C., Blanton, S.H. and Hecht, J.T. (2007) CRISPLD2: a novel NSCLP candidate gene. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 2241–2248.
- Shi, J., Jiao, X., Song, T., Zhang, B., Qin, C. and Cao, F. (2010) CRISPLD2 polymorphisms are associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in a northern Chinese population. *Eur. J. Oral Sci.*, **118**, 430–433.
- Letra, A., Menezes, R., Cooper, M.E., Fonseca, R.F., Tropp, S., Govil, M., Granjeiro, J.M., Imoehl, S.R., Mansilla, M.A., Murray, J.C. et al. (2011) CRISPLD2 variants including a C471 T silent mutation may contribute to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Cleft. Palate Craniofac. J.*, **48**, 363–370.
- Girardi, A., Martinelli, M., Carinci, F., Morselli, P.G., Caramelli, E. and Scapoli, L. (2011) No evidence for a role of CRISPLD2 in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in an Italian population. *Eur. J. Oral Sci.*, **119**, 102–105.
- Webbing, K.E., Runesson, J., Bartfai, T. and Langel, U. (2012) Galanin receptors and ligands. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **3**, 146.
- Evans, H., Baumgartner, M., Shine, J. and Herzog, H. (1993) Genomic organization and localization of the gene encoding human preprogalanin. *Genomics*, **18**, 473–477.
- Land, T., Langel, U. and Bartfai, T. (1991) Hypothalamic degradation of galanin(1–29) and galanin(1–16): identification and characterization of the peptidolytic products. *Brain Res.*, **558**, 245–250.
- Land, T., Langel, U., Low, M., Berthold, M., Uden, A. and Bartfai, T. (1991) Linear and cyclic N-terminal galanin fragments and analogs as ligands at the hypothalamic galanin receptor. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **38**, 267–272.
- Bedecs, K., Langel, U. and Bartfai, T. (1995) Metabolism of galanin and galanin (1–16) in isolated cerebrospinal fluid and spinal cord membranes from rat. *Neuropeptides*, **29**, 137–143.
- Mazarati, A.M., Liu, H., Soomets, U., Sankar, R., Shin, D., Katsumori, H., Langel, U. and Wasterlain, C.G. (1998) Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus. *J. Neurosci.*, **18**, 10070–10077.
- Mazarati, A.M., Hohmann, J.G., Bacon, A., Liu, H., Sankar, R., Steiner, R.A., Wynick, D. and Wasterlain, C.G. (2000) Modulation of hippocampal excitability and seizures by galanin. *J. Neurosci.*, **20**, 6276–6281.
- Lang, R., Gundlach, A.L. and Kofler, B. (2007) The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease. *Pharmacol. Ther.*, **115**, 177–207.
- Mennicken, F., Hoffert, C., Pelletier, M., Ahmad, S. and O'Donnell, D. (2002) Restricted distribution of galanin receptor 3 (GalR3) mRNA in the adult rat central nervous system. *J. Chem. Neuroanat.*, **24**, 257–268.
- Zini, S., Roisin, M.P., Langel, U., Bartfai, T. and Ben-Ari, Y. (1993) Galanin reduces release of endogenous excitatory amino acids in the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.*, **245**, 1–7.
- Schauwecker, P.E. (2010) Galanin receptor 1 deletion exacerbates hippocampal neuronal loss after systemic kainate administration in mice. *PLoS One*, **5**, e15657.

28. Tellez-Zenteno, J.F. and Hernandez-Ronquillo, L. (2012) A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res. Treat.*, **2012**, 630853.
29. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. (1989) Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, **30**, 389–399.
30. Santoni, F.A., Makrythanasis, P., Nikolaev, S., Guipponi, M., Robyr, D., Bottani, A. and Antonarakis, S.E. (2014) Simultaneous identification and prioritization of variants in familial, de novo, and somatic genetic disorders with VariantMaster. *Genome Res.*, **24**, 349–355.
31. Cheng, Y. and Prusoff, W.H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 3099–3108.
32. Solly, K., Wang, X., Xu, X., Strulovici, B. and Zheng, W. (2004) Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev. Technol.*, **2**, 363–372.
33. Scott, C.W. and Peters, M.F. (2010) Label-free whole-cell assays: expanding the scope of GPCR screening. *Drug Discov. Today*, **15**, 704–716.
34. Stallaert, W., Dorn, J.F., van der Westhuizen, E., Audet, M. and Bouvier, M. (2012) Impedance responses reveal beta(2)-adrenergic receptor signaling pluridimensionality and allow classification of ligands with distinct signaling profiles. *PLoS One*, **7**, e29420.

Annexe 2

Questionnaire d'investigation de l'épilepsie

Date (JJ/MM/AAAA) / / / / / /

Code

Nom de l'investigateur

/ / / / / /

/ / / /

DONNEES DEMOGRAPHIQUESNe rien inscrire
dans la colonne

D1) Le sujet répond à l'enquête : (Oui = 1 ; Non = 2)

/ /

/ /

D2) Si non, préciser la personne qui répond ?

/ /

D3) Un traducteur a-t-il été nécessaire ? (Oui = 1 ; Non = 2)

/ /

/ /

Etat-Civil du sujet enquêté :

D4) Nom (en majuscules) :

D5) Prénom :

D6) Adresse (tout renseignement permettant de retrouver l'individu) :

.....

.....

.....

D7) Ville :

/ /

D8) Pays :

/ /

D9) Age :

/ /

/ /

D10) Date de naissance : (JJ/MM/AAAA)

/ / / / / /

/ / / /

D11) Lieu de naissance :

/ /

D12) Sexe : (Masculin = 1 ; Féminin = 2)

/ /

/ /

D13) Quel est le statut marital du sujet ?

/ /

/ /

(Marié(e) = 1 ; Concubinage = 2 ; Vit avec ses parents = 3 ; Vit seul(e) = 4 ;
Autres = 5 ; Ne sait pas = 9)

D14) Quelle est la durée du séjour du sujet enquêté dans la région de l'enquête ?

/ /

/ /

(De passage = 1 ; Moins de 1 an = 2 ; Depuis 1 à 5 ans = 3 ; Depuis 5 à 10 ans = 4 ;
Depuis plus de 10 ans = 5 ; Depuis la naissance = 6 ; Ne sait pas = 9)

D15) Quelle est la profession, ou l'activité, du sujet enquêté ?

/ /

/ /

(Salarié ou fonctionnaire = 1 ; Artisan ou commerçant = 2 ; Agriculteur = 3 ; Etudiant = 4 ;
Éleveur = 5 ; Travail à domicile = 6 ; Inactif = 7 ; Profession libérale = 8 ; Autres = 9)

Date (JJ/MM/AAAA) /_/_/|_:_/|_:_/|_:_/|_:_/

Code

Nom de l'investigateur

|_:_/|_:_/|_:_/|_:_/|_:_/|_:_/

|_:_/|_:_/|_:_/|_:_/

Ne rien inscrire
dans la colonne

D16) Si autres, préciser :

|_/_

D17) Le sujet habite-t-il en milieu ?

|_/_

|_/_

(Urbain = 1 ; Rural = 2 ; Ne sait pas = 9)

D18) Le sujet effectue-t-il ses besoins dans ?

|_/_

|_/_

(Toilettes intérieures = 1 ; Latrines extérieures = 2 ; Nature / campagne = 3 ; Ne sait pas = 9)

(Réponses facultatives) :

D19) Ethnie (préciser) :

|_/_

D20) Religion ?

|_/_

|_/_

(Chrétienne = 1 ; Musulmane = 2 ; Animiste = 3 ; Bouddhiste = 4 ; Hindouiste = 5 ;
Autres = 6 ; Ne sait pas = 9)

D21) Si autre religion, préciser :

|_/_

Date (JJ/MM/AAAA) /_:_/:_:_/:_:_:_/

Code

Nom de l'investigateur

/_:_:_//_:_:_//_:_:_/

/_:_:_:_/

DEPISTAGENe rien inscrire
dans la colonne*Pour les questions S1 à S5 (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)****Le sujet enquêté a-t-il déjà présenté :***

S1) Perte(s) de connaissance et / ou perte d'urine et / ou émission de bave ? /_/_/ /_/_/

S2) Absence(s) ou perte(s) de contact avec l'entourage de début brutal et de durée brève ?
/_/_/ /_/_/S3) Secousses ou mouvements anormaux incontrôlables au niveau d'un ou des
membres (convulsions), de début soudain et d'une durée de quelques minutes ? /_/_/ /_/_/S4) Apparition brutale et de durée brève de sensations corporelles étranges,
d'hallucinations ou d'illusions visuelles, auditives ou olfactives ? /_/_/ /_/_/S5) A-t-on déjà dit au sujet enquêté qu'il était épileptique ou qu'il avait
déjà présenté des crises d'épilepsie ? /_/_/ /_/_/***Si au moins une réponse est oui, le patient doit être
examiné par l'équipe médicale***S6) En conclusion, le sujet enquêté doit-il être examiné par l'équipe médicale ? /_/_/ /_/_/
(Oui = 1 ; Non = 2)

Date (JJ/MM/AAAA) /__:/__:/__:/__:/__:/__

Code

Nom de l'investigateur

/__:/__:/__:/__:/__:/__

/__:/__:/__:/__

CONFIRMATION DE L'ÉPILEPSIE

Ne rien inscrire
dans la colonne

EC1) Description, en clair, du ou des malaises (signes fonctionnels) pouvant correspondre à une crise d'épilepsie :

.....

.....

.....

.....

.....

EC2) Ce ou ces malaise(s) est-il ou sont-ils en relation avec une situation particulière ou une affection intercurrente * ? (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9) /__/ /__/

EC3) Si oui, préciser laquelle : /__/

EC4) Au moins un de ces malaises correspond t-il à une crise d'épilepsie ? (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9) /__/ /__/

EC5) Si non, quel a été le diagnostic évoqué ? /__/

.....

EC6) Si oui, s'agit-il d'une crise d'épilepsie unique ? (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9) /__/ /__/

HISTOIRE NATURELLE DE L'EPILEPSIE

Ne rien inscrire
dans la colonne

N1) Le sujet a-t-il présenté une crise dans les 5 dernières années ? / /
(Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)

N2) Age de survenue de la première crise ? / /
(Au cours des 10 premiers jours de vie = 1 ; Plus de 10 jours à 6 mois = 2 ;
Plus de 6 mois à 2 ans = 3 ; Plus de 2 ans à 6 ans = 4 ; Plus de 6 ans à 12 ans = 5 ;
Plus de 12 ans à 20 ans = 6 ; Plus de 20 à 40 ans = 7 ; Plus de 40 ans = 8 ; Ne sait pas = 9)

Pour les questions N3 à N14 : (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)

Le sujet enquêté a-t-il déjà présenté :

N3) Crises généralisées tonico-cloniques ? / /

N4) Crises généralisées myocloniques ? / /

N5) Crises généralisées atoniques ? / /

N6) Absences ? / /

N7) Autre variété de crises généralisées ? / /

N8) Si oui, préciser : /

N9) Crises partielles simples ? / /

N10) Crises partielles complexes ? / /

N11) Crises partielles secondairement généralisées ? / /

N12) Autre type de crise difficile à classer ? / /

N13) Etat de mal épileptique ? / /

N14) Crises multiples ? / /

Si plusieurs types de crises d'épilepsie :*(questions N15 à N17)**Crises généralisées tonico-cloniques = 1 ; Crises généralisées myocloniques = 2 ;**Crises généralisées atoniques = 3 ; Absences = 4 ; Crises partielles simples = 5 ;**Crises partielles complexes = 6 ; Crises partielles secondairement généralisées = 7 , Autres = 9*Ne rien inscrire
dans la colonne

- | | | |
|---|--------------------------|--------------------------|
| N15) Type de la première crise d'épilepsie ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| N16) Type des crises les plus récentes ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| N17) Type des crises les plus fréquentes ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| N18) Age de début du second type de crise d'épilepsie ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <i>(Au cours des 10 premiers jours de vie = 1 ; Plus de 10 jours à 6 mois = 2 ;
Plus de 6 mois à 2 ans = 3 ; Plus de 2 ans à 6 ans = 4 ; Plus de 6 ans à 12 ans = 5 ;
Plus de 12 ans à 20 ans = 6 ; Plus de 20 à 40 ans = 7 ; Plus de 40 ans = 8 ; Ne sait pas = 9)</i> | | |

Facteurs déclenchants les crises : (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)

- | | | |
|--|--------------------------|--------------------------|
| N19) Emotion ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| N20) Alcool ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| N21) Sommeil ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| N22) Manque de sommeil ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| N23) Stimulations lumineuses (<i>soleil sur l'eau ; télévision ; boîtes de nuit</i>) ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| N24) Hyperventilation ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| N25) Menstruation ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| N26) Arrêt du traitement anti-épileptique ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| N27) Drogues ou agents toxiques ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| N28) Si oui, préciser : | | <input type="checkbox"/> |
| N29) Au réveil ou dans l'heure qui suit ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| N30) Si d'autres facteurs déclenchent les crises, préciser : | | <input type="checkbox"/> |

ANTECEDENTSNe rien inscrire
dans la colonne

P1) Quel est le rang de naissance du sujet enquêté dans sa fratrie ?	/__ : __/	/__ : __/
P2) Le sujet enquêté a-t-il un jumeau ou une jumelle ? (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)	/__	/__
P3) Existe-t-il des liens de consanguinité entre les parents ? (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)	/__	/__
P4) Si oui, préciser :		/__
P5) Existe-t-il des antécédents familiaux d'épilepsie (parents, grands parents, frères, soeurs, enfants, oncles, tantes, cousins, cousines) ? (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)	/__	/__
P6) Si oui, préciser le ou les membre (s) de la famille :		/__
.....		
P7) Existe-t-il d'autres antécédents neurologiques familiaux ? (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)	/__	/__
P8) Si oui, préciser le ou lesquels et chez qui :		/__
.....		
P9) La grossesse de la mère du sujet enquêté s'est-elle déroulée normalement ? (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)	/__	/__
P10) Si non, préciser :		/__
.....		
P11) La mère du sujet enquêté n-t-elle pris des médicaments pendant sa grossesse ? (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)	/__	/__
P12) Si oui, préciser le ou lesquels :		/__
.....		
Accouchement (naissance du sujet enquêté) :		
P13) Lieu de naissance du sujet enquêté ? (Domicile = 1 ; Case de Santé = 2 ; Dispensaire = 3 ; Hôpital = 4 ; Autres = 5 ; Ne sait pas = 9)	/__	/__
Pour les questions P14 à P17 (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)		
P14) A-t-il été long et / ou pénible ?	/__	/__
P15) S'est-il déroulé sous péridurale ou anesthésie générale ?	/__	/__
P16) S'est-il déroulé par césarienne ?	/__	/__

A la naissance :Ne rien inscrire
dans la colonne**Pour les questions P18 à P19 (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)**

- P18) Le sujet enquêté est-il né prématuré ?
- P19) Le sujet enquêté a-t-il crié immédiatement ?
- P20) Poids de naissance ? (en grammes)

Allaitement :

- P21) L'allaitement du sujet enquêté a-t-il été ou est-il (si enfant) ?
(Maternel = 1 ; Artificiel = 2 ; Mixte = 3 ; Ne sait pas = 9)

Développement psychomoteur pendant l'enfance :

- P22) Le développement psychomoteur dans l'enfance du sujet a-t-il été ?
(Normal = 1 ; Anormal = 2 ; Ne sait pas = 9)
- P23) Si anormal, préciser :
-

Antécédents médicaux :**Pour les questions P24, 25, 27, 30, 32, 35, 36, 39, 42, 44.**

(Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)

- P24) Le sujet a-t-il eu une rougeole sévère ?
- P25) Le sujet a-t-il eu une encéphalite et / ou une encéphalopathie ?
- P26) Si oui, préciser :
- P27) Le sujet a-t-il eu une méningite ?
- P28) Si oui, préciser :
- P29) Si autre(s) affection(s) importante(s), préciser :
-
- P30) Le sujet a-t-il été (ou est-il) hospitalisé pour une ou plusieurs autre(s) affection(s) que son épilepsie ?
- P31) Si oui, préciser la ou lesquelles :
-
- P32) Le sujet a-t-il eu un traumatisme crânien avec perte de connaissance avant la survenue de ses crises d'épilepsie ?
- P33) Si oui, préciser le type de traumatisme :
-
- P34) Si oui, quel a été le délai entre le traumatisme et l'apparition de la comitialité ? (Moins de 2 ans = 1 ; Plus de 2 ans = 2 ; Ne sait pas = 9)

Ne rien inscrire
dans la colonne

- P35) Le sujet a-t-il eu un coma prolongé post traumatique ?
- P36) L'épilepsie a-t-elle débuté après une maladie ?
- P37) Si oui, préciser :
- P38) Si oui, préciser le délai d'apparition de la comitialité après cette maladie ?
(Moins de 2 ans = 1 ; Plus de 2 ans = 2 ; Ne sait pas = 9)
- P39) Le sujet enquêté a-t-il gardé des séquelles neurologiques d'une ou de plusieurs
maladie(s) ?
- P40) Si oui, préciser quelle(s) séquelle(s) :
-
- P41) Si oui, préciser de quelle(s) maladie(s) :
-

Toxiques :

- P42) Le sujet enquêté consomme-t-il ou a-t-il consommé de façon excessive de l'alcool ?
- P43) Si oui, préciser la durée de cette intoxication (en années) : : :
- P44) Le sujet enquêté consomme-t-il ou a-t-il consommé de la drogue ?
- P45) Si oui, préciser le ou les type(s) de stupéfiant :
-
- P46) Si oui, préciser la ou les voie(s) d'administration :
-

Contacts répétés avec les animaux suivants :

(Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)

- P47) Chiens ou chats ?
- P48) Porcs ?
- P49) Si autres, préciser :
-

EXAMEN CLINIQUE

	Ne rien inscrire dans la colonne	
CE1) En dehors de la ou des crise(s), le sujet enquêté se plaint-il d'autre(s) trouble(s) ? (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)	/ _ /	/ _ /
CE2) Si oui, préciser :		/ _ /
.....		
<i>Examen général :</i>		
CE3) L'état général apparent du sujet enquêté est-il ? (Bon = 1 ; Correct = 2 ; Mauvais = 3 ; Ne sait pas = 9)	/ _ /	/ _ /
CE4) Poids (en kilogrammes) ?	/ _ : _ : _ /	/ _ : _ : _ /
CE5) Taille (en centimètres) ?	/ _ : _ : _ /	/ _ : _ : _ /
<i>Examen neurologique :</i> (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)		
CE6) Examen neurologique normal ?	/ _ /	/ _ /
CE7) Si examen neurologique anormal , préciser les signes et le diagnostic :		/ _ /
.....		
.....		
.....		
.....		
.....		
.....		
CE8) Le sujet enquêté présente-t-il un retard mental ? (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)	/ _ /	/ _ /
CE9) Si oui, ce retard mental est-il ? (Léger = 1 ; Moyen = 2 ; Profond = 3 ; Ne sait pas = 9)	/ _ /	/ _ /

Ne rien inscrire
dans la colonne

Examen des autres appareils :

Pour les questions CE10 à CE18

(Normal = 1 ; Anormal = 2 ; Non fait = 3 ; Ne sait pas = 9)

CE10) Cardio-vasculaire ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CE11) Respiratoire ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CE12) Digestif ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CE13) Endocrinien ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CE14) Génital ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CE15) Urinaire ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CE16) O.R.L. ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CE17) Ophtalmologique ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CE18) Dermatologique (dont brûlures et nodules) ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CE19) Si examen anormal, préciser :		<input type="checkbox"/>

.....

.....

.....

.....

EXAMENS COMPLEMENTAIRES

Ne rien inscrire
dans la colonne*Bilan biologique sanguin : (Normal = 1 ; Anormal = 2 ; Non fait = 3 ; Ne sait pas = 9)*

PI1) Numération Formule Sanguine ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI2) Si anormal, préciser :		<input type="checkbox"/>
PI3) Vitesse de Sédimentation ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI4) Si anormal, préciser :		<input type="checkbox"/>
PI5) Urée ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI6) Si anormal, préciser :		<input type="checkbox"/>
PI7) Créatininémie ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI8) Si anormal, préciser :		<input type="checkbox"/>
PI9) Glycémie à jeun ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI10) Si anormal, préciser :		<input type="checkbox"/>
PI11) Electrophorèse de l'hémoglobine ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI12) Si anormal, préciser :		<input type="checkbox"/>
PI13) Si autres examens biologiques, préciser lesquels :		<input type="checkbox"/>
.....		
PI14) Si autres examens biologiques, préciser leurs résultats :		<input type="checkbox"/>
.....		

Neuro-imagerie : (Normal = 1 ; Anormal = 2 ; Non fait = 3 ; Ne sait pas = 9)

PI15) Radiographie(s) du crâne ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI16) Tomodensitométrie cérébrale ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI17) Imagerie par résonance magnétique ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI18) Si examen anormal, préciser la localisation et le type d'anomalie :		<input type="checkbox"/>
.....		
PI19) Si autres examens radiologiques, préciser lesquels :		<input type="checkbox"/>
.....		
PI20) Si autres examens radiologiques, préciser leurs résultats :		<input type="checkbox"/>
.....		

Bilan électroencéphalographique (EEG) :

- PI21) Un ou des examen(s) électroencéphalographique a ou ont-ils été déjà effectué(s) ?
 (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)
- PI22) L'examen EEG était-il effectué en phase ?
 (Critique = 1 ; Inter-critique = 2 ; Ne sait pas = 9)
- PI23) Un des EEGs était-il anormal ?
 (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)

Si au moins un EEG était anormal décrivez le plus significatif :

(Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)

- PI24) Pointes ou pointes ondes ?
- PI25) Pointes ondes généralisées à 3 cycles / secondes ou plus ?
- PI26) Photosensibilité ?
- PI27) Pointes focales ?
- PI28) Ondes lentes focales ?
- PI29) Pointes ondes et poly-pointes ondes généralisées ?
- PI30) Ondes lentes généralisées ?
- PI31) Ralentissement de l'activité de fond ?
- PI32) Si autres anomalies à l'EEG, préciser lesquelles :

- PI33) Si autres anomalies à l'EEG, préciser leurs localisations :

- PI34) Existait-il une corrélation électro-clinique ?
- PI35) Préciser les éléments électroencéphalographiques les plus pertinents pour déterminer l'étiologie de cette épilepsie ?

Bilan sérologique :

1 ère case (Normal = 1 ; Anormal = 2 ; Non fait = 3 ; Ne sait pas = 9)

2 ème case (Sérum = S ; Liquide céphalorachidien = L ; Sérum + liquide céphalorachidien = B)

PI36) VIH	1 : / <input type="checkbox"/>	2 : / <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI37) Syphilis	1 : / <input type="checkbox"/>	2 : / <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI38) Toxoplasmose	1 : / <input type="checkbox"/>	2 : / <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI39) Cysticercose	1 : / <input type="checkbox"/>	2 : / <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI40) Bilharziose	1 : / <input type="checkbox"/>	2 : / <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PI41) Si autres examens sérologiques, préciser lesquels :			<input type="checkbox"/>	

.....

PI42) Si autres examens sérologiques, préciser leurs résultats :

.....

Bilan microbiologique :
(bactéries, virus, parasites)

PI43) Des prélèvements microbiologiques ont-ils été effectués ?
(Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)

PI44) Si oui, préciser lesquels :

.....

.....

.....

PI45) Si oui, préciser leurs résultats :

.....

ETIOLOGIES

Ne rien inscrire
dans la colonne

E1) L'étiologie de l'épilepsie est-elle ?
(Certaine = 1 ; Suspecte = 2 ; Ne sait pas = 9)

E2) Si la cause de cette épilepsie est certaine ou suspecte, définir le caractère de cette épilepsie :

Idiopathique (*épilepsie identifiée sur des éléments électro-cliniques,
le plus souvent héréditaire*) = 1

Symptomatique (*épilepsie en rapport avec des lésions cérébrales anciennes fixes,
stables ou non évolutives*) = 2

Symptomatique (*épilepsie en rapport avec une affection cérébrale en cours d'évolution*) = 3

Cryptogénique (*épilepsie non classable comme idiopathique ou symptomatique,
sans composante génétique*) = 4

E3) Si le caractère de l'épilepsie est symptomatique, préciser la cause :

.....
.....
.....

E4) Conclusion sur l'étiologie probable de cette épilepsie :

.....

TRAITEMENTS

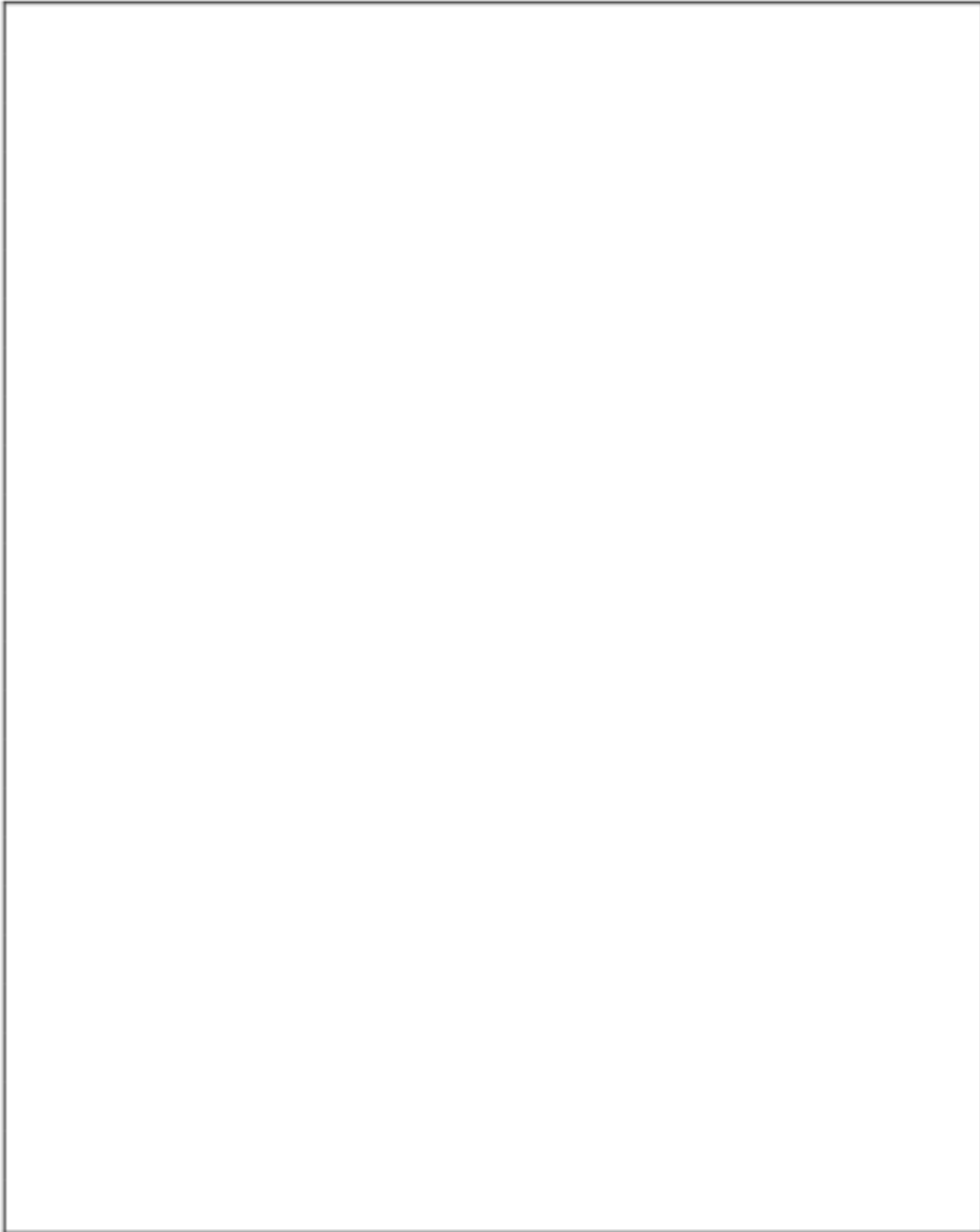
Ne rien inscrire
dans la colonne

- T1) Quel est ou était le type de traitement anti-épileptique pris par le sujet ?
(Traditionnel = 1 ; Médicamenteux = 2 ; Mixte (1 et 2) = 3 ; Successif (1 puis 2) = 4 ; Successif (2 puis 1) = 5 ; Pas de traitement = 6 ; Ne sait pas = 9)
- T2) Si la réponse à la question T1 est 4 ou 5, préciser le délai entre les prises
 des 2 types de traitement (en mois) :
- Si traitement traditionnel :**
- T3) Qui a donné le traitement ?
(Auto-prescription ou famille = 1 ; Sorcier = 2 ; Tradipraticien = 3 ; Autres = 4 ; Ne sait pas = 9)
- T4) Quelle est la nature des produits utilisés ?
(Végétal = 1 ; Animal = 2 ; Minéral = 3 ; Mixte = 4 ; Aucun produit utilisé = 5 ; Ne sait pas = 9)
- T5) Quel est le mode d'administration ?
(Voie orale = 1 ; Voie cutanée = 2 ; Scarifications = 3 ; Amulettes = 4 ; Inhalations = 5 ; Bains = 6 ; Prières ou incantations = 7 ; Autres = 8 ; Ne sait pas = 9)
- T6) Régularité de la prise du traitement ?
(Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)
- T7) Si non, pourquoi ?
(Raisons personnelles = 1 ; Médicaments parfois indisponibles = 2 ; Pas d'argent pour acheter les médicaments = 3 ; Autres = 4 ; Ne sait pas = 9)
- T8) Si autres, préciser :
- T9) Efficacité du traitement (à apprécier par le sujet) ?
(Bonne = 1 ; Moyenne = 2 ; Mauvaise = 3 ; Nulle = 4 ; Ne sait pas = 9)
- T10) Efficacité du traitement (à apprécier par l'entourage) ?
(Bonne = 1 ; Moyenne = 2 ; Mauvaise = 3 ; Nulle = 4 ; Ne sait pas = 9)
- T11) Efficacité du traitement (à apprécier par le médecin) ?
(Bonne = 1 ; Moyenne = 2 ; Mauvaise = 3 ; Nulle = 4 ; Ne sait pas = 9)

Si traitement médicamenteux :**Pour les questions T12 à T21 (Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)**

- T12) Barbituriques ?
- T13) Diazépines ?
- T14) Diphényl hydantoïne ?
- T15) Carbamazépine ?
- T16) Ethosuximide ?
- T17) Valproate ?
- T18) Vigabatrin ?
- T19) Gabapentín ?
- T20) Lamotrigine ?
- T21) Felbamate ?
- T22) Autres, préciser :
- T23) Régularité de la prise du traitement ?
(Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)
- T24) Si non, pourquoi ?
(Raisons personnelles = 1 ; Médicaments parfois indisponibles = 2 ;
Pas d'argent pour acheter les médicaments = 3 ; Autres = 4 ; Ne sait pas = 9)
- T25) Si autres, préciser :
- T26) Efficacité du traitement (à apprécier par le sujet) ?
(Bonne = 1 ; Moyenne = 2 ; Mauvaise = 3 ; Nulle = 4 ; Ne sait pas = 9)
- T27) Efficacité du traitement (à apprécier par l'entourage) ?
(Bonne = 1 ; Moyenne = 2 ; Mauvaise = 3 ; Nulle = 4 ; Ne sait pas = 9)
- T28) Efficacité du traitement (à apprécier par le médecin) ?
(Bonne = 1 ; Moyenne = 2 ; Mauvaise = 3 ; Nulle = 4 ; Ne sait pas = 9)
- T29) Effets indésirables liés au traitement anti-épileptique ?
(Aucun = 1 ; Léthargie, somnolence, ralentissement = 2 ; Ataxie, troubles de posture = 3 ;
Hypertrophie gingivale = 4 ; Difficultés d'apprentissage = 5 ; Hyperactivité = 6 ;
Rash cutané = 7 ; Autres = 8 ; Ne sait pas = 9)
- T30) Dosages médicamenteux des anti-épileptiques :
(Oui = 1 ; Non = 2 ; Ne sait pas = 9)
- T31) Si oui, préciser :
-

COMMENTAIRES DES INVESTIGATEURS



Annexe 3

Formulaires de consentement et copie du journal officiel



République Algérienne Démocratique et Populaire
 وزارة الصحة والسكان وإصلاح المستشفيات
Ministère de la Santé de la Population et de la Réforme Hospitalière
Centre Hospitalo-universitaire D'Oran
Service de Neurologie

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

Nom :.....

Prénom :.....

L'investigateur signataire m'a informé(e) oralement et par écrit des buts et du déroulement de l'étude génétique des épilepsies.

J'ai les informations pour l'étude susmentionnée. J'ai reçu des réponses satisfaisantes aux questions concernant ma participation à cette étude. Je reçois une copie de ma déclaration écrite de consentement.

J'ai eu suffisamment de temps pour réfléchir avant de prendre ma décision.

J'accepte le fait que les spécialistes responsables et les représentants des commissions d'éthique aient un droit de regard sur les données originales me concernant pour procéder à des vérifications, ces informations restant toutefois strictement confidentielles.

Je participe volontairement à cette étude dont les analyses se dérouleront aux hôpitaux de Genève en Suisse. Je peux à tout moment retirer mon accord de participation sans avoir à donner de raisons. Aucun inconvénient pour la suite de ma prise en charge ne découlera de cette décision.

Je consens à participer

Date et lieu.....

.....

(signature du patient)

Date et lieu.....

.....

(signature du représentant légal s'il y a lieu)

Date et lieu.....

.....

(signature de l'investigateur)



République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة الصحة والسكان وإصلاح المستشفيات
Ministère de la Santé de la Population et de la Réforme Hospitalière
Centre Hospitalo-universitaire D'Oran
Service de Neurologie

استمارة موافقة

اللقب

الاسم

الباحث الممضي اسفله بلغني شفويا و كتابيا عن اهداف و كيفية اجراء الدراسة الوراثية المتعلقة بمرض الصرع
 لدي كل المعلومات المتعلقة بالدراسة المذكورة اعلاه
 تحصلت على اجوبة كافية للأسئلة التي طرحتها و المتعلقة بمشاركتي في هذه الدراسة
 استلمت نسخة من تصريح الكتابي على موافقتي التامة
 اخذت الوقت الكافي للتفكير قبل اخذ هذا القرار
 اتقبل من الاخصائيين و ممثلي لجان الاخلاقيات حق النظر في اجراء التحقيقات الخاصة ببياناتي اللتي
 ستظل سرية
 اشارك طوعا في هذه الدراسة الوراثية التي ستتم تحاليلها بمخابر سويسرا
 يمكنني ان انسحب في اي وقت دون ابداء اية اسباب

او افق على المشاركة

التاريخ و المكان رقم بطاقة التعريف امضاء
 المريض.....

التاريخ و المكان رقم بطاقة التعريف امضاء
 الممثل القانوني.....

التاريخ و المكان امضاء الطبيب.....

Article 43 :

Le médecin, le chirurgien dentiste doit d'efforcer d'éclairer son malade par une information intelligible et loyale sur les raisons de tout acte médical.

Article 44 :

Tout acte médical, lorsqu'il présente un risque sérieux pour le malade est subordonné au consentement libre et éclairé du malade ou celui des personnes habilitées par lui ou par la loi. Si le malade est en péril ou incapable d'exprimer son consentement, le médecin, le chirurgien dentiste doit donner les soins nécessaires.

Article 45 :

Dés lors, qu'il a accepté de répondre à une demande, le médecin, le chirurgien dentiste s'engage à assurer à ses malades, des soins consciencieux, dévoués, conformes aux données récentes de la science et de faire appel, s'il y a lieu, à l'aide de confrères compétents et qualifiés.

Article 46 :

Le médecin, le chirurgien dentiste ne doit jamais se départir d'une attitude correcte et attentive. Il doit respecter la dignité du malade.

Article 47 :

le médecin, le chirurgien dentiste doit formuler ses prescriptions avec toute la clarté nécessaire. Il doit veiller à la bonne compréhension des prescriptions par le malade ou par son entourage. Il doit s'efforcer d'obtenir la bonne exécution du traitement.

Article 48 :

Le médecin, le chirurgien dentiste, appelé à donner des soins dans une famille ou ans une collectivité, doit s'efforcer d'obtenir le respect des règles d'hygiènes et de prophylaxie. Il signale au malade et à son entourage leur responsabilité à cet égard, vis à vis d'eux-mêmes et de leur entourage.

Article 49 :

En cas de refus de soins médicaux, il est exigé du malade, une déclaration écrite à cet effet.

Article 50 :

Le médecin, le chirurgien dentiste peut se dégager de sa mission à condition que la continuité des soins aux malades soit assurée.

Résumé

L'existence d'une composante génétique dans l'épilepsie est connue depuis des années grâce aux études épidémiologiques de concordance entre jumeaux et d'agrégation familiale, qui fournissent des preuves convaincantes pour l'héritabilité de l'épilepsie. En dépit des avancées majeures des techniques d'exploration pangénomique, les épilepsies génétiques n'ont pas encore livré tous leurs secrets. Cette étude avait pour objectifs de caractériser des variants génétiques de vulnérabilité à l'épilepsie, d'étudier les modes de transmission et d'analyser les relations génotype/phénotype chez des familles Algériennes.

Il s'agit d'une étude prospective menée au service de Neurologie du CHU d'Oran sur une période de 05 ans. Des familles multigénérationnelles comportant chacune au moins deux individus épileptiques ont participé à l'étude. Les analyses génétiques réalisées consistaient en un séquençage exomique de nouvelle génération, la technique de Southern Blot, et la recherche de variations du nombre de copies d'ADN (CNV) par la technique de CGH-array.

Parmi les quarante familles ayant participé à l'étude, six ont bénéficié d'études génétiques. Ces études ont permis d'identifier une mutation *de novo* (p.A39E) dans le gène *GAL* codant pour le neuropeptide galanine chez des jumeaux monozygotes atteints d'épilepsie du lobe temporal (ELT). Le rôle du peptide Galanine dans la régulation du processus d'épileptogénèse a été démontré il y a plus de deux décennies sur des modèles animaux, mais à ce jour, aucune mutation *GAL* en rapport avec un phénotype épileptique n'avait été décrite chez l'Homme. Nous avons complété l'étude génétique par des analyses *in silico* qui ont confirmé l'hypothèse de causalité de la mutation identifiée, et corrélé le génotype au phénotype dans cette famille. Nos résultats pourraient avoir des retombées directes sur le développement de molécules antiépileptiques à base de galanine et de traitements par thérapie génique. Nous avons analysé une deuxième famille au phénotype d'ELT et comorbidités psychiatriques. Le séquençage exomique a mis en évidence un variant (rs55689103) du gène *RELN* déjà incriminé dans l'épilepsie et la schizophrénie. Nous avons identifié deux autres familles au phénotype d'épilepsie myoclonique progressive de type 1. L'étude génétique par Southern Blot a confirmé l'expansion du dodécamère CCCGCCCCGCG dans le gène *EPM1*. Par ailleurs, deux autres familles ont été analysées par CGH-array, mais aucun CNV pathogène n'a été identifié par cette technique. L'étude d'autres familles multigénérationnelles permettrait d'identifier de nouveaux variants génétiques des épilepsies.

Mots clés : épilepsie, génétique, phénotype, pedigree, polymorphisme, mutation, CNV, CGH-array, séquençage exomique.

ملخص

لقد أكدت العديد من الدراسات وجود عنصر وراثي قوي في تقرير مرض الصرع, ومع ذلك لا تزال البنية الجينية لهذه الاضطرابات غير مفهومة.

هدفت هذه الدراسة إلى البحث عن المتغيرات الجينية لمرض الصرع و كذلك تحليل انتقال المرض في أسر جزائرية متعددة الأجيال

لقد أنجزنا دراسة استطلاعية في مصلحة أمراض الأعصاب بالمستشفى الجامعي بوهان على مدى خمس سنوات, تضمنت عائلات تحتوي على عدة أفراد مصابين بمرض الصرع. كشفت التحاليل الجينية عن طفرة جديدة في الجين GAL الذي يشفر الببتيد galanine عند توأمين مصابين بمرض الصرع.

و لقد تبين دور هذا الببتيد في مرض الصرع منذ أكثر من 20 سنة في نماذج حيوانية, و لكن إلى يومنا هذا, لم توصف أية طفرة في هذا الجين عند الإنسان. يمكن أن يكون لهذه النتائج تأثير مباشر على تطوير أدوية جديدة مضادة للصرع. كما درسنا أسرتين مصابتين ب 1EMP . أظهرت التحاليل طفرة في الجين 1EPM.

بالإضافة الى ذلك, تم تحليل عائلتين باستخدام-CGH_array لكن لم يتم اكتشاف أية طفرة بهذه التقنية. ان دراسة عائلات متعددة الأجيال ستمكننا من اكتشاف متغيرات جينية جديدة لمرض الصرع.

كلمات البحث: الصرع, علم الوراثة, النمط الظاهري, الطفرة, تغير النسخ

Abstract:

A genetic component to epilepsy has been recognized since Antiquity and is well established through twin and familial aggregation studies, which provide convincing evidence for the heritability of epilepsy. Despite major advances in genetic studies, genetic epilepsies have not yet revealed all their secrets. This prospective study aimed to identify genetic variants of epilepsy, to document the genotype/phenotype correlations and inheritance patterns in multigenerational Algerian families. Genetic analyzes included exome sequencing, CGH-array and Southern blotting.

We studied a family with a pair of monozygotic twins affected by temporal lobe epilepsy. Exome sequencing revealed that both twins carried a novel *de novo* mutation (p.A39E) in the *GAL* gene encoding the galanin neuropeptide. This latter was found to act as a potent anticonvulsant and regulates epileptic seizures in animal models. However, until now its role in human epilepsy was not established. Functional analysis showed evidence that the mutant protein disrupts galanin signalling, and strongly supports *GAL* as the causal gene for the TLE in this family.

We described a family with two siblings affected by temporal lobe epilepsy and psychiatric comorbidities. Exome sequencing identified a single nucleotide polymorphism in the *RELN* gene (rs55689103) whose mutations have been associated with epilepsy and schizophrenia.

We identified two families with progressive myoclonus epilepsy type 1. Genetic studies by Southern blotting showed an expansion of dodecamer CCCCCCCCCG in *EPM1* gene. In addition, two other families were analysed by CGH-array, but no pathogenic CNV was identified. The study of other multigenerational families would identify new genetic variants of epilepsy.

Keywords: epilepsy, genetics, phenotype, pedigree, polymorphism, mutation, CNV, CGH-array, exome sequencing.