



**HAL**  
open science

# Encéphalopathie KCNB1 : du phénotype humain aux modèles poissons-zèbres

Claire Bar Maillet

► **To cite this version:**

Claire Bar Maillet. Encéphalopathie KCNB1 : du phénotype humain aux modèles poissons-zèbres. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS561 . tel-04002077

**HAL Id: tel-04002077**

**<https://theses.hal.science/tel-04002077>**

Submitted on 23 Feb 2023

**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.

# Sorbonne Université

Ecole doctorale « Cerveau Cognition Comportement »

*U1163 “Translational Research for Neurological Diseases”, Institut Imagine, Paris*

---

## **Encéphalopathie *KCNB1* :** **Du phénotype humain aux modèles poissons-zèbres**

---

Par Claire Bar  
Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par le Pr Rima Nabbout

Présentée et soutenue publiquement le 21 décembre 2021

Devant un jury composé de :

Pr Didier Lacombe, PU-PH

Pr Lieven Lagae, PU-PH

Dr Sorana Ciura, DR

Pr Edouard Hirsch, PU-PH

Dr Marianne Renner, DR

Pr Rima Nabbout, PU-PH

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Examinatrice

Directrice de thèse



*A Maïa, Candice, Juliette, Sarah,  
A Soline, Arthur, Guillaume, Léonard,  
A Mathéo, Noah, Vincent, Antoine et tous les autres...*

## Remerciements

---

La thèse de science vient bousculer le chemin tout tracé du cursus médical, créant une parenthèse délicate semée de doutes, de questionnements, d'échecs, mais aussi de rencontres, de joies, de succès et d'amitiés nouvelles. Elle n'est pas le résultat d'une seule personne mais le fruit d'un travail d'équipe. Je souhaite donc ici remercier les personnes ayant participé de près ou de loin à ce travail.

Tout d'abord, je souhaite remercier le Professeur Didier Lacombe et le Professeur Lieven Lagae qui m'ont fait l'honneur de consacrer du temps pour relire cette thèse et en être les rapporteurs. Je tiens aussi à remercier le Docteur Marianne Renner et le Professeur Edouard Hirsch pour leur accompagnement et leurs conseils lors des comités de suivi de thèse et pour me faire l'honneur de leur présence en tant que membres du jury de soutenance de thèse.

Je tiens à remercier particulièrement le Docteur Edor Kabashi de m'avoir accepté dans son équipe et de m'avoir fait découvrir, avec le Docteur Sorana Ciura, le monde mystérieux et merveilleux du poisson-zèbre ! Merci pour votre accompagnement bienveillant tout au long de ce travail, votre disponibilité et vos conseils.

Enfin, ces quelques lignes ne suffiront jamais assez pour remercier le Professeur Rima Nabbout pour tout ce qu'elle m'a apporté depuis mon passage en tant qu'interne à Necker il y a 5 ans... Merci de m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce nouveau travail de thèse, après m'avoir déjà encadré pour la thèse de médecine. Merci pour ton compagnonnage médical dans le monde de l'épileptologie pédiatrique, pour ton accompagnement scientifique dans les différents travaux de recherche effectués ensemble, pour ta confiance, ton soutien infaillible et ton énergie communicative. Je n'aurai jamais pu aller aussi loin dans ce travail sans ta disponibilité, ta patience, tes conseils et ton savoir.

Je tiens également à remercier ici l'association KCNB1 France et toutes les familles de patients qui ont participé à ce travail. Je tiens à remercier particulièrement Me Mélissa Cassard, présidente de l'association, pour son aide sans laquelle ce travail n'aurait pas été possible. Je remercie également tous les médecins qui m'ont transmis les données de leurs patients et que je ne pourrais pas tous citer ici, ce travail est le fruit d'une collaboration internationale exemplaire.

Je remercie la Ligue Française Contre l'Epilepsie de m'avoir accordé la bourse 2019 ayant permis le financement de ma 2<sup>ème</sup> année de thèse. Enfin, je remercie l'Institut Imagine, lieu

unique de rencontre entre cliniciens et chercheurs, de m'avoir ouvert ses portes et permis la réalisation de ce travail dans des conditions exceptionnelles.

Je dois ensuite un immense merci à toute l'équipe du laboratoire pour m'avoir si bien accueillie. Hortense, Solène, Anca, Mélissa, Letizia, Grégoire, Raphaël et Annis... merci pour votre disponibilité lorsque j'en avais besoin et vos conseils tout au long de ce travail, quel plaisir de travailler à vos côtés ! Merci à Lisa pour son aide lors de son stage de M2 et à Lauralee, grâce à qui ce travail se poursuit pour mieux comprendre cette maladie. Merci aussi à Giulia pour sa disponibilité et sa gentillesse, à Mathieu pour ses talents de statisticien et à Delphine, pour nos nombreuses discussions nourries de son expertise neuropsychologique.

Merci ensuite à l'ensemble des équipes médicales de neurologie pédiatrique et d'électrophysiologie de Necker pour m'avoir permis de continuer d'apprendre à leurs côtés durant ces années parisiennes. Merci aussi à l'équipe de neurologie pédiatrique bordelaise pour leur soutien durant cette dernière année de thèse et première année de clinicat, et particulièrement au Dr Pedespan pour sa confiance depuis le début et au Dr Villega pour m'avoir guidé sur le chemin de la recherche fondamentale.

Enfin, il y a tous ceux qui me soutiennent sans forcément le savoir, en me permettant de ne pas perdre de vue l'essentiel.

Mes témoins et amis, pour leur fidélité durant ces années bien chargées, pour tous les moments partagés et les pauses bien méritées.

Mes frères et ma sœur, mes beaux-frères et belles-sœurs, mes beaux-parents, pour leur soutien et leurs encouragements.

Mes parents, pour m'avoir transmis leur passion de la médecine mais aussi l'importance de la famille. Merci pour leur soutien au quotidien et dans les moments difficiles, leur écoute toujours attentive, leurs conseils et leur générosité...Merci pour tout.

Margaux et Auguste, mes petites têtes blondes que j'aime tant et qui donnent du sens à tout ça...

Et enfin Alexandre, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir suivi dans cette aventure parisienne, merci pour ton soutien infaillible durant ces années, ta patience, ta confiance qui me rend plus forte, et tout ce que tu fais pour notre famille...*Totem*.



## **VALORISATIONS SCIENTIFIQUES**

---

### Articles de journaux

- **Bar C**, Breuillard D, Kuchenbuch M et al. Adaptive behavior and psychiatric comorbidities in KCNB1 encephalopathy. Accepted in *Epilepsy & Behavior*
- **Bar C**, Kuchenbuch M, Barcia G, et al. Developmental and epilepsy spectrum of KCNB1 encephalopathy with long term outcome. *Epilepsia*. 2020;00:1–13.
- **Bar C**, Barcia G, Jennesson M, et al. Expanding the genetic and phenotypic relevance of KCNB1 variants in developmental and epileptic encephalopathies: 27 new patients and overview of the literature. *Hum Mutat*. 2020;41(1):69-80

### Communications orales

- **Bar C**. Présentation des résultats de thèse dans le cadre de la bourse de la LFCE. Journées Françaises de L'épilepsie 2021, Strasbourg
- **Bar C**. Spectre mutationnel et phénotypique de l'encéphalopathie développementale par mutation du gène KCNB1. Congrès de la Société Française de Neurologie Pédiatrique 2020

### Posters

- L. Robichon, **C. Bar**, L. Lehmann, S. Renault, S. Ciura, E. Kabashi, R. Nabbout. Zebrafish model : study of KCNB1 in developmental and epileptic encephalopathies. European College of Neuropsychopharmacology Congress 2021, Lisbonne
- **C.Bar**, G. Barcia, M.Jennesson, et al. Extension du spectre mutationnel et phénotypique de l'encéphalopathie développementale et épileptique par mutation du gène KCNB1. Assises de génétique 2020, Tours
- **C.Bar**, G. Barcia, M.Jennesson, et al. Extension du spectre mutationnel et phénotypique de l'encéphalopathie développementale et épileptique par mutation du gène KCNB1. Journées Françaises de l'Epilepsie 2020, Paris

### Bourses

- Bourse 2019 de la Ligue Française Contre l'Epilepsie
- Bourse 2019 MD-PhD de l'Institut Imagine





# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	12
1. De l'épilepsie aux épilepsies .....	14
1.1. Rappel historique.....	14
1.2. Classification des épilepsies.....	16
1.2.1. Type de crise .....	17
1.2.2. Type de l'épilepsie .....	18
1.2.3. Syndrome épileptique.....	19
1.2.4. Comorbidités .....	19
1.2.5. L'étiologie .....	19
1.2.6. Le concept d'encéphalopathie développementale et épileptique .....	20
1.3. L'apport de la génétique.....	22
1.3.1. Impact sur le diagnostic.....	22
1.3.2. Hétérogénéité phénotypique.....	23
1.3.1. Hétérogénéité génotypique.....	24
1.3.2. Impact sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques : Les canalopathies .....	24
2. Physiologie de KCNB1 (K <sub>v</sub> 2.1) .....	27
2.1. Structure de K <sub>v</sub> 2.1 .....	27
2.2. Expression du canal K <sub>v</sub> 2.1 .....	28
2.3. Fonctions de K <sub>v</sub> 2.1 .....	29
2.3.1. Un médiateur clé de l'excitabilité neuronale.....	29
2.3.2. Rôle dans l'apoptose neuronale.....	31
2.3.3. Rôle dans l'homéostasie calcique et le trafic membranaire .....	32
3. L'encéphalopathie <i>KCNB1</i> .....	33
3.1. Données génétiques.....	33
3.2. Données cliniques .....	34
3.3. Données paracliniques.....	35
3.4. Etudes fonctionnelles .....	35
3.5. Modèles animaux de l'encéphalopathie <i>KCNB1</i> .....	37
4. Le modèle poisson-zèbre.....	40

4.1. Principales caractéristiques du modèle poisson-zèbre .....	40
4.2. Principales étapes du développement embryonnaire du poisson-zèbre .....	41
4.3. Le poisson-zèbre comme modèle d'étude des troubles du neurodéveloppement .....	44
4.4. Les modèles poissons-zèbres mutants <i>kcnbl</i> .....	47
5. Objectifs de la thèse .....	51
<b>RESULTATS .....</b>	<b>53</b>
1. Description du spectre génotypique de l'encéphalopathie <i>KCNB1</i> .....	55
1.1. Avant-propos .....	55
1.2. Article correspondant .....	55
2. Spectre développemental et épileptique de l'encéphalopathie <i>KCNB1</i> et devenir à long terme .....	68
2.1. Avant-propos .....	68
2.2. Article correspondant .....	68
3. Comportement adaptatif et comorbidités psychiatriques dans l'encéphalopathie <i>KCNB1</i>	84
3.1. Avant-propos .....	84
3.2. Article correspondant .....	84
4. Etude du phénotype comportemental associé à la perte de fonction de <i>kcnbl</i> chez le poisson-zèbre .....	97
4.1. Avant-propos .....	97
4.2. Article correspondant (résultats préliminaires) .....	97
<b>DISCUSSION GENERALE et PERSPECTIVES.....</b>	<b>119</b>
1. Points forts et limites des différents travaux de la thèse .....	121
1.1. Point de vue génétique .....	121
1.2. Point de vue phénotypique .....	122
1.3. Point de vue translationnel .....	123
2. Perspectives .....	126
2.1. Point de vue clinique et génétique .....	126
2.2. Point de vue translationnel .....	127
3. Conclusion.....	128
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>130</b>
Abréviations .....	149
Table des figures .....	152
Résumé .....	153



# **INTRODUCTION**

---



# 1. De l'épilepsie aux épilepsies

---

## 1.1. Rappel historique

Du latin *epilepsia*, qui dérive du grec « ἐπιλαμβάνειν » (*epilambanein*) signifiant « saisir », « attaquer par surprise », le terme épilepsie apparaît dans la langue française au XV<sup>ème</sup> siècle. Toutefois, les premiers écrits témoignant de la connaissance de l'épilepsie remontent à l'antiquité. C'est sur les tablettes Akkadiennes retrouvées à Babylone, en Mésopotamie, qu'apparaissent les premières descriptions de crises d'épilepsie (-2000 ans av. J.C.). Dès cette période, des restrictions sont imposées aux personnes épileptiques et rentrent dans le cadre législatif. Le code Hammourabi (-1780 av. J.C.) interdit le mariage des patients ayant une épilepsie, ne garantit pas la valeur du témoignage d'un individu avec une épilepsie devant un tribunal et permet l'annulation de contrats d'achats d'esclaves en cas de crise épileptique dans les 3 mois après l'achat. On retrouvera ensuite des références à l'épilepsie dans des papyrus de l'Égypte Antique (-1700 av. J.C.), dans la littérature indienne ayurvédique ainsi que dans des textes de la Chine Antique (-600 av. J.C.) (Magiorkinis et al., 2010).

Au V<sup>ème</sup> siècle avant J.C, alors que l'épilepsie est jusque-là considérée comme un phénomène mystique, résultat d'une intervention divine ou d'une malédiction, Hippocrate va faire rentrer l'épilepsie dans le domaine scientifique. Dans son ouvrage « *De la maladie Sacrée* », il dénonce le charlatanisme, attribue l'épilepsie à un dysfonctionnement cérébral et propose une physiopathologie humorale issue de sa théorie des 4 humeurs.

*« La maladie paraît n'être guère plus divine que d'autres ; mais elle a sa nature comme les autres, sa cause n'est divine que comme les autres maladies, et son traitement de même... sa cause est héréditaire, comme d'autres maladies. »*

Hippocrate, *De la maladie sacrée*, V<sup>ème</sup> siècle av. J.C.

Après lui, d'autres grands noms de la période Antique ont traité de l'épilepsie dans leurs ouvrages. Aristote (384–322 av. J.C.), philosophe grec, notait que les petits enfants étaient sujets à des convulsions. Galien (131–201 ap. J.C.), médecin grec, distinguait l'épilepsie intracrânienne (idiopathique) et extracrânienne (secondaire à une autre cause)

(Panteliadis et al., 2017). Arétée de Cappadoce (I<sup>er</sup> siècle ap. J.C.), médecin grec puis Celse (2<sup>ème</sup> siècle ap. J.C.) et Caelius Aurélianus (V<sup>ème</sup> siècle ap. J.C.), médecins romains, ont chacun constaté que certaines épilepsies de l'enfance disparaissent à l'adolescence (Gaillard-Seux, 2017).

*Origine du terme « comitial » :*

Ce terme est issu du latin « morbus comitialis », signifiant le « mal des comices » et souligne la connotation funeste de l'épilepsie durant l'époque romaine : si un citoyen romain participant aux comices (élection des magistrats de la ville) présentait une crise, on préférait dissoudre la réunion car c'était un signe de mauvais augure.

Pourtant, l'arrivée du christianisme va marquer le début d'une longue période d'obscurantisme où prévaut l'origine divine ou diabolique de l'épilepsie et la notion de contagiosité avec mise à l'écart des malades. Si la crainte des individus épileptiques va perdurer longtemps, la publication du « *traité de l'épilepsie* » en 1770 par Samuel Auguste Tissot (1728- 1797), célèbre épileptologue Suisse, va jeter les bases de l'épileptologie moderne. Il introduit la notion de syndrome épileptique avec la description de l'épilepsie « petit mal » de l'enfant (épilepsie absence), le « grand mal » et un ensemble de symptômes caractéristique des crises focales. Il affirme que l'épilepsie peut toucher tout le monde et qu'elle résulte de deux conditions : un cerveau prédisposé et un évènement déclencheur.

Le XIX<sup>ème</sup> siècle marque l'apparition de la neurologie comme discipline médicale distincte de la psychiatrie et l'essor de l'épileptologie moderne. Grâce à la découverte des phénomènes électriques et aux travaux du physicien Faraday (1791- 1867), le neurochirurgien Robert Bentley Todd (1809-1860) développe la théorie d'une polarité nerveuse et tente d'expliquer la décharge épileptogène par une modification du champ électrique. Entre 1866 et 1899, le neurologue londonien Hughlings Jackson (1835-1911) publie de nombreux travaux sur l'épilepsie, qu'il décrit comme « des décharges occasionnelles, soudaines, rapides et locales de matière grise ». La fin du XIX<sup>ème</sup> siècle et le début du XX<sup>ème</sup> siècle voient apparaître les premiers enregistrements électroencéphalographiques avec l'utilisation de galvanomètres. Il faudra attendre 1924 et les travaux de Hans Berger (1881-1941), psychiatre allemand, pour que l'EEG soit appliqué à l'humain. Cette technique ouvre alors la voie à de nombreux travaux visant à caractériser les différents types de crise d'épilepsie, comme ceux de Frederic Andrews Gibbs (1903–1992) et William Lennox (Gibbs et al., 1936).



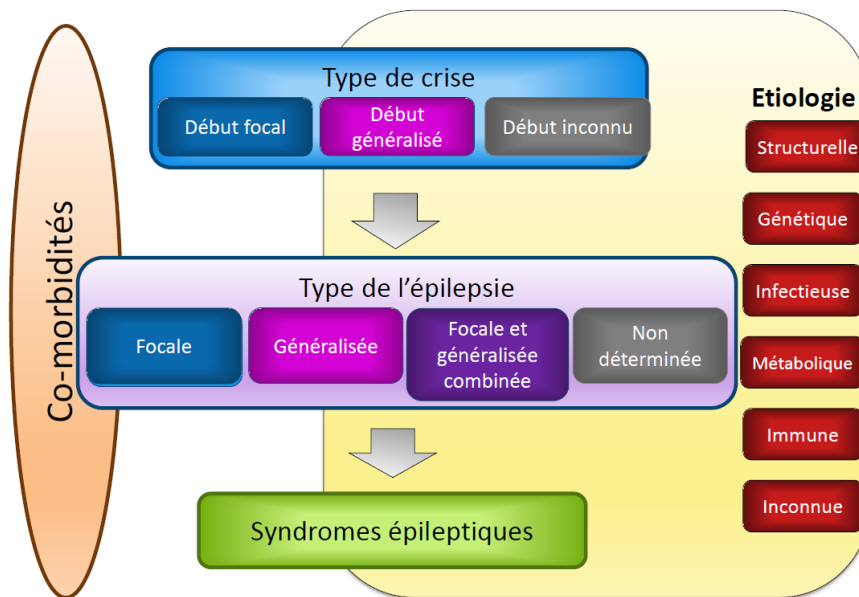
En 1970, Henri Gastaut publie, sous l'égide de la ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE) créée en 1909, la première classification des crises d'épilepsie (Gastaut, 1970). Celle-ci sera révisée en 1985 puis en 1989 avec l'ajout de la classification des syndromes épileptiques (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1985; « Proposal for Revised Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy », 1989).

## **1.2. Classification des épilepsies**

Le terme « épilepsie » regroupe de nombreuses entités différentes se distinguant notamment par leur âge d'apparition, leur expression clinique ou leur étiologie sous-jacente. On préfère donc utiliser ce mot au pluriel, « les épilepsies », pour souligner cette hétérogénéité de syndromes au pronostic variable et aux thérapeutiques différentes.

En 2017, la Ligue Internationale contre l'Épilepsie (International League against epilepsy, ILAE) a mis à jour la classification des épilepsies pour refléter notre compréhension des mécanismes sous-jacents à la suite des progrès scientifiques majeurs qui ont eu lieu depuis la dernière classification ratifiée en 1989 (Scheffer et al., 2017). Il s'agit d'un outil clinique clé dans la démarche diagnostique, pronostique et thérapeutique du médecin prenant en charge un patient avec une épilepsie. Au-delà de l'aspect clinique, elle fournit également un cadre pour la recherche clinique et fondamentale, le développement des thérapies antiépileptiques et facilite la communication entre les professionnels partout dans le monde.

Cette classification repose sur 3 niveaux d'analyse : type de crise, type de l'épilepsie et syndromes épileptiques. Il s'y ajoute en parallèle la recherche d'une étiologie sous-jacente et de comorbidités (Figure 1).



**Figure 1. Cadre nosologique pour la classification des épilepsies proposé par la Ligue Internationale contre l'épilepsie (ILAE) ; modifié à partir de Scheffer et al. 2017**

### 1.2.1. Type de crise

La crise d'épilepsie est définie comme « l'apparition transitoire de signes et/ou de symptômes résultant d'une activité neuronale anormalement excessive ou synchrone dans le cerveau » (Fisher et al., 2005). La classification du type de crise a été révisée dans une nouvelle nomenclature publiée en 2017 (Figure 2). Les crises y sont classées selon leur point de départ : crise focale, crise généralisée et crise de point de départ inconnu (Fisher et al., 2017). Elles sont ensuite décrites selon les manifestations cliniques observées et, si possible, documentées par des vidéos, un enregistrement électroencéphalographique (EEG), des examens d'imagerie. En l'absence d'élément supplémentaire, la détermination du type de crise peut représenter le niveau maximal de la classification (Fisher et al., 2017; Scheffer et al., 2017).

## ILAE 2017 Classification of Seizure Types Expanded Version <sup>1</sup>

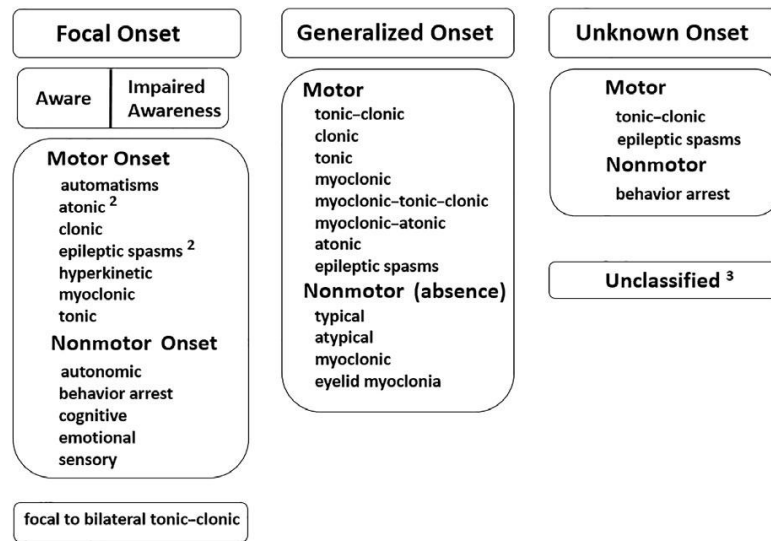


Figure 2. Classification ILAE 2017 des différents types de crise d'épilepsie ; Fisher et al. 2017

### 1.2.2. Type de l'épilepsie

Ce 2<sup>ème</sup> niveau d'analyse suppose qu'un diagnostic d'épilepsie ait été posé. La définition de l'épilepsie a été révisée en 2014 par l'ILAE et répond à l'un des critères suivants :

1. Au moins deux crises non provoquées (ou réflexes) espacées de plus de 24 heures ;
2. Une crise non provoquée (ou réflexe) associée à une probabilité de récurrence au cours des 10 années suivantes similaire au risque de récurrence après deux crises non provoquées (au moins 60%) ;
3. Diagnostic d'un syndrome épileptique (Fisher et al., 2014).

Le diagnostic du type de l'épilepsie repose sur l'identification du/des type(s) de crise présenté par le patient, complété par les données de l'EEG. Il permet de différencier les Epilepsies Généralisées, associant crises généralisées et anomalies généralisées sur l'EEG, des Epilepsies Focales avec crises focales et décharges épileptiformes ou foyer focal sur l'EEG. Certains patients peuvent présenter à la fois des crises généralisées et des crises focales et rentrent alors dans le groupe des Epilepsies Généralisées et Focales Combinées, comme les patients avec un syndrome de Dravet par exemple.

### **1.2.3. Syndrome épileptique**

Un syndrome épileptique est défini par le regroupement spécifique de caractéristiques cliniques et EEG, souvent sous-tendu par des résultats étiologiques spécifiques. Les syndromes épileptiques ont souvent des présentations dépendantes de l'âge et des comorbidités spécifiques (Wirrell et al., 2021). L'identification d'un syndrome épileptique permet d'orienter la démarche étiologique, d'aider au choix des thérapeutiques et guide l'information pronostique. Cela permet également de constituer des groupes homogènes de patients, indispensable pour la réalisation d'essais thérapeutiques.

Comme nous le verrons plus loin, il est important de noter qu'un syndrome épileptique n'a pas de corrélation parfaite avec un diagnostic étiologique. Un même syndrome épileptique peut avoir différentes origines, génétique et structurelle par exemple, de même qu'une même mutation génétique peut être à l'origine de différents syndromes épileptiques. C'est le cas de l'encéphalopathie *KCNBI*, sujet de cette thèse.

### **1.2.4. Comorbidités**

En parallèle de cette démarche diagnostique à 3 niveaux, cette nouvelle classification ajoute deux axes importants, ceux de l'étiologie et des comorbidités (Figure 1) (Scheffer et al., 2017). Survenant sur un cerveau en développement, de nombreuses épilepsies de l'enfant s'accompagnent de comorbidités cognitives, comportementales et/ou psychiatriques. Des comorbidités extra-cérébrales en lien avec l'étiologie sous-jacente peuvent complexifier encore la prise en charge : déformations orthopédiques, troubles de la marche, troubles gastro-intestinaux, troubles cardiaques. Compte tenu de l'impact majeur de ces comorbidités sur la qualité de vie des patients, il est recommandé de les rechercher à chaque étape de la classification afin de les identifier et de les prendre en charge précocement (Keezer et al., 2016; Scheffer et al., 2017).

### **1.2.5. L'étiologie**

L'apparition d'un axe étiologique a été rendu possible avec les progrès cliniques et scientifiques des dernières années, notamment dans les domaines de l'imagerie cérébrale et de la génétique. A chaque étape de cette démarche diagnostique, et dès l'apparition de la première crise, la question de l'étiologie doit être posée (Scheffer et al., 2017). On distingue ainsi 6 catégories : structurelle, génétique, infectieuse, métabolique, immunitaire et inconnue.

Il est important de noter qu'une épilepsie peut avoir plusieurs étiologies, comme dans la Sclérose Tubéreuse de Bourneville (structurale, en lien avec la présence de tubers et génétique, en lien avec la mutation du gène *TSC1* ou *TSC2*).

*Exemple de démarche diagnostique selon la dernière classification des épilepsies de l'ILAE :*

- Age de début : 1<sup>ère</sup> année de vie
- Type de crises : Crises à point de départ focal, hémicloniques ou crises à point de départ généralisé tonico-clonique, souvent prolongées. D'autres types de crises apparaissent entre 1 et 4 ans : crises à point de départ généralisé de type myocloniques, absences atypiques et crises à point de départ focal.
- Facteurs favorisants : Fièvre, vaccination, stimulation lumineuse.
- EEG : normaux au début, puis association d'anomalies généralisées et multifocales avec photosensibilité fréquente.
- Type d'épilepsie : Epilepsie Généralisée et Focale Combinée.
- Imagerie cérébrale : normale.
- Comorbidités : trouble du neurodéveloppement apparaissant dans la 2<sup>ème</sup> année de vie, associant à des degrés variables une déficience intellectuelle, un trouble attentionnel, un trouble du spectre autistique, un trouble de la motricité fine et globale avec ataxie fréquente.
- Syndrome épileptique : Syndrome de Dravet.
- Etiologie : Génétique, mutation dans le gène *SCN1A* retrouvée dans 85% des cas.

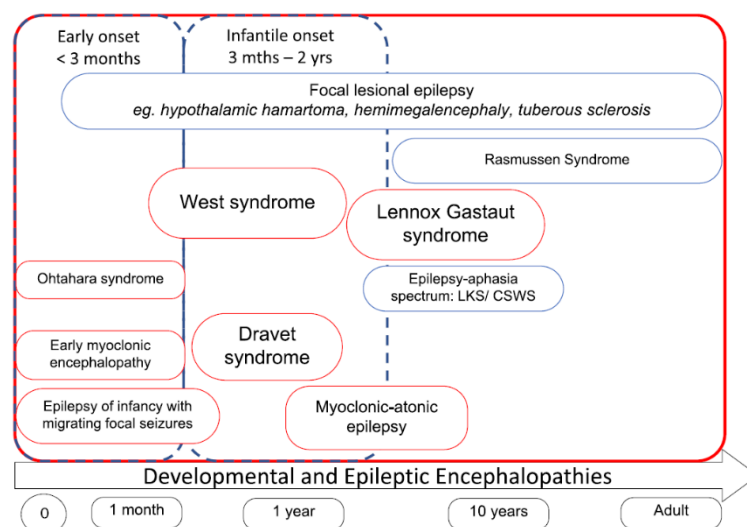
Le syndrome de Dravet fait partie du groupe des encéphalopathies développementales et épileptiques. Dans les formes typiques, son identification est possible dès la première année de vie et permet d'orienter l'analyse génétique, de délivrer une information pronostique aux parents, de dépister précocement les comorbidités neuropsychologiques associées, d'adapter la prise en charge thérapeutique et de participer à des essais thérapeutiques portant sur ce syndrome.

### **1.2.6. Le concept d'encéphalopathie développementale et épileptique**

Le concept « d'encéphalopathie développementale et épileptique » (EDE) apparaît dans la dernière classification de l'ILAE de 2017. Il vient élargir la notion « d'encéphalopathie épileptique » et témoigne des avancées majeures de cette dernière décennie dans le domaine de la génétique des épilepsies (I. Helbig & Abou Tayoun, 2016; Scheffer et al., 2017).

Le terme « d'encéphalopathie épileptique » (EE) avait été introduit par l'ILAE en 2010 pour regrouper des syndromes épileptiques sévères de l'enfance dans lesquels l'activité épileptique elle-même (crises et/ou anomalies EEG) interfère avec le développement en cours, contribuant au retentissement cognitif et comportemental au-delà de ce que l'on pourrait

attendre de la pathologie sous-jacente seule (Berg et al., 2010). C'est le cas du syndrome de West associant la triade spasmes en flexion, tracé EEG hypersarythmique et régression développementale mais aussi de l'encéphalopathie épileptique avec pointes-ondes continues du sommeil et du syndrome de Landau-Kleffner. Cependant, le trouble du neurodéveloppement peut être présent avant l'apparition de l'activité épileptique, et persister malgré l'évolution spontanément favorable ou le contrôle pharmacologique des crises. C'est le cas des encéphalopathies néonatales avec tracé électroencéphalographique de type suppression-burst, de l'épilepsie avec crises focales migrantes du nourrisson, du syndrome de Dravet ou du syndrome de Lennox-Gastaut (Figure 3). De cette constatation est né le concept « d'encéphalopathie développementale et épileptique », suggérant la présence d'un composant développemental résultant directement de l'effet de la mutation, en plus de l'effet potentiel de l'activité épileptique sur le développement (Scheffer et al., 2017). Par continuité, le terme « d'encéphalopathie développementale » désigne des situations dans lesquelles l'épilepsie, si elle est présente, ne s'accompagne pas de stagnation ou régression dans les acquisitions (Scheffer et al., 2017). Certains patients avec un trouble du neurodéveloppement et une épilepsie à début précoce, pharmaco-résistante, ne répondent pas aux critères d'un syndrome épileptique bien précis. Ils sont alors regroupés sous le syndrome « d'encéphalopathie développementale et épileptique (EDE) non classifiable » et lorsqu'une mutation génétique est identifiée, ils peuvent être dénommés par le nom du gène associé au mot encéphalopathie, comme c'est le cas pour l'encéphalopathie *KCNB1*.

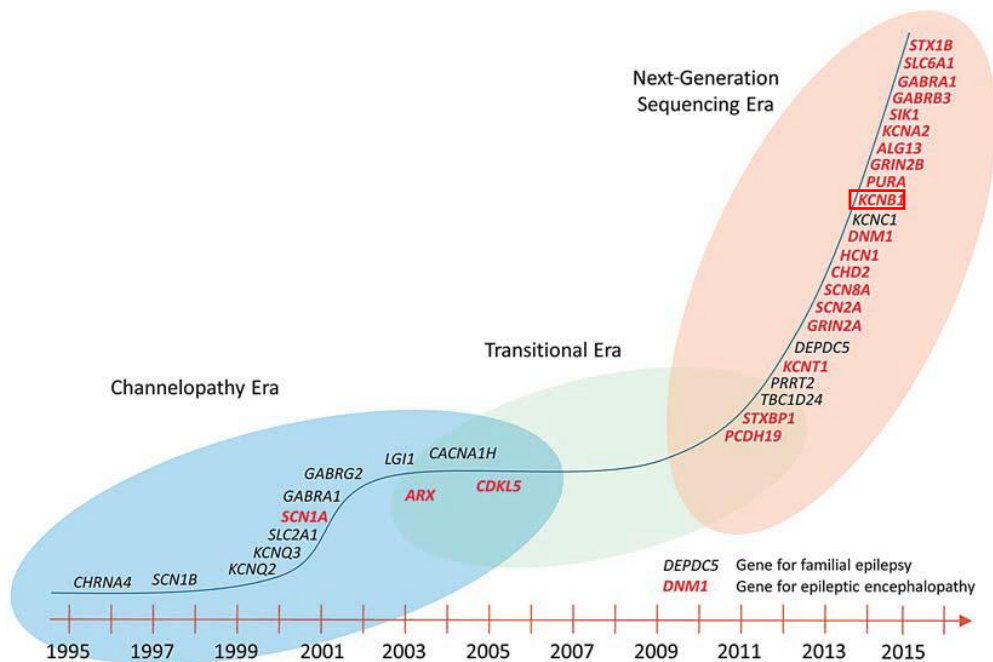


**Figure 3. Syndromes appartenant au groupe des encéphalopathies développementales, classés en fonction de leur âge d'apparition (axe X) ; Scheffer et al. 2020**

### 1.3. L'apport de la génétique

Avec l'arrivée des techniques de séquençage à haut débit, la dernière décennie a été marquée par l'identification exponentielle de causes génétiques dans le groupe des EDE (Figure 3) (Helbig & Abou Tayoun, 2016; McTague et al., 2016). Cela a permis le développement de panels de gènes d'épilepsies, permettant l'analyse simultanée d'un ensemble de gènes responsable d'épilepsies, accélérant ainsi la possibilité d'un diagnostic étiologique.

La reconnaissance de la cause génétique a un impact important pour les familles, sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents, la réalisation d'essais thérapeutiques et le développement de thérapies ciblées.



**Figure 4. Historique de la découverte des gènes impliqués dans les épilepsies.** *KCNB1* a été rapporté en 2014 (rectangle rouge) ; modifié à partir de Helbig et Abou Tayoun, 2016

#### 1.3.1. Impact sur le diagnostic

Nous avons vu dans le chapitre précédent la démarche diagnostique permettant d'aboutir au diagnostic d'encéphalopathie développementale et épileptique, après reconnaissance du type de crise, de l'épilepsie, de syndrome épileptique et des comorbidités associées. La recherche de l'étiologie se fait à chaque étape, débutant généralement par un bilan métabolique de routine et la réalisation d'une IRM cérébrale. Après élimination d'une

cause structurelle (ex : Sclérose Tubéreuse de Bourneville, malformation corticale) ou acquise (ex : encéphalopathie anoxo-ischémique), la réalisation d'un panel de gènes d'épilepsies permet un diagnostic génétique dans environ 15-25% des cas, avec le rendement diagnostique le plus élevé dans le groupe des EDE à début précoce (Jang et al., 2019; Møller et al., 2016; Rim et al., 2018; Stefanski et al., 2021). L'utilisation du séquençage de l'exome en trio (enfant et ses 2 parents) permet d'atteindre un rendement de 30 à 60% (Costain et al., 2019; Demos et al., 2019; Rochtus et al., 2020; Stödberg et al., 2020). Ces techniques ont permis un gain de temps important dans le délai diagnostique et sont maintenant indiquées comme examens génétiques de première ligne, remplaçant l'étude d'un gène candidat spécifique, sauf dans les cas de forte suspicion clinique ou la corrélation phénotype-génotype est bonne (Syndrome de Dravet par exemple). Ce diagnostic génétique permet de donner un nom à la pathologie de l'enfant, diminuant ainsi l'errance diagnostique des familles et mettant un terme aux examens répétés et coûteux. Il peut guider la prise en charge thérapeutique, permettre l'accès aux essais thérapeutiques en cours et l'orientation des familles vers des associations de patients nationales ou internationales. Il permet également la délivrance d'un conseil génétique pour les familles.

Cependant, l'utilisation en routine de ces techniques de séquençages à haut débit s'accompagne de nouveaux défis dans l'interprétation des résultats et l'information délivrée aux familles. L'application de ces nouvelles technologies aboutit à l'identification fréquente de variants de signification inconnu dont l'implication dans le phénotype du patient est parfois difficile à déterminer et qui repose notamment sur les données de la littérature.

### **1.3.2. Hétérogénéité phénotypique**

L'hétérogénéité phénotypique, ou pléiotropie, est une caractéristique partagée par la plupart des gènes d'EDE. Ainsi, un même gène peut être responsable de différents tableaux cliniques, incluant des syndromes épileptiques de nature et de sévérité variable. C'est le cas de certains gènes codant pour des canaux ioniques, comme *KCNQ2* impliqué dans l'épilepsie néonatale familiale bénigne mais aussi dans une forme d'EDE sévère à début précoce (Singh et al., 1998; Weckhuysen et al., 2012). De même, des variants pathogènes dans *KCNT1* sont retrouvés dans environ la moitié des cas d'épilepsie avec crises focales migrantes du nourrisson, une EDE précoce et sévère, mais ont également été identifiés dans l'épilepsie frontale nocturne autosomique dominante ou dans des syndromes de West (Barcia et al., 2012; Heron et al., 2012). De nombreux facteurs peuvent contribuer à cette hétérogénéité



phénotypique, incluant le type de mutation, sa localisation sur le gène et l'effet fonctionnel qui en découle, la présence d'un mosaïcisme, de facteurs épigénétiques ou de gènes modificateurs. La description du spectre phénotypique associé aux mutations d'un gène spécifique est donc essentielle puisque la découverte d'un variant dans un gène précis peut ne pas, à elle seule, permettre la délivrance d'une information pronostique à la famille.

### **1.3.1. Hétérogénéité génotypique**

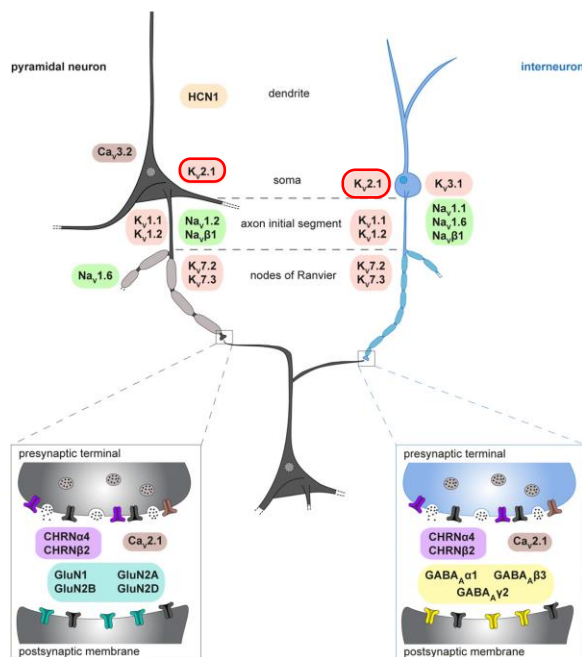
Les syndromes épileptiques sont tous associés à une hétérogénéité génétique, plus ou moins importante selon les syndromes. Le syndrome de Dravet fait ainsi exception dans le groupe des EDE puisque des mutations du gène *SCN1A* sont retrouvés dans environ 80% des cas. A l'inverse, le syndrome de West est associé à des mutations dans différents gènes dont le plus fréquent, *CDKL5*, est retrouvé dans moins de 10% des cas (Ko et al., 2018; McTague et al., 2016). C'est également le cas de l'épilepsie avec crises myoclonono-atoniques ou du syndrome de Lennox-Gastaut (McTague et al., 2016). L'hétérogénéité génétique s'enrichit régulièrement avec l'utilisation extensive des techniques de séquençages à haut débit dans de larges cohortes de patients avec EDE (de Kovel et al., 2016; K. L. Helbig et al., 2016; Rim et al., 2018). Là encore, l'enjeu réside dans le phénotypage minutieux de population de patients porteurs de mutation dans un même gène afin d'essayer d'en dégager des particularités phénotypiques qui aideront à l'interprétation de la pathogénicité des variants.

### **1.3.2. Impact sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques : Les canalopathies**

L'essor de la génétique a mis en lumière l'importance des canaux ioniques dans la pathogénèse des épilepsies, de même que dans de nombreuses autres maladies (Imbrici et al., 2016; Wang et al., 2017). Les canaux ioniques sont des protéines membranaires qui modulent le passage d'ions à travers la membrane cellulaire. Ils jouent un rôle central dans le fonctionnement des cellules excitables telles que les neurones, les cellules musculaires et cardiaques. Le gène *SCN1A*, rapporté en 2001 dans une série de 7 patients avec un syndrome de Dravet, est le premier d'une longue série de gènes codant pour des canaux ioniques identifiés dans des EDE (Claes et al., 2001; McTague et al., 2016). La proportion des épilepsies liées à des mutations dans des canaux ioniques est estimée aujourd'hui à environ 25 %, correspondant au groupe des « canalopathies épileptiques » (Oyrer et al., 2018).

Il existe différentes familles de canaux ioniques, incluant les canaux ioniques voltage dépendant (sodiques, potassiques, calciques, chlores), les canaux potassiques dépendant de la concentration intra-cellulaire (en calcium ou en sodium) et les canaux inotropes (nicotinique, GABA.). Ces canaux ioniques jouent un rôle essentiel dans la génération et la modulation de l'excitabilité et l'inhibition neuronale (Figure 5) (Wei et al., 2017).

Le gène *KCNB1*, responsable de l'encéphalopathie *KCNB1*, code pour la sous-unité alpha d'un canal potassique voltage dépendant ( $K_v2.1$ ). Nous détaillons la physiologie de ce canal dans le chapitre suivant.

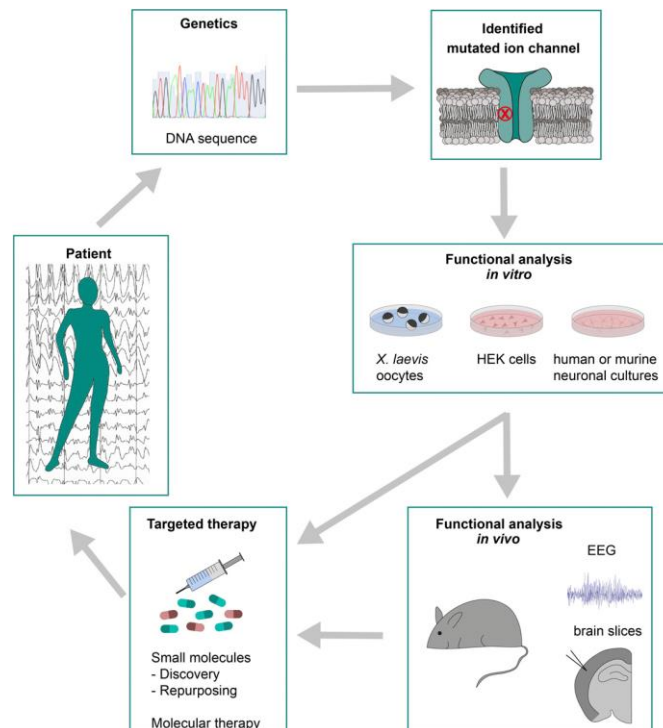


**Figure 5. Représentation schématique de l'expression neuronale des différents canaux ioniques impliqués dans les épilepsies génétiques.**

Le canal  $K_v2.1$  (cercle rouge), codé par le gène *KCNB1*, présent dans la partie proximale des neurones pyramidaux et des interneurons ; *modifié à partir de Oyrer et al. 2018*

L'identification des mécanismes physiopathologiques en cause est une étape indispensable pour améliorer la compréhension de ces maladies et permettre le développement de thérapeutiques innovantes et ciblées. Ceci est rendu possible grâce à la génération de modèles innovants comme l'induction de cellules souches pluripotentes ou le développement de modèle animal génétiquement modifié, piliers de la recherche translationnelle (Figure 6). Les études fonctionnelles réalisées *in vitro* sont les techniques de choix pour étudier les conséquences de la mutation d'un gène sur le fonctionnement du canal. On parle d'effet « gain-de-fonction » lorsque l'activité du canal muté est augmentée et d'effet « perte-de-fonction » si son activité est diminuée. Si peu de ces canalopathies bénéficient actuellement d'un traitement ciblé, la connaissance des mécanismes physiopathologiques guident déjà le choix des anti-épileptiques dans une canalopathie donnée, par la connaissance

de leurs modes d'action et de l'effet fonctionnel attendu sur le canal muté (Nabbout & Kuchenbuch, 2020).



**Figure 6. Recherche translationnelle dans les canalopathies épileptiques ; Oyrer et al. 2018**

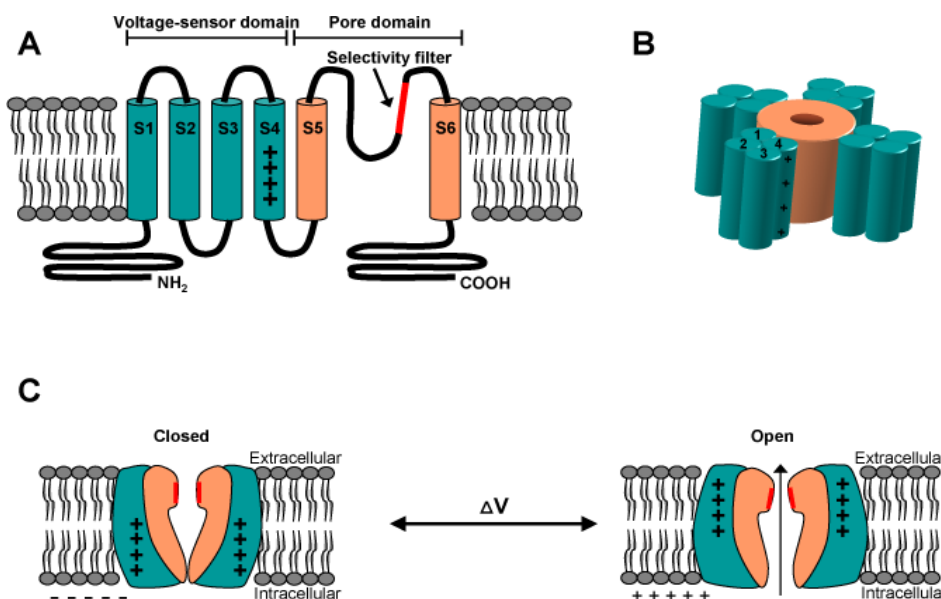
## 2. Physiologie de KCNB1 (K<sub>v</sub>2.1)

---

La famille des canaux potassiques est la plus large et la plus diverse des familles de canaux ioniques. Elle intègre la « super famille » des canaux potassiques dépendant du voltage (K<sub>v</sub>), comprenant 12 « sous-familles » (K<sub>v</sub>1-12) codées par une quarantaine de gènes (Gutman et al., 2005). Le gène *KCNB1* (NM004975) code pour une sous-unité alpha d'un canal potassique voltage dépendant de la sous famille 2 (K<sub>v</sub>2.1). Dans ce chapitre, nous allons présenter le rôle physiologique des canaux K<sub>v</sub>2.1 au niveau cérébral, avant de détailler dans les chapitres suivants les connaissances actuelles sur l'encéphalopathie *KCNB1* et les mécanismes physiopathologiques de dysfonction du canal.

### 2.1. Structure de K<sub>v</sub>2.1

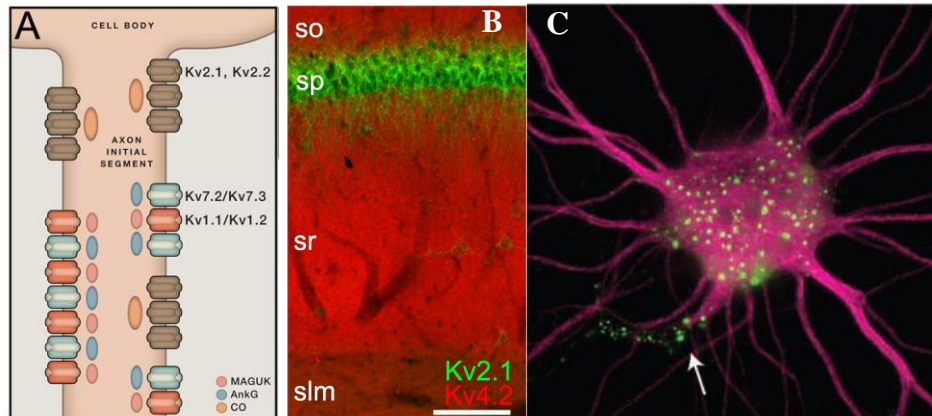
Les canaux potassiques voltage-dépendants sont des protéines transmembranaires dont les séquences d'acides aminés sont très conservées à travers les espèces. Ils partagent une structure commune constituée de 4 sous-unités alpha formant le pore du canal. Chaque sous-unité alpha est constituée de 6 domaines transmembranaires (S1 à S6). Les domaines S1 à S4 forment le capteur de tension et les domaines S5 et S6 forment le pore de la protéine. Le domaine S4 du capteur de tension possède une série d'acides aminés chargés positivement qui détectent un changement de potentiel de membrane conduisant à une modification structurelle du canal et à l'ouverture ou à la fermeture du canal, d'où l'utilisation du terme « voltage-dépendant » (Figure 7). Le filtre de sélectivité du canal, formé du motif d'acides aminés TVGYG, est localisé dans une boucle entre S5 et S6. La région cytoplasmique N-terminale contient un domaine T1 de tétramérisation modulant l'assemblage des sous-unités alpha entre elles. Il permet la formation d'homotétramères (4 sous-unités alpha identiques K<sub>v</sub>2.1) ou d'hétérotétramères grâce à la combinaison avec des sous-unités alpha provenant d'autres familles de canaux potassiques voltage-dépendant et dont le rôle fonctionnel sera différent (Bocksteins et al., 2014; Choe, 2002; Trimmer, 2015). Le domaine C-terminal interagit avec le domaine N-terminal pour réguler le trafic intracellulaire, l'expression et la localisation du canal. Il contient des sites d'interaction avec diverses protéines cytoplasmiques, notamment de nombreux sites de phosphorylation permettant de moduler l'activité du canal (Choe, 2002; Ju et al., 2003; Mohapatra et al., 2008).



**Figure 7. Structure d'un canal potassique voltage-dépendant.** (A) Chaque sous-unité alpha est composée de six hélices transmembranaires S1-S6 et de terminaisons N et C intracellulaires. S1-S4 forme le domaine du capteur de tension (vert) avec S4 chargé positivement, et S5-S6 forme le domaine du pore du canal (orange), contenant le filtre de sélectivité (rouge). (B) Quatre sous-unités alpha se tétramérisent pour former le canal ionique. Les terminaisons intracellulaires N et C sont retirées pour plus de clarté. (C) A gauche : état de repos du canal dit fermé. Les charges positives de S4 sont repoussées par les charges positives de la face externe de la membrane cellulaire. En bas : Un changement de polarité membranaire déplace les charges S4 vers l'extérieur, menant à l'ouverture du canal ionique ; *Börjesson et al. 2008*

## 2.2. Expression du canal K<sub>v</sub>2.1

Les sous-unités K<sub>v</sub>2.1 sont abondamment exprimées dans le système nerveux des mammifères, particulièrement au niveau du cortex cérébral (Du et al., 1998; Trimmer, 1991). Elles sont retrouvées dans les neurones excitateurs et inhibiteurs et se localisent préférentiellement en clusters au niveau du soma, des dendrites proximales et du segment initial des axones (Figure 8) (Antonucci et al., 2001; Du et al., 2000; King et al., 2014; Trimmer, 1991, 2015). Leur expression est retrouvée précocement au cours du développement. Dans des neurones hippocampiques de rat en culture, l'expression de K<sub>v</sub>2.1 à la surface des cellules apparait à 4 jours in vitro (Antonucci et al., 2001). Dans le poisson-zèbre, l'expression de *kcnb1* commence dès 19 heures post fécondation (hpf) (Jedrychowska et al., 2021) et est retrouvée dans les différentes structures cérébrales dès 24 hpf (H. Shen et al., 2016).



**Figure 8. Localisation neuronale des sous-unités  $K_v2.1$ .** (A) Représentation schématique de la localisation en clusters de  $K_v2.1$  au niveau du segment initial des axones. (B) Expression proximale de  $K_v2.1$  au niveau des dendrites apicales des neurones hippocampiques CA1 chez le rat. (C) Expression de  $K_v2.1$  (vert) au niveau du soma, dendrites proximales (rose) et segment initial des axones (flèche) dans des neurones hippocampiques en culture ; *modifié à partir de Trimmer et al. 2015, Misonou. 2010*

$KCNB1$  s'exprime également en dehors du système nerveux et notamment chez l'homme dans la rétine, le pancréas, le système cardiovasculaire, les poumons, les reins, le foie (*Brain tissue expression of KCNB1 - Summary - The Human Protein Atlas, s. d.*).

## 2.3. Fonctions de $K_v2.1$

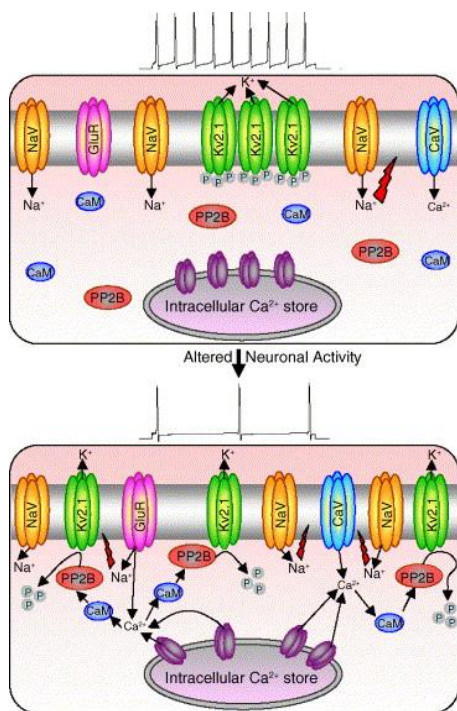
### 2.3.1. Un médiateur clé de l'excitabilité neuronale

Les sous unités  $K_v2.1$  forment des canaux sélectifs au potassium à travers lesquels passent les ions potassium en fonction du gradient électro-chimique de part et d'autre de la membrane plasmatique. Les propriétés biophysiques du canal  $K_v2.1$  dépendent de sa composition en sous-unités alpha.

Dans les neurones pyramidaux corticaux et hippocampiques des mammifères, les homotétramères  $K_v2.1$  conduisent un courant potassique sortant à rectification retardée dépendant du voltage ( $I_K$ ) contribuant à la repolarisation et l'hyperpolarisation membranaire (Murakoshi & Trimmer, 1999). Dans les situations de décharge neuronale à haute fréquence, l'activation rapide et l'inactivation lente du canal permet de freiner la fréquence des potentiels d'action, régulant ainsi l'excitabilité neuronale (Bekkers, 2000; Du et al., 2000; Guan et al., 2007). Les propriétés biophysiques du canal  $K_v2.1$  sont largement modifiées par les mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation post-traductionnels (Mohapatra et al., 2008; Speca et al., 2014). Dans les neurones au repos, les canaux  $K_v2.1$  sont constitutionnellement phosphorylés et localisés préférentiellement en clusters au niveau de la

membrane plasmique des neurones (P. M. Hwang et al., 1993; Park et al., 2006; Trimmer, 1991). L'augmentation de l'activité neuronale par des stimuli excitateurs tels que des crises pharmaco-induites, l'hypoxie ou l'exposition au glutamate conduit à la déphosphorylation des canaux  $K_v2.1$  par des mécanismes dépendant de la calcineurine (Misonou et al., 2004; Misonou, Mohapatra, Menegola, et al., 2005; Misonou et al., 2006; Mohapatra et al., 2009). Cette déphosphorylation s'accompagne d'un décalage de la courbe d'activation voltage-dépendante vers des potentiels hyperpolarisants ( $\approx 30$  mV) et perturbe l'organisation spatiale en cluster des canaux, facilitant ainsi l'ouverture des canaux  $K_v2.1$  et permettant la suppression de l'excitabilité neuronale en cours (Figure 9) (Misonou et al., 2004; Misonou, Mohapatra, Menegola, et al., 2005; Misonou et al., 2006; Misonou, 2010). La diminution de l'activité neuronale s'accompagne d'une hyperphosphorylation de  $K_v2.1$  aboutissant à l'effet inverse (Misonou, Mohapatra, & Trimmer, 2005; Park et al., 2006; Speca et al., 2014). Dans des situations d'agression cellulaire, ces mécanismes de régulation confèrent un rôle neuroprotecteur aux canaux  $K_v2.1$  en diminuant l'hyperexcitabilité des neurones pyramidaux dans les régions hippocampiques et corticales. Leur présence dans tous les types de neurones, excitateurs et inhibiteurs, en fait donc un acteur majeur de la régulation homéostatique de l'excitabilité neuronale, particulièrement dans des périodes de décharges répétées à haute fréquence (Murakoshi & Trimmer, 1999; Du et al., 2000; Misonou, Mohapatra, & Trimmer, 2005; P. W. Liu & Bean, 2014).

Les canaux hétérotétramériques combinent des sous-unité alpha  $K_v2.1$  avec des sous-unités auxiliaires dites silencieuses, c'est-à-dire non fonctionnelles lorsqu'elles sont exprimées seules ( $K_v5$  [KCNF],  $K_v6$  [KCNG],  $K_v8$  [KCNV],  $K_v9$  [KCNS]) (Trimmer, 1998). Les propriétés fonctionnelles de ces canaux hétérotétramériques sont plus complexes et dépendent de leur composition, créant ainsi une multitude de canaux aux propriétés biophysiques et pharmacologiques différentes (Bocksteins et al., 2014; Ottshytsch et al., 2002; Sano et al., 2002).



**Figure 9. Représentation schématique des mécanismes de signalisation intracellulaire régulant la localisation et la fonction de Kv2.1.**

A l'état d'équilibre, les canaux Kv2.1 sont hyperphosphorylés et localisés en clusters au niveau de la membrane plasmique (en haut). L'activation des récepteur NMDA par le glutamate conduit à une augmentation du  $Ca^{2+}$  intra-cellulaire, entraînant l'activation de la calcineurine (PP2B), une protéine phosphate dépendante de la calmoduline (CaM) et du calcium. L'activation de la calcineurine entraîne la déphosphorylation des canaux  $K_v2.1$ , perturbant leur organisation en clusters et modifiant leurs propriétés biophysiques (en bas). L'abaissement du seuil d'activation par le voltage permet l'activation rapide du canal et le freinage des décharges de potentiels d'action, supprimant ainsi l'hyperexcitabilité neuronale ; *modifié à partir de Misonou et al. 2005*

Présents en dehors du système nerveux, les canaux  $K_v2.1$  régulent également la durée des potentiels d'action dans les cardiomyocytes (Xu et al., 1999), le potentiel de membrane et la contraction des cellules musculaires lisses (Amberg & Santana, 2006), le potentiel d'action dépendant du glucose et la libération d'insuline dans les cellules pancréatiques (Li et al., 2013).

### 2.3.2. Rôle dans l'apoptose neuronale

En plus de leur effet neuroprotecteur en contexte d'excitabilité neuronale et d'hypoxie cellulaire, les canaux  $K_v2.1$  semblent également jouer un rôle clé de médiateur spécifique de l'apoptose dans une variété de cellules neuronales telles que les neurones hippocampiques, corticaux et les cellules granulaires cérébelleuses (Jiao et al., 2007; Pal et al., 2003; Q.-J. Shen et al., 2009; Yao et al., 2009). Ce rôle a été notamment étudié dans la maladie d'Alzheimer ou la mort cellulaire apoptotique contribue à la perte neuronale observée (Cotella et al., 2012). La diminution de la concentration intra-cellulaire en potassium en lien avec une augmentation de l'efflux potassique participe à l'initiation de la cascade pro-apoptotique, créant un environnement favorable à la fragmentation de l'ADN et à l'activation de caspases (S. P. Yu et al., 1997). Dans des conditions de stress oxydatif, on observe une accumulation



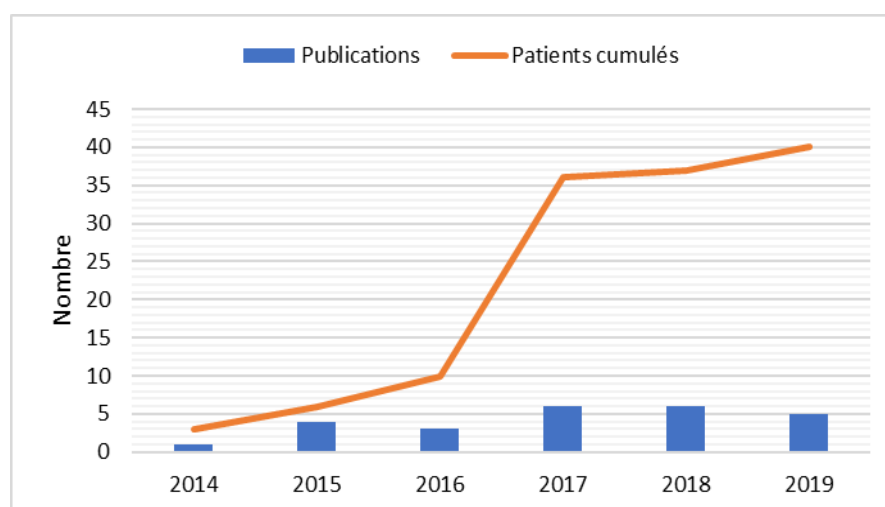
d'oligomères de canaux  $K_v2.1$  dans la membrane et l'augmentation pro-apoptotique du courant potassique sortant médié par les canaux  $K_v2.1$  (Pal et al., 2003; Wu et al., 2013). Les mécanismes exactes reliant l'oxydation des canaux  $K_v2.1$  et la cascade pro-apoptotique ne sont pas encore complètement élucidés mais impliquent notamment la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), la libération intracellulaire de zinc ( $Zn^{2+}$ ), la phosphorylation du canal via l'activation de protéines kinases (CAMKII, Src/JNK, p38) et l'insertion membranaire de nouveaux canaux  $K_v2.1$  dépendant de la protéine SNARE (Jiao et al., 2007; Pal et al., 2003; Shah & Aizenman, 2014; Wu et al., 2013; W. Yu et al., 2017).

### **2.3.3. Rôle dans l'homéostasie calcique et le trafic membranaire**

Des travaux récents ont mis en évidence le rôle structurel des clusters de canaux  $K_v2.1$  dans l'induction de jonctions stables entre le réticulum endoplasmique (RE) et la membrane plasmique (MP) (Antonucci et al., 2001; Fox et al., 2015; Mandikian et al., 2014). Ces jonctions RE-MP jouent un rôle important dans la signalisation et la régulation calcique ( $Ca^{2+}$ ) de même que dans le transfert et le métabolisme des lipides (Gallo et al., 2016). Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, l'état de phosphorylation du canal détermine l'organisation en clusters et régule ainsi la formation de jonctions stables RE-MP (Fox et al., 2015; Lim et al., 2000). Le rôle de ces jonctions RE-MP induites par  $K_v2.1$  au niveau neuronal n'est pas encore élucidé mais la localisation de canaux  $Ca^{2+}$  à leur niveau (Fox et al., 2015; Mandikian et al., 2014) et la présence de sites d'endo- et d'exocytoses à proximité (Deutsch et al., 2012; Johnson et al., 2019) suggèrent la formation d'un complexe macromoléculaire impliqué dans le trafic membranaire et la signalisation  $Ca^{2+}$  au sein du soma et des segments initiaux des axones des neurones .

### 3. L'encéphalopathie *KCNB1*

En 2014, Torkamani et al. rapportent pour la première fois des variants présumés pathogènes de *KCNB1* chez trois patients non apparentés porteur d'encéphalopathies développementales et épileptiques (Torkamani et al., 2014). Entre 2014 et 2019, avant la publication de notre série de patients, 37 patients avaient été rapportés dans 14 publications différentes. Seulement 6 de ces publications détaillaient le phénotype clinique des patients, incluant 4 case reports (Latypova et al., 2017; Miao et al., 2017; Samanta, 2018; Torkamani et al., 2014) et 2 séries de 6 et 26 patients, respectivement (Marini et al., 2017; de Kovel et al., 2017). La série de 26 patients incluait 10 patients déjà rapportés antérieurement et 16 nouveaux patients (de Kovel et al., 2017). Les autres publications étaient des études fonctionnelles ou des résultats de séquençage à haut débit de larges séries de patients (Allen et al., 2016; Calhoun et al., 2017; Fitzgerald et al., 2015; Miao et al., 2018; Parrini et al., 2017; Saitsu et al., 2015; Soden et al., 2014; Srivastava et al., 2014; Thiffault et al., 2015).



**Figure 10. Nombre de publications scientifiques (en bleu) et de patients (en orange) rapportées entre 2014 et 2019.** Revue de la littérature en utilisant les mots clés « *KCNB1* » et « épilepsie » ; *Source : pubmed*

#### 3.1. Données génétiques

Tous les variants rapportés étaient des variants hétérozygotes survenus *de novo*. Ces variants étaient majoritairement des variants faux-sens (80%) localisés entre les domaines S4 à S6 de la protéine (70%) (de Kovel et al., 2017). Des variants tronquants avaient été rapportés chez 8 patients, localisés exclusivement dans des domaines de liaison extra-

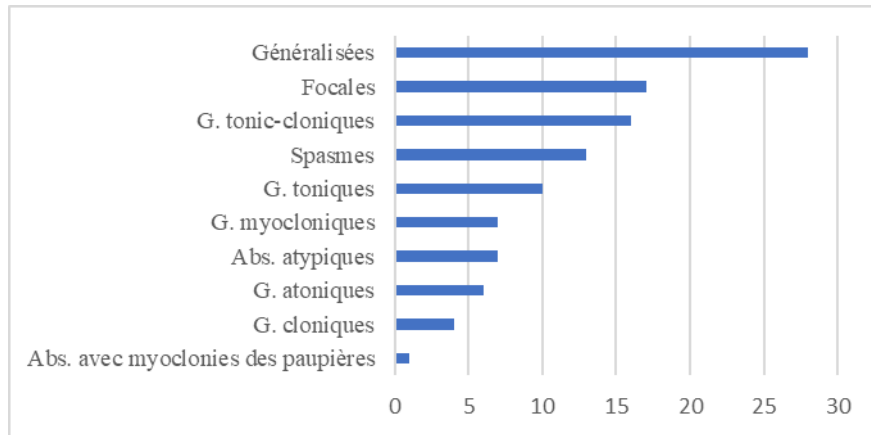
membranaires ou dans le domaine C-terminale. Six variants récurrents avaient été rapportés chez au moins 2 patients (de Kovel et al., 2017; Marini et al., 2017).

De Kovel et al. rapportaient un trouble du neurodéveloppement moins sévère chez 4 sur 6 des patients avec un variant tronquant, suggérant une corrélation entre la sévérité du phénotype et le type de variant (de Kovel et al., 2017).

### **3.2. Données cliniques**

L'âge médian des patients de la littérature étaient de 8 ans (25<sup>ème</sup>- 75<sup>ème</sup> percentile : 3-11, données disponibles pour n=35/37) avec un sex ratio de 1 (n=36/37).

La description clinique était souvent limitée mais faisait état d'un trouble du neurodéveloppement chez tous les patients (données disponibles pour n=34/37), décrit comme sévère pour la majorité d'entre eux (n=20/25 données disponibles). L'épilepsie était fréquente, rapportée chez 34/37 (92%) patients avec un âge médian au début des crises de 13 mois (25<sup>ème</sup>- 75<sup>ème</sup> percentile : 10-18 mois, données disponibles pour n=33/34). Les types de crises rapportés étaient très variables, principalement généralisées ou multifocales. Le phénotype épileptique correspondait à une encéphalopathie développementale et épileptique pour une majorité de patients, incluant des syndromes de spasmes infantiles, de Lennox-Gastaut, de Jeavons ou de pointes-ondes continues du sommeil (de Kovel et al., 2017; Marini et al., 2017). Une pharmacorésistance aux anti-épileptiques était rapportée chez la majorité de ces patients, sans efficacité notable d'un traitement en particulier. Peu de données étaient disponibles sur le devenir à long-terme des patients. Après une phase d'épilepsie active et pharmaco-résistante, une diminution de la fréquence des crises au cours du temps avait été rapporté chez certains patients (Marini et al., 2017).



**Figure 11. Fréquence des différents types de crises rapportées chez les patients avec une encéphalopathie *KCNB1* dans la littérature.**  
Abs : Absences, G : généralisées.

### 3.3. Données paracliniques

Aucun pattern EEG spécifique n'avait été rapporté dans la littérature. Les anomalies électroencéphalographiques étaient variables, souvent sévères, généralisées ou multifocales, avec une activation dans le sommeil rapportée chez 9 patients (données disponible n=31/37).

L'imagerie cérébrale était normale chez 25 patients (données disponible n=31/37) et montrait des anomalies non spécifiques dans les autres cas.

### 3.4. Etudes fonctionnelles

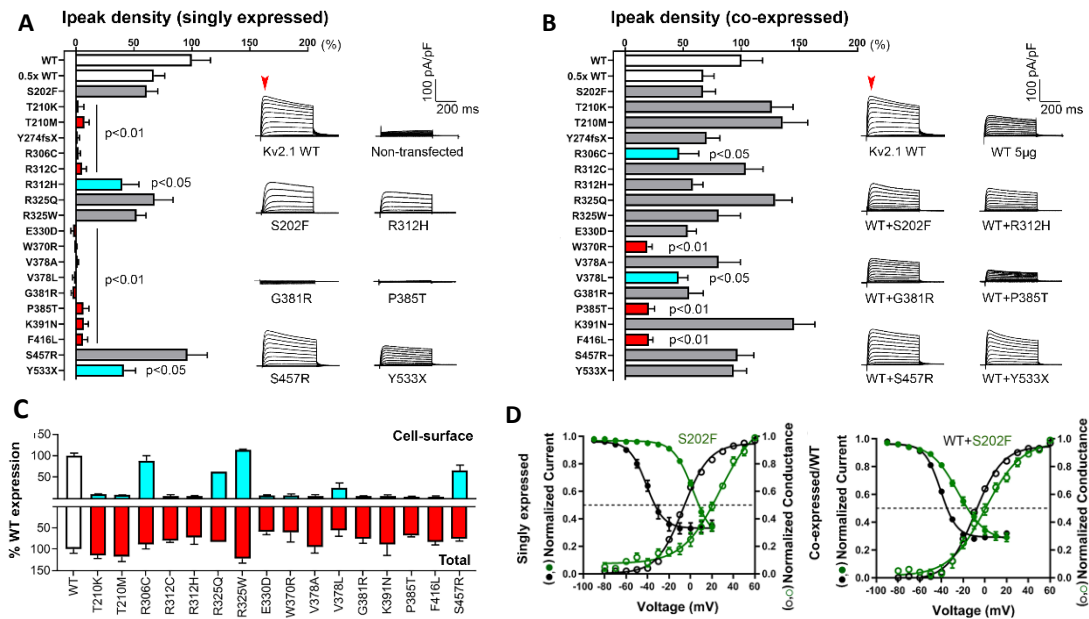
Des études fonctionnelles *in vitro* utilisant des techniques d'électrophysiologie patch-clamp dans différents modèles cellulaires ont été réalisées pour plusieurs variants *KCNB1*. Des variants situés dans le domaine du pore du canal  $K_{v2.1}$  (S347R, T374I, V378A, G379R, G401R) étaient associés à une diminution du courant potassique sortant et/ou une perte de sélectivité du canal avec augmentation de la perméabilité au sodium (Saitsu et al., 2015; Thiffault et al., 2015; Torkamani et al., 2014). Des variants situés dans le capteur de tension (I199F, R306C) entraînaient une modification des seuils de sensibilité au voltage du canal (Calhoun et al., 2017; Saitsu et al., 2015). Ces différents effets ont été confirmés par une étude récente ayant utilisé des techniques d'électrophysiologie (patch-clamp automatisé) et d'immunocytochimie à haut-débit pour étudier 17 variants *KCNB1* exprimés dans des cellules hétérologues (Kang et al., 2019). Les conséquences fonctionnelles différaient selon les variants et la composition du canal (transfection du variant seul ou co-transfection avec le

gène non muté), incluant une diminution de la conductance du canal et une modification des seuils d'activation et d'inactivation dépendant du voltage.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les canaux  $K_v2.1$  forment des clusters dans la membrane plasmique où ils participent à la formation des jonctions RE-MP. Une diminution de la quantité totale de protéine  $K_v2.1$  ou de son expression à la surface membranaire était retrouvée pour certains variants pathogènes de *KCNBI* (Kang et al., 2019; Thiffault et al., 2015) et la formation de jonctions RE-MP était altérée dans des cellules hétérologues exprimant le variant pathogène G379R (Hawkins et al., 2021).

Ces différents effets conduisent tous à un certain degré d'altération du fonctionnement du canal, faisant considérer les variants pathogènes de *KCNBI* comme des variants perte-de-fonction, avec un effet dominant négatif pour certains variants lorsqu'ils sont coexprimés avec le variant sauvage (Hawkins et al., 2021; Kang et al., 2019; Niday & Tzingounis, 2018). Cependant, les mécanismes par lesquels ces effets perte-de-fonction entraîneraient un trouble du neurodéveloppement et une épilepsie ne sont pas encore élucidés. Une des hypothèses avancée serait une augmentation de l'excitabilité neuronale liée à une dépolarisation facilitée à la fois par la perte de sélectivité du canal ionique entraînant un gain de cation et par la diminution du courant potassique altérant la repolarisation membranaire (Calhoun et al., 2017; Thiffault et al., 2015; Torkamani et al., 2014). Cependant, l'altération de la repolarisation membranaire était associée à un ralentissement des décharges de potentiel d'action dans des neurones pyramidaux excitateurs en culture surexprimant des variants de *KCNBI* (Saitsu et al., 2015). D'autres modèles sont donc nécessaires pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques.

Comme on l'a vu dans le chapitre précédent, le canal  $K_v2.1$  semble jouer un rôle important dans l'homéostasie calcique via la formation de jonctions RE-MP. L'altération de l'expression membranaire pourrait donc également conduire à perturber les interactions du canal avec ses partenaires cytoplasmiques. Enfin, le rôle biophysique des hétérotétramères formés par l'association de  $K_v2.1$  avec d'autres sous-unités dites silencieuses n'a pas été étudié.

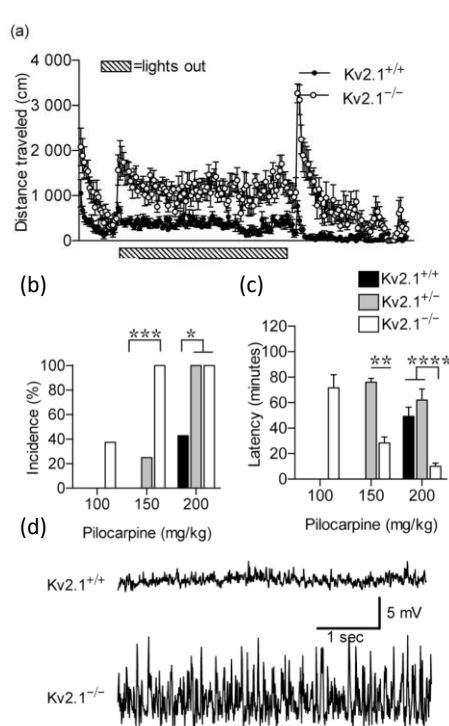


**Figure 12. Etude à haut débit de variants *KCNB1*.** (A) Comparaison du courant potassique  $I_K$  des différents canaux mutants  $K_v2.1$  exprimés seuls (B) ou coexprimés avec le canal non muté (WT) (barres rouges :  $p < 0.001$  vs WT,  $p < 0.05$  vs  $0.5 \times$  WT; barres turquoise :  $p < 0.05$  vs WT). (C) Niveau d'expression des différents canaux  $K_v2.1$  mutants à la surface des cellules (en turquoise) ou en quantité totale dans la cellule (en rouge), analysé par cytométrie en flux et exprimé en pourcentage par rapport à l'expression du canal WT. (D) Exemple de modification des seuils dépendants du voltage d'activation (cercles vides) et d'inactivation (cercles pleins) du canal mutant S202F (vert) par rapport au canal WT, lorsqu'il est exprimé seul (gauche) ou coexprimé avec le canal WT (à droite) ; *modifié à partir de Kang et al. 2019*

### 3.5. Modèles animaux de l'encéphalopathie *KCNB1*

En 2014, un premier modèle de souris knock-out  $K_v2.1^{-/-}$  est publié (Specia et al., 2014). Les souris homozygotes  $K_v2.1^{-/-}$  n'avaient pas de différences morphologiques comparé aux souris hétérozygotes et sauvages. De même, aucune anomalie structurelle cérébrale n'était rapportée. Elles ne présentaient pas de crises spontanées mais une diminution du seuil épiléptogène pour les crises pharmaco-induites (Figure 13, b, c). Sur le plan comportemental, ces souris présentaient une hyperactivité motrice spontanée et en présence d'un nouvel environnement (Figure 13, a), une diminution de l'anxiété au test du labyrinthe surélevé et un déficit de l'apprentissage spatial au test du labyrinthe de Morris. Sur le plan électrophysiologique, le courant potassique dépendant de  $K_v2.1$  était diminué dans les neurones hippocampiques en culture de souris  $K_v2.1^{-/-}$ . Dans les coupes d'hippocampe de souris  $K_v2.1^{-/-}$ , la potentialisation à long terme était diminuée et une hyperexcitabilité avec activité épileptiforme pharmaco-induite était enregistrée (Specia et al., 2014). Bien qu'imparfait, ce premier modèle in vivo confirmait l'effet pathogène de la perte de fonction

du canal  $K_v2.1$  et son rôle dans la régulation de l'excitabilité neuronale au niveau des neurones hippocampiques.

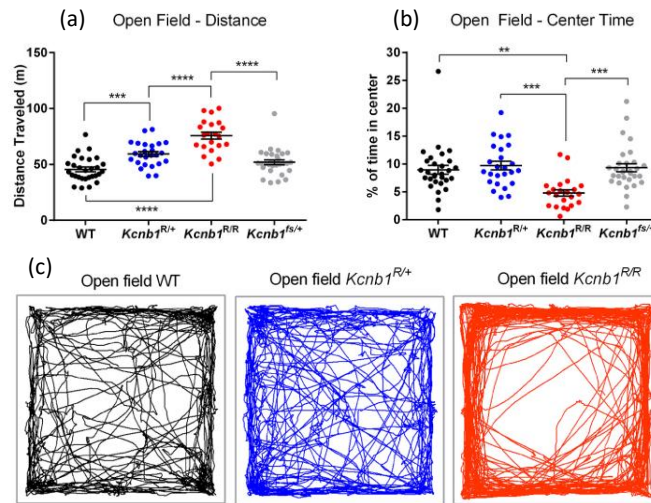


**Figure 13. Phénotype du modèle souris  $K_v2.1^{-/-}$  développé par Speca et al.**

(a) Les souris  $K_v2.1^{-/-}$  ont une activité locomotrice augmentée comparé aux souris  $K_v2.1^{+/+}$ . (b, c) Les souris  $K_v2.1^{+/+}$  et  $K_v2.1^{-/-}$  ont une susceptibilité augmentée aux crises induites par la pilocarpine comparé aux souris  $K_v2.1^{+/+}$ . (d) Enregistrement électroencéphalographique d'une activité ictale induite par la pilocarpine chez les souris  $K_v2.1^{-/-}$ ; *modifié à partir de Speca et al. 2014*

En 2020, l'équipe du Pr Kearney à Chicago ayant rapporté les premiers patients avec une encéphalopathie *KCNB1* (Kang et al., 2019; Torkamani et al., 2014), a publié un modèle souris knock-in dans lequel la mutation G379R a été introduite par la technique d'édition du génome CRISPR/Cas9 (Hawkins et al., 2021). Ces souris présentaient un phénotype plus sévère que le modèle knock-out  $K_v2.1$  avec une importante hyperactivité motrice, une impulsivité, une diminution de l'anxiété et des comportements stéréotypés (Figure 14). De rares crises spontanées étaient observées chez les souris *Kcnbl* homozygotes pour la mutation G379R (*Kcnbl<sup>R/R</sup>*). Comme pour les souris  $K_v2.1^{-/-}$ , les souris hétérozygotes (*Kcnbl<sup>R/+</sup>*) et *Kcnbl<sup>R/R</sup>* avaient une plus grande susceptibilité aux crises induites par les proconvulsivants comparé aux souris sauvages. Des anomalies électroencéphalographiques intercritiques incluant pointes isolées et ondes lentes étaient retrouvées chez les souris *Kcnbl<sup>R/+</sup>* et *Kcnbl<sup>R/R</sup>*. En plus de l'expression de  $K_v2.1$ , les auteurs ont étudié l'expression de la sous-unité alpha  $K_v2.2$  et de la sous-unité auxillaire AMIGO-1 dans les coupes de cerveaux des souris mutantes et sauvages. Ces sous-unités s'assemblent avec  $K_v2.1$  pour former des hétérotétramères (Bishop et al., 2018; Blaine & Ribera, 1998). Ils ont montré que leur expression était réduite dans les cerveaux de souris *Kcnbl<sup>R/+</sup>* et *Kcnbl<sup>R/R</sup>* par rapport au souris

sauvages, renforçant l'hypothèse d'un effet dominant négatif des variants pathogènes de



**Figure 14. Phénotype locomoteur des souris  $Kcnb1^{G379R}$ .** (a) Les souris  $Kcnb1^{R/+}$  et  $Kcnb1^{R/R}$  parcourait une plus longue distance que les souris WT dans la cage. (b) Les souris  $Kcnb1^{R/R}$  passait moins de temps au centre de la cage comparé aux souris  $Kcnb1^{R/+}$  et WT (c) Exemples de traces de déplacement des souris WT,  $Kcnb1^{R/+}$  et  $Kcnb1^{R/R}$  dans leur cage ; *modifié à partir de Hawkins et al. 2021*

*KCNB1* (Hawkins et al., 2021).



## 4. Le modèle poisson-zèbre

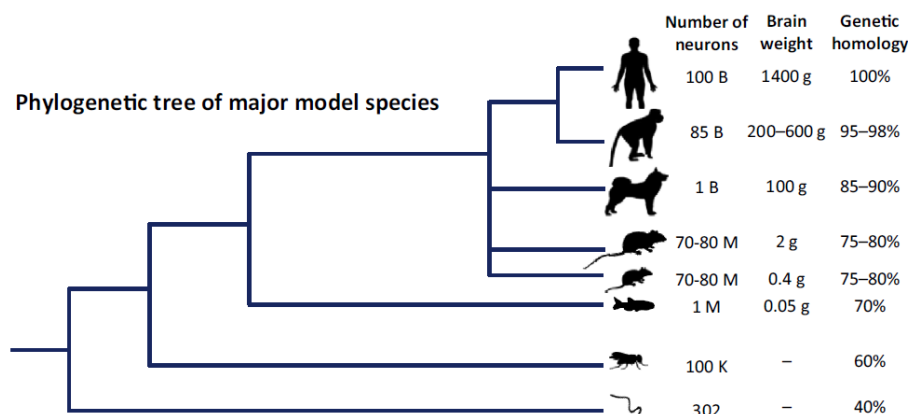
---

Si les modèles que nous venons de voir semblent pertinents pour améliorer la compréhension de l'encéphalopathie *KCNBI*, ils n'ont pour l'instant fait l'objet que de 2 études sans possibilité d'extrapolation des résultats aux patients. Le développement d'autres modèles d'évaluation plus rapide, à moindre coût, et permettant des screening pharmacologiques à haut-débit sont donc indispensables pour améliorer le transfert de connaissances vers des applications thérapeutiques au bénéfice du patient. Dans ce chapitre, nous allons présenter le poisson-zèbre, un modèle pertinent dans la recherche translationnelle en neuroscience. Nous allons commencer par décrire ses principales caractéristiques avant de détailler quelques exemples de modèles existants dans les troubles du neurodéveloppement et de l'épilepsie, pour finir par présenter le modèle *kcnbl* knock-out que nous avons utilisé dans cette étude.

### 4.1. Principales caractéristiques du modèle poisson-zèbre

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) est un petit poisson tropical d'eau douce originaire d'Asie du Sud. Il appartient au genre *Danio*, une espèce de poisson téléostéens de la grande famille des Cyprinidae. Le poisson-zèbre est de plus en plus utilisé comme organisme modèle dans la recherche biomédicale en raison de ses nombreux atouts (de Abreu et al., 2020; Sakai et al., 2018; Gawel et al., 2020). En effet, c'est un poisson de petite taille mesurant entre 4 et 5 cm à l'âge adulte dont l'élevage est facile et peu onéreux. Sa reproduction est rapide et associée à une fertilité élevée. A chaque croisement, quelques centaines d'œufs sont produits et un croisement peut être répété à quelques jours d'intervalle, permettant l'obtention rapide d'échantillons expérimentaux de grande taille. Les œufs fécondés se développent de manière synchrone à l'extérieur du corps de la femelle et sont ainsi disponibles pour l'observation à tous les stades de développement. Leur développement est rapide puisqu'ils deviennent adultes en moins de 3 mois (Drapeau et al., 2002; Kimmel et al., 1995; Schmidt et al., 2013) (Figure 16). La transparence du poisson-zèbre au stade embryonnaire et larvaire permet l'étude du système nerveux dans son ensemble grâce à des techniques d'imagerie *in vivo*, ce qui en fait un modèle particulièrement adapté à l'étude des pathologies du neurodéveloppement.

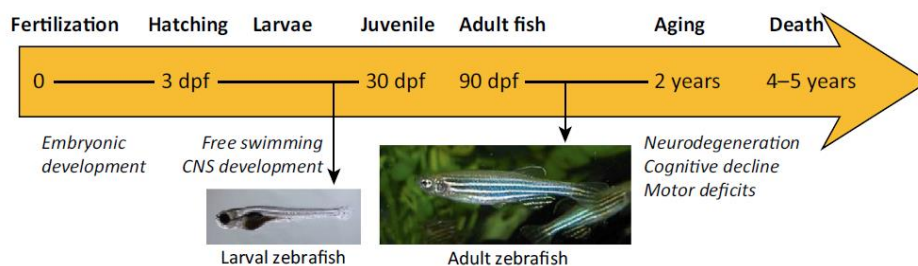
Le génome du poisson-zèbre a été entièrement séquencé et montre une homologie entre 80 et 90 % avec l'homme, avec 84 % des gènes associés à des maladies humaines ayant des homologues chez le poisson-zèbre (Figure 15) (Howe et al., 2013). Pour tester expérimentalement la relation fonctionnelle entre une mutation humaine et un phénotype, de nombreux outils génétiques sont disponibles chez le poisson-zèbre (après vérification des similitudes de séquence et de schéma d'expression entre les espèces humaine et poisson-zèbre) : les oligonucléotides morpholino antisens (AMO) qui permettent des modèles knockdowns transitoires (Rossi et al., 2015; Stainier et al., 2017); mais aussi les méthodes d'édition du génome (Schmid & Haass, 2013) tels que les systèmes TALEN (Bedell et al., 2012) et CRISPR/Cas, le plus récent et déjà largement utilisé (Hruscha et al., 2013; W. Y. Hwang et al., 2013).



**Figure 15. Arbre phylogénétique des principaux modèles animaux utilisés en recherche biomédicale ; modifié à partir de Stewart et al. 2014.**

#### 4.2. Principales étapes du développement embryonnaire du poisson-zèbre

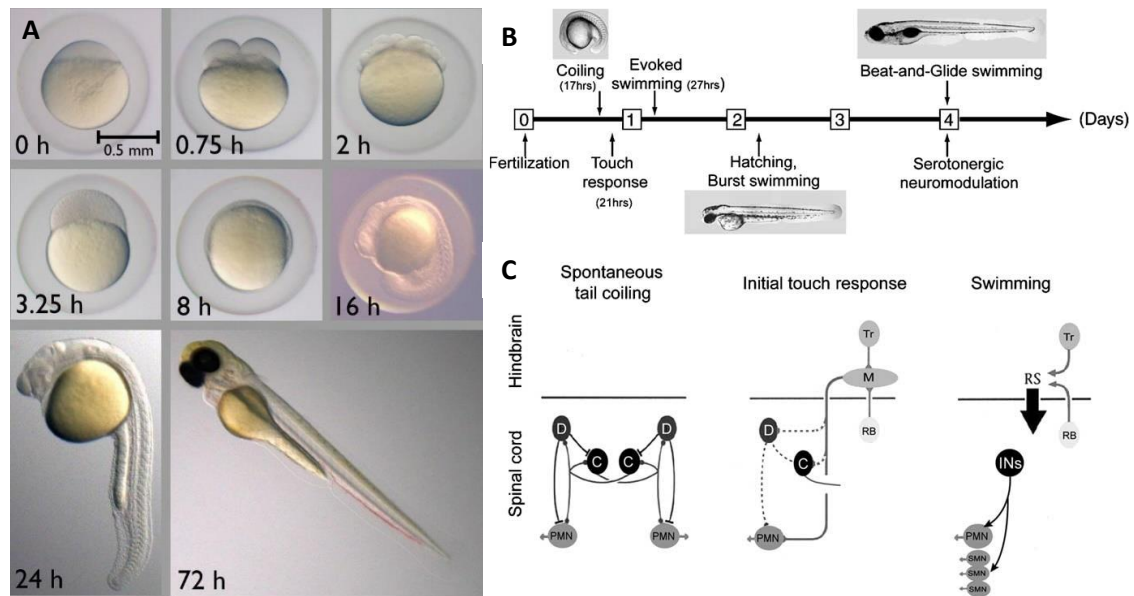
On distingue 4 stades dans le développement du poisson-zèbre : (1) le stade embryonnaire (0 à 72 hpf), (2) le stade larvaire (3-30 jours après la fécondation (jpf)), (3) le stade juvénile (1-3 mois) et (4) le stade adulte, définis par la production de gamètes viables et la capacité de se reproduire.



**Figure 16. Cycle de vie du poisson zèbre.** On distingue le stade embryonnaire (0-3 jpf), le stade larvaire (3-29 jpf), le stade juvénile (30-89 jpf) et le stade adulte (>90 jpf) ; *modifié à partir de Stewart et al. 2014*

La vitesse de développement dépend de la température avec un déroulement standardisé à 28,5°C (Kimmel et al., 1995). A cette température, le développement embryonnaire comprend successivement les périodes de clivage (45 minutes post fertilisation-2 hpf), la blastula (2-3 hpf), la gastrula (5-10hpf), la segmentation (10-24 hpf), la pharyngula (24-48 hpf) puis la période d'éclosion (48-72 hpf). Après la première division, les blastomères se clivent toutes les 15 minutes. Dès 10 hpf, l'épibolie est complète, les premiers organes deviennent visibles et on différencie la tête du bourgeon caudal. Durant cette phase de segmentation, un nouveau somite se forme toutes les 20 minutes, permettant un allongement rapide (Kimmel et al., 1995). La neurulation se fait en parallèle de la segmentation et conduit à 16 hpf à l'individualisation des 4 principales structures cérébrales, à savoir le télencéphale, le diencephale, le mésencéphale et le cerveau postérieur, puis du cervelet vers 19 hpf et du thalamus vers 22 hpf (Kimmel et al., 1995). Le tectum optique, équivalent du colliculi supérieur chez les mammifères, correspond au toit du mésencéphale et se forme à la fin de cette période de segmentation (Kimmel et al., 1995). Il constituera la structure la plus complexe du poisson-zèbre, formée de plusieurs couches et centre de traitement de l'information visuelle du poisson. Les neurones apparaissent en deux vagues successives. L'apparition du tube neural à 16 hpf est rapidement suivie par la première vague de neurones dits primaires, qui se distinguent par leur développement précoce et leur plus gros corps cellulaire (Kimmel et al., 1995). Ils sont en nombre plus restreint que ceux de la seconde vague, dits neurones secondaires. Les neurones primaires sont les premiers à projeter un axone et forment les premiers faisceaux de fibres nerveuses (Wilson et al., 1990) qui serviront de guides aux axones des neurones apparaissant ultérieurement (Kuwada, 1986). Les premières innervations musculaires par les motoneurones primaires apparaissent vers 17 hpf, au moment où l'on observe des mouvements spontanés d'enroulement latéral de la queue et du tronc de l'embryon (« coiling ») dans son chorion (Kimmel et al., 1995; Saint-Amant &

Drapeau, 1998). La fréquence de ces mouvements augmente jusqu'à 19 hpf puis diminue progressivement durant les 6 à 7 heures suivantes. Ces mouvements d'enroulement spontané sont médiés par le couplage électrique d'un réseau spinal primitif composé de motoneurones primaires et d'interneurones (Drapeau et al., 2002). A partir de 21h, les embryons deviennent sensibles au toucher et répondent par un enroulement rapide de la queue, sous-tendu par la mise en place de signaux synaptiques glutamatergiques et glycinergiques. L'activité cardiaque apparaît à 24 hpf et, à 36 hpf, la plupart des organes principaux sont formés (Kimmel et al., 1995). L'embryon sort de son chorion entre 48 et 72 hpf et commence à nager spontanément. La maturation de la nage va se faire sous la commande synaptique prémotrice modulée par l'apparition du système sérotoninergique (Drapeau et al., 2002; Saint-Amant & Drapeau, 1998). Le comportement alimentaire apparaît à 4 dpf et définit le passage au stade larvaire.



**Figure 17. Développement embryonnaire du poisson-zèbre et apparition des premiers mouvements.** (A) Embryon au stade de clivage allant de 1 cellule (0h) à 64 cellules (2h), suivi du stade de la blastula (3.25h), de la gastrula avec la formation de l'épibolie qui recouvre progressivement le yolk (8h), de la segmentation avec l'apparition des somites, arcs pharyngés primordiaux et neuromères (14 somites, 16h), de la pharyngula marquée par le début de la pigmentation de la rétine et de la peau et les premiers battements cardiaques (t = 24 h et de l'éclosion à 48h). Le stade embryonnaire se termine au moment de l'apparition de la bouche en avant des yeux (« protruding mouth ») (72 h) (de gauche à droite et de haut en bas). *Photos provenant de aquaportail.com* (B) Les premiers mouvements d'enroulement spontané de la queue (« coiling ») apparaissent à 17 hpf, suivi d'une réponse motrice au toucher à 21 hpf et de la nage après l'éclosion, à partir de 48 hpf. (C) Les mouvements d'enroulement spontané de la queue sont dépendants d'un réseau neuronal limité à la moelle épinière et basé sur le couplage électrique de motoneurones primaires (PMN) et d'interneurones descendants (D) et commissuraux (C) (à gauche). La réponse au toucher nécessite l'activation des neurones du cerveau postérieur (M, Mauthner, Tr, Trigeminal) et des neurones spinaux, incluant les neurones sensoriels Rohon-Barbe (RB). Cette réponse est médiée en partie par les synapses glutamatergiques (au centre). La nage spontanée nécessite l'intégration des neurones réticulo-spinaux du cerveau postérieur (RS), des interneurones de la moelle épinière (INS) et des motoneurones secondaires (SMN), mettant en jeu les systèmes glutamatergiques et glycinergiques. (À droite). *Schéma de Brustein et al. 2003.*

Ces comportements moteurs sont facilement observables et peuvent être étudiés pour phénotyper un modèle de poisson-zèbre ou tester l'effet de molécules. En effet, l'embryon de poisson-zèbre est le seul organisme vertébré qui permet le criblage à haut débit d'une librairie de médicaments toxiques ou thérapeutiques, grâce à sa perméabilité aux petites molécules et à sa taille lui permettant de tenir dans des plaques 96 puits (Zon & Peterson, 2005).

### 4.3. Le poisson-zèbre comme modèle d'étude des troubles du neurodéveloppement

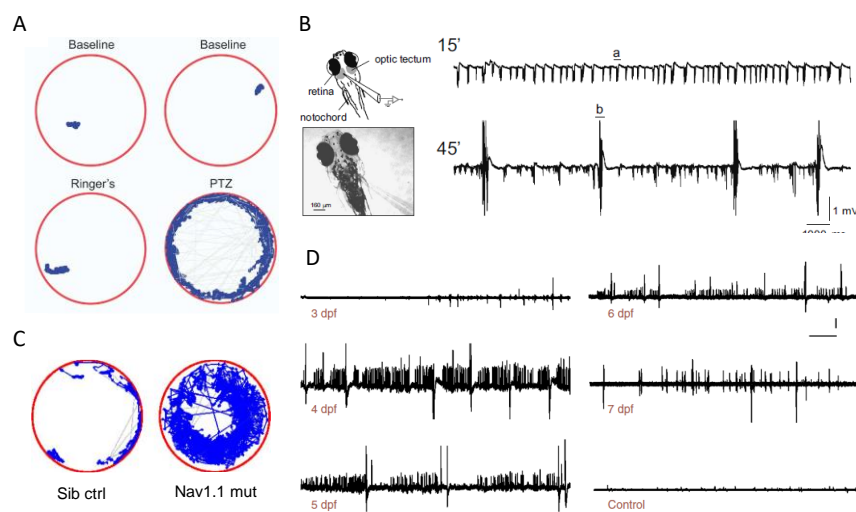
Ces dernières années, le poisson-zèbre a suscité un intérêt croissant pour l'analyse fonctionnelle de gènes associés à différents troubles du neurodéveloppement, incluant la

déficience intellectuelle, les troubles du spectre autistique (TSA), le trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité (TDAH) mais aussi l'épilepsie (Stewart, Nguyen, et al., 2014; Samarut, 2016; Sakai et al., 2018; Gawel et al., 2020; de Abreu et al., 2020). Comme nous venons de le voir, la transparence des embryons, leur développement rapide et externalisé facilite les manipulations génétiques et l'étude des processus neurodéveloppementaux. Malgré l'impossibilité évidente de reproduire l'ensemble des caractéristiques phénotypiques humaines chez le poisson-zèbre, le développement des techniques de vidéotracking a permis la description d'un large éventail de phénotypes comportementaux complexes chez le poisson-zèbre (Kalueff et al., 2013; Stewart, Braubach, et al., 2014) et offre maintenant la possibilité d'étudier leur comportement avec des systèmes automatisés à haut-débit (Fuller et al., 2018; Green et al., 2012; Hunyadi et al., 2017). Des modifications comportementales précoces ont ainsi été rapportées dans les modèles poisson-zèbre mutants *MECP2* (Pietri et al., 2013), gène responsable du syndrome de Rett, et dans des modèles mutants de gènes associés aux TSA tels que *CNTNAP2* (Hoffman et al., 2016), *SHANK3* (C. Liu et al., 2021; C.-X. Liu et al., 2018), *DYRK1A* (Kim et al., 2017). De plus, l'enregistrement électroencéphalographique est possible dès le stade de larve (Afrikanova et al., 2013; Baraban et al., 2005), de même que la visualisation directe de l'activité neuronale par des techniques d'imagerie calcique *in vivo* (Chen et al., 2013; Keller & Ahrens, 2015; Burrows et al., 2020).

En 2005, l'équipe de Baraban décrit un phénotypique épileptique chez des larves à 7 jpf dans un modèle de crises induites par le pentylènetétrazole (PTZ), une molécule proconvulsivante interférant avec la transmission GABAergique (Baraban et al., 2005). Ce phénotype a été classé en 3 stades dépendant de la concentration en PTZ, débutant par une augmentation drastique de l'activité locomotrice (stade 1), suivi par un pattern de nage circulaire rapide « en tourbillon » (« whirlpool-like » behavior, stade 2) et pouvant se terminer par de brèves convulsions évocatrices de clonies suivies d'une perte de posture pendant quelques secondes (stade 3) (Baraban et al., 2005; Griffin et al., 2016) (Figure 18, A). Ce phénotype épileptique induit par le PTZ était corrélé avec la présence de décharges épileptiformes enregistrées en EEG (Afrikanova et al., 2013; Baraban et al., 2005) (Figure 18, B) et avec l'augmentation de l'expression neuronale du proto-oncogène *c-fos*, marqueur de l'activation neuronale (Morgan et al., 1987; Baraban et al., 2005; Baxendale et al., 2012).

Le phénotype épileptique comportemental et EEG induit par le PTZ a ensuite été étudié dans plusieurs modèles d'épilepsies génétiques, notamment dans le modèle *scn1lab*, homologue du gène *SCN1A* de l'homme et responsable du syndrome de Dravet (Schoonheim et al., 2010; Baraban et al., 2013). Les larves mutantes homozygotes *scn1lab*<sup>-/-</sup> reproduisent

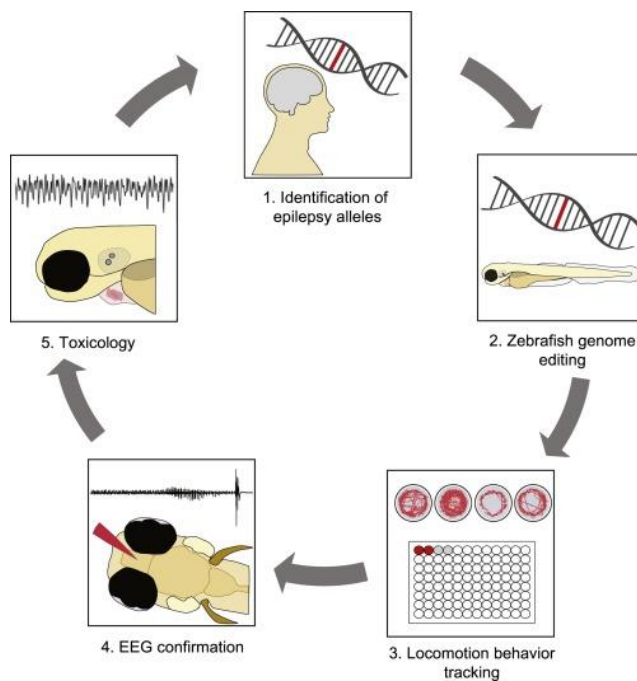
certaines caractéristiques phénotypiques des patients, à savoir un phénotype épileptique comportemental et électrographique dès 4 jpf (Figure 18, C,D) (Baraban et al., 2013), des troubles du sommeil et du comportement (Grone et al., 2017), un profil de réponse pharmacologique aux anti-épileptiques similaire à celui des patients (Baraban et al., 2013). Le modèle *scn1lab* knockdown basé sur l'expression transitoire d'un morpholino reproduit un phénotype similaire au modèle knockout (Zhang et al., 2015). Grâce à la possibilité du criblage à haut-débit chez les embryons de poisson-zèbre, de nombreuses molécules ont été testées dans ces modèles et ont notamment permis de confirmer pour la première fois dans un modèle animal l'effet suspecté antiépileptique de la fenfluramine (Dinday & Baraban, 2015; Zhang et al., 2015).



**Figure 18. Représentation de l'activité locomotrice et électroencéphalographique épileptiforme dans le modèle PTZ (A, B) et *scn1Lab* (C, D).** (A) Traces de vidéotracking de poissons-zèbres dans un milieu normal (en haut) et après 10 minutes d'exposition à du ringer (bas à gauche) et du PTZ 15 mM (bas à droite). Les points bleus indiquent les mouvements du poisson, les lignes grises indiquent les mouvements rapides épileptiformes. (B) Enregistrements électroencéphalographiques de larves immobilisées dans la gélose grâce à une électrode placée dans le tectum optique (schéma de gauche). Activité épileptiforme chez une larve exposée à 15 mM de PTZ durant 15 minutes (en haut à droite) et 45 minutes (en bas à droite); *modifié à partir de Baraban et al, 2005*. (C) Traces de vidéotracking d'un poisson contrôlé (à gauche) et d'une larve mutante *scn1Lab* à 5 dpf (à droite). (D) Enregistrements de décharges électrographiques épileptiformes entre 3 et 7 dpf chez une larve mutante *scn1Lab*; *modifié à partir de Baraban et al, 2013*

Des modèles knockdown transitoires ont été développés pour les épilepsies liées aux gènes *LGII* (Teng et al., 2011), *KCNQ3* (Chege et al., 2012), *KCNJ10* (Zdebik et al., 2013), *CHD2* (Suls et al., 2013) et plus récemment *DEPDC5* (de Calbiac et al., 2018) et *CACNA1A* (Gawel et al., 2019). En parallèle, des lignées transgéniques stables ont été établies pour des

encéphalopathies développementales et épileptiques telles que l'encéphalopathie *STXBP1* (Grone et al., 2016), l'épilepsie pyridoxine-dépendante par mutation du gène *ALDH7A1* (Pena et al., 2017; Zabinyakov et al., 2017), la Sclérose Tubéreuse de Bourneville par mutation du gène *TSC2* (Scheldeman et al., 2017), le syndrome d'Angelman par mutation du gène *UBE3A* (Hortopan et al., 2010b; Hortopan & Baraban, 2011) ou les épilepsies liées aux mutations du gène *DEPDC5* (Swaminathan et al., 2018). Ainsi, si les progrès du séquençage à haut débit ont permis l'identification de nombreuses causes génétiques aux troubles du neurodéveloppement, et en particulier à l'épilepsie, les progrès parallèles des techniques de génie génétique offrent la possibilité unique d'étudier leurs rôles physiopathologiques chez le poisson-zèbre et ouvrent la voie à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques (Figure 19).

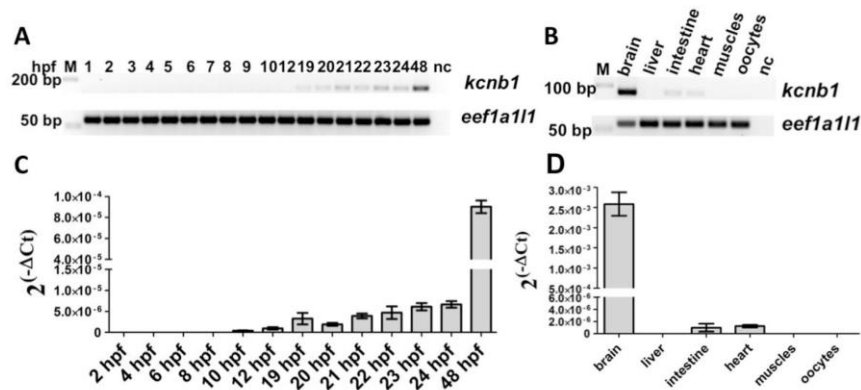


**Figure 19. Principes généraux d'utilisation du poisson zèbre dans la recherche translationnelle en épilepsie ; Griffin et al. 2016**

#### 4.4. Les modèles poissons-zèbres mutants *kcnb1*

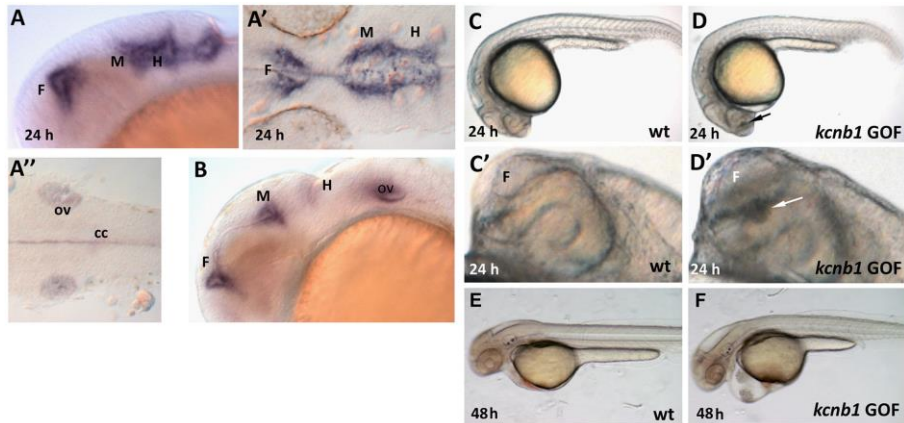
Le gène *kcnb1* du poisson-zèbre possède 67% d'homologie avec le gène *KCNB1* de l'homme (Ensembl.org). Comme chez les mammifères, *kcnb1* s'exprime précocement au cours du développement du poisson-zèbre, détecté dès 19 hpf (Figure 20). Chez le poisson-zèbre adulte, les transcrits *kcnb1* sont principalement détectés dans le cerveau (Jedrychowska et al., 2021).





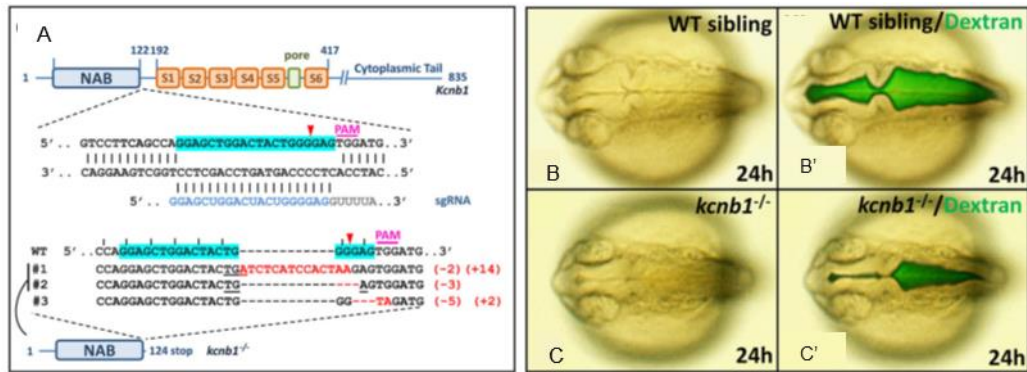
**Figure 20. Expression développementale de *kcnb1* chez le poisson-zèbre étudiée par qRT-PCR.** (A, C) L'expression de *kcnb1* augmente à partir de 19 hpf et se poursuit au cours du développement. (B, D) Chez le poisson zèbre adulte, *kcnb1* est fortement exprimé dans le cerveau et plus faiblement dans le cœur et les intestins ; *modifié à partir de Jędrychowska et al. 2021*

L'équipe polonaise du Pr Vladimir Korzh s'est intéressée au rôle de *kcnb1* au cours du développement (Jędrychowska & Korzh, 2019). En 2016, elle publie une première étude sur le rôle antagoniste des sous-unités  $K_v2.1$  et  $K_v6.4$  dans le développement du système ventriculaire cérébral chez le poisson-zèbre (H. Shen et al., 2016). Dans cette étude, les auteurs ont développé des modèles poissons-zèbres mutants *kcng4b*, codant pour l'homologue poisson-zèbre de la sous-unité  $K_v6.4$  et *kcnb1*, codant pour l'unique homologue poisson-zèbre de la sous-unité  $K_v2.1$  (Chr. 6, ENSDARG00000060095, Ensembl Zv9). La surexpression de *Kcnb1* par l'injection d'un plasmide linéarisé contenant la séquence *kcnb1* entraînait un phénotype similaire aux modèles mutants knockout et knockdown *kcng4b*, à savoir une dilatation du système ventriculaire avec hydrocéphalie à 48 hpf (Figure 21 C-F) (H. Shen et al., 2016).



**Figure 21. Détection précoce de *Kcnb1* chez le poisson zèbre et conséquence de sa surexpression sur le système ventriculaire.** (A-B) Détection des transcrits *kcnb1* à 24 hpf (A) et 30 hpf (B) par hybridation in situ, vues latérales (A, B) et dorsales (A', A''). (C-F) Phénotype morphologique du modèle gain de fonction surexprimant *Kcnb1* avec amas de cellules dans le 3<sup>ème</sup> ventricule (flèche) à 24 hpf (C'D') puis hydrocéphalie avec œdème cardiaque à 48 hpf (E, F). Cc, canal central ; F, forebrain (cerveau antérieur) ; H, hindbrain (cerveau postérieur) ; M, midbrain (mésencéphale) ; ov, otic vesicle (vésicule optique) ; *modifié à partir de Shen et al. 2016*

Pour valider le rôle fonctionnel de *Kcnb1* dans la formation du système ventriculaire, les auteurs ont ensuite généré un modèle mutant *kcnb1* knockout en utilisant le système CRISPR/Cas9 (H. Shen et al., 2016). Les mutants *kcnb1* entraînaient l'apparition prématurée d'un codon stop entre le domaine cytoplasmique N-terminal et le premier domaine transmembranaire S1 (Figure 22, A). Un trouble de la gastrulation et une diminution du système ventriculaire étaient retrouvés chez une minorité de mutants *kcnb1*<sup>-/-</sup> (Figure 22, B-C). Par ailleurs, la moitié des mutants *kcnb1*<sup>-/-</sup> présentaient une diminution significative de la taille de l'oreille interne et des otolithes, en lien avec un défaut de prolifération cellulaire (Jedrychowska et al., 2021).



**Figure 22. Modèle *kcnb1*<sup>-/-</sup> généré par le système CRISPR/Cas.** (A) Représentation schématique de la construction du mutant *kcnb1*<sup>-/-</sup>. La séquence cible (bleue), la séquence de l'ARN guide (sgRNA), l'emplacement du motif PAM ciblé par l'ARN guide (rose), les insertions/délétions de nucléotides (en rouge) des mutants obtenus et leurs séquences respectives sont représentés. La protéine obtenue par les 2 premiers mutants (#1,#2) est schématisée en bas, consistant en une protéine tronquée juste après le domaine NAB. (B, C) Le système ventriculaire est diminué chez le mutant *kcnb1*<sup>-/-</sup> comparé au poisson sauvage, visualisé par l'injection intra-ventriculaire de Dextran (B', C') ; *modifié à partir de Shen et al. 2016*

Ces poissons avaient une altération du comportement d'échappement provoqué par le toucher (TEER) à 5 dpf, avec une absence de réponse pour une majorité d'entre eux ou un pattern de nage anormal, interprétée comme un déficit du fonctionnement vestibulaire en lien avec les anomalies de l'oreille interne (Jedrychowska et al., 2021). Cependant, le taux de mortalité des mutants adultes *kcnb1*<sup>-/-</sup> pouvait atteindre jusqu'à 48%, suggérant l'existence d'un phénotype plus sévère. Par ailleurs, la recherche d'un phénotype épileptique n'avait pas été étudié dans ce modèle.

## 5. Objectifs de la thèse

---

Le spectre phénotypique de l'encéphalopathie *KCNBI* n'était pas encore bien défini, avec peu de patients rapportés dans la littérature depuis la première publication en 2014. Les études fonctionnelles *in vitro* suggèrent un effet perte-de-fonction des variants pathogènes *KCNBI* sur le fonctionnement du canal  $K_v2.1$ , confirmé par les modèles murins développés pour cette pathologie. Cependant, les mécanismes physiopathologiques reliant ces effets fonctionnels au phénotype des patients ne sont pas encore élucidés et aucun traitement spécifique n'est disponible à ce jour.

Le premier objectif de cette thèse était de réunir une large série de patients porteur de variants pathogènes de *KCNBI* afin d'en décrire le spectre génotypique et phénotypique, en ajoutant ces données à une revue des patients de la littérature.

En parallèle, le deuxième objectif était de développer un modèle mutant poisson-zèbre pour l'étude de l'encéphalopathie *KCNBI*. La caractérisation phénotypique était la première étape pour valider un tel modèle et pouvoir ensuite aller vers l'étude pharmacologique de molécules à visée thérapeutique. Compte tenu des données disponibles issues des études fonctionnelles *in vitro*, nous avons choisi d'étudier l'effet d'une perte de fonction du gène *kcnbl* chez le poisson-zèbre via deux approches d'inhibition du gène. La première consistait à approfondir le phénotypage du modèle zebrafish knock-out *kcnbl*<sup>-/-</sup> déjà existant afin de rechercher des caractéristiques comportementales évocatrices d'un phénotype épileptique, comme cela avait pu être fait dans le modèle *scn1lab* du syndrome de Dravet par exemple. La deuxième approche reposait sur un modèle knock-down avec inhibition transitoire et partielle du gène par un oligonucléotide antisens (« morpholino »).



# **RESULTATS**

---



# 1. Description du spectre génotypique de l'encéphalopathie *KCNB1*

---

## 1.1. Avant-propos

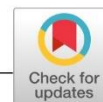
L'objectif de cette étude était de réunir une large série de patients porteurs de variants pathogènes de *KCNB1* afin d'en décrire le spectre génotypique, de rechercher des corrélations génotype/phénotype et d'identifier d'éventuels hotspots mutationnels. Pour cela, nous avons réuni une cohorte de nouveaux patients porteurs de variants pathogènes de *KCNB1* et réalisé une revue de la littérature. Nous avons identifié 27 patients grâce au centre de référence des épilepsies rares et de ses collaborations internationales, mais aussi de l'association de patients *KCNB1* France. Nous avons contacté les différents médecins de ces patients et collecté les données cliniques, génétiques, EEG et IRM. Entre 2014 et 2019, 37 patients porteurs de 29 variants pathogènes différents de *KCNB1* avaient été rapportés dans la littérature. Nous avons donc analysé les données génétiques de ces 64 patients, non apparentés, porteurs de 47 variants pathogènes de *KCNB1*.

La majorité de ces variants était survenu de novo. Un seul patient de notre série avait hérité le variant de sa mère qui présentait un phénotype moins sévère avec une déficience intellectuelle légère et pas d'épilepsie. Les variants étaient principalement des variants faux-sens (79%), situés dans les domaines transmembranaires S1 à S6 de la protéine (89%), avec plusieurs hotspots mutationnels au niveau du capteur de tension ou du pore de la protéine. Nous avons rapporté quelques variants localisés dans le domaine C-terminal, tous tronquants et associés à un phénotype épileptique moins sévère, faisant discuter une possible corrélation génotype-phénotype. Les principales caractéristiques cliniques de ces 64 patients étaient détaillées dans un tableau récapitulatif.

Cette étude donne un aperçu du spectre mutationnel associé à l'encéphalopathie *KCNB1* et apporte des éléments de réflexion importants pour l'interprétation des variants et le conseil génétique délivré aux familles. Elle a fait l'objet d'une publication dans *Human mutation*.

## 1.2. Article correspondant





## Expanding the genetic and phenotypic relevance of *KCNB1* variants in developmental and epileptic encephalopathies: 27 new patients and overview of the literature

Claire Bar<sup>1,2,3</sup>  | Giulia Barcia<sup>2,3,4</sup> | Mélanie Jennesson<sup>5</sup> | Gwenaël Le Guyader<sup>6,7</sup> | Amy Schneider<sup>8</sup> | Cyril Mignot<sup>9,10</sup> | Gaetan Lesca<sup>11,12</sup> | Delphine Breuillard<sup>1</sup> | Martino Montomoli<sup>13</sup> | Boris Keren<sup>10</sup> | Diane Doummar<sup>14</sup> | Thierry Billette de Villemeur<sup>14</sup> | Alexandra Afenjar<sup>15</sup> | Isabelle Marey<sup>10</sup> | Marion Gerard<sup>16</sup> | Hervé Isnard<sup>17</sup> | Alice Poisson<sup>18</sup> | Sophie Dupont<sup>9,19</sup> | Patrick Berquin<sup>20</sup> | Pierre Meyer<sup>21,22</sup> | David Genevieve<sup>23</sup> | Anne De Saint Martin<sup>24</sup> | Salima El Chehadeh<sup>25</sup> | Jamel Chelly<sup>25</sup> | Agnès Guët<sup>26</sup> | Emmanuel Scalais<sup>27</sup> | Nathalie Dorison<sup>28</sup> | Candace T. Myers<sup>29</sup> | Heather C. Mefford<sup>30</sup> | Katherine B. Howell<sup>31,32</sup> | Carla Marini<sup>13</sup> | Jeremy L. Freeman<sup>31,32</sup> | Anca Nica<sup>33</sup> | Gaetano Terrone<sup>34</sup> | Tayeb Sekhara<sup>35</sup> | Anne-Sophie Lebre<sup>36</sup> | Sylvie Odent<sup>37,38</sup> | Lynette G. Sadleir<sup>39</sup> | Arnold Munnich<sup>3,4</sup> | Renzo Guerrini<sup>13</sup> | Ingrid E. Scheffer<sup>8,31,40</sup> | Edor Kabashi<sup>2,3</sup> | Rima Nabbout<sup>1,2,3</sup> 

<sup>1</sup>Department of Pediatric Neurology, Reference Centre for Rare Epilepsies, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

<sup>2</sup>Imagine institute, laboratory of Translational Research for Neurological Disorders, INSERM UMR 1163, Imagine Institute, Paris, France

<sup>3</sup>Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>4</sup>Department of genetics, Necker Enfants Malades hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>5</sup>Department of Pediatrics, American Memorial Hospital, Reims, France

<sup>6</sup>Department of genetics, University hospital Poitiers, Poitiers Cedex, France

<sup>7</sup>EA3808-NEUVACOD Unité Neurovasculaire et Troubles Cognitifs, Pôle Biologie Santé, Université de Poitiers, Poitiers, France

<sup>8</sup>Department of Medicine, Epilepsy Research Centre, Austin Health, The University of Melbourne, Heidelberg, Victoria, Australia

<sup>9</sup>Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, INSERM, U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 UMR S 1127, Paris, France

<sup>10</sup>Département de Génétique et de Cytogénétique, Centre de Référence Déficience Intellectuelle de Causes Rares, APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, GRC UPMC (Déficience Intellectuelle et Autisme), Paris, France

<sup>11</sup>Department of genetics, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>12</sup>Neurosciences centre of Lyon, INSERM U1028, UMR CNRS 5292, Université Claude Bernard Lyon 1, Bron Cedex, France

<sup>13</sup>Pediatric Neurology, Neurogenetics and Neurobiology Unit and Laboratories, Department of Neuroscience, A Meyer Children's Hospital, University of Florence, Florence, Italy

<sup>14</sup>Department of Pediatric Neurology, Hôpital Armand Trousseau, AP-HP, Paris, France

<sup>15</sup>Département de Génétique et Embryologie Médicale, Pathologies Congénitales du Cervelet-LeucoDystrophies, Centre de Référence déficiences intellectuelles de causes rares, AP-HP, Hôpital Armand Trousseau, GRC n°19, Sorbonne Université, Paris, France

<sup>16</sup>Department of genetics, CHU Côte de Nacre, Caen, France

<sup>17</sup>Neurology clinic, Lyon, France

<sup>18</sup>Reference Center for Diagnosis and Management of Genetic Psychiatric Disorders, Centre Hospitalier le Vinatier and EDR-Psy Team, Centre National de la Recherche Scientifique & Lyon 1 Claude Bernard University, Villeurbanne, France

<sup>19</sup>Epileptology and Rehabilitation department, GH Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, AP-HP, Paris, France

- <sup>20</sup>Department of pediatric neurology Amiens-Picardie university hospital, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France
- <sup>21</sup>Department of pediatric neurology, Montpellier university hospital, Montpellier, France
- <sup>22</sup>PhyMedExp, U1046 INSERM, UMR9214 CNRS, Montpellier, France
- <sup>23</sup>Service de génétique clinique et du Département de Génétique Médicale, Maladies Rares et Médecine Personnalisée, Centre de référence maladies rares anomalies du développement, CHU Montpellier, Montpellier, France
- <sup>24</sup>Department of Pediatric Neurology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France
- <sup>25</sup>Department of genetics, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France
- <sup>26</sup>Department of Pediatric, Louis-Mourier Hospital, Colombes, France
- <sup>27</sup>Department of Pediatric Neurology, Centre Hospitalier de Luxembourg, Luxembourg City, Luxembourg City, Luxembourg
- <sup>28</sup>Department of pediatric Neurosurgery, Rothschild Foundation Hospital, Paris, France
- <sup>29</sup>Department of Pediatrics, University of Washington, Seattle, Washington
- <sup>30</sup>Department of Pediatrics, Division of Genetic Medicine, University of Washington, Seattle, Washington
- <sup>31</sup>Departments of Neurology and Paediatrics, Royal Children's Hospital, University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia
- <sup>32</sup>Murdoch Children's Research Institute, Melbourne, Victoria, Australia
- <sup>33</sup>Department of Neurology, Center for Clinical Research (CIC 1414), Rennes University Hospital, Rennes, France
- <sup>34</sup>Department of Translational Medical Sciences, Section of Pediatrics-Child Neurology Unit, Federico II University, Naples, Italy
- <sup>35</sup>Department of Pediatric Neurology, C.H.I.R.E.C, Brussels, Belgium
- <sup>36</sup>Department of genetics, Maison Blanche hospital, University hospital, Reims, Reims, France
- <sup>37</sup>Reference Centre for Rare Developmental Abnormalities, CLAD-Ouest, CHU Rennes, Rennes, France
- <sup>38</sup>Institute of genetics and development, CNRS UMR 6290, Rennes university, Rennes, France
- <sup>39</sup>Department of Paediatrics and Child Health, University of Otago, Wellington, New Zealand
- <sup>40</sup>The Florey Institute of Neurosciences and Mental Health, Heidelberg, Victoria, Australia

**Correspondence:** Rima Nababout, Department of Pediatric Neurology, Reference Centre for Rare Epilepsies, Necker Enfants Malades Hospital, 149 Rue de Sèvres, 75015 Paris, France.  
Email: rimanababout@yahoo.com

#### Funding information

National Health and Medical Research Council of Australia; H2020 European Research Council; Curekids New Zealand; Health Research Council of New Zealand; Agence Nationale de la Recherche; European Commission Seventh Framework Programme; Fondation Bettencourt Schueller; ERC

#### Abstract

Developmental and epileptic encephalopathies (DEE) refer to a heterogeneous group of devastating neurodevelopmental disorders. Variants in *KCNB1* have been recently reported in patients with early-onset DEE. *KCNB1* encodes the  $\alpha$  subunit of the delayed rectifier voltage-dependent potassium channel  $K_v2.1$ . We review the 37 previously reported patients carrying 29 distinct *KCNB1* variants and significantly expand the mutational spectrum describing 18 novel variants from 27 unreported patients. Most variants occur de novo and mainly consist of missense variants located on the voltage sensor and the pore domain of  $K_v2.1$ . We also report the first inherited variant (p.Arg583\*). *KCNB1*-related encephalopathies encompass a wide spectrum of neurodevelopmental disorders with predominant language difficulties and behavioral impairment. Eighty-five percent of patients developed epilepsies with variable syndromes and prognosis. Truncating variants in the C-terminal domain are associated with a less-severe epileptic phenotype. Overall, this report provides an up-to-date review of the mutational and clinical spectrum of *KCNB1*, strengthening its place as a causal gene in DEEs and emphasizing the need for further functional studies to unravel the underlying mechanisms.

#### KEYWORDS

developmental and epileptic encephalopathy, epilepsy, *KCNB1*, potassium channel

## 1 | BACKGROUND

Developmental encephalopathies constitute a broad and genetically heterogeneous group of neurodevelopmental disorders diagnosed during early childhood and persisting throughout life. The clinical spectrum includes variable degrees of social, cognitive, motor,

language, and behavioral impairments. The concept of “developmental and epileptic encephalopathy” (DEE) refers to the frequently associated epileptic activity (seizures and electroencephalogram [EEG] abnormalities) that contributes to developmental impairment and regression (Scheffer et al., 2017). Recent advances in DNA-sequencing methods have highlighted the important role of gene-

encoding ion channels in the pathogenesis of DEEs (Wang et al., 2017). Ion channels are crucial in the generation and modulation of excitability in the nervous system (Wei et al., 2017). “Channelopathies” are associated with a wide phenotypic and genotypic spectrum as one gene is often associated with different phenotypes and variants in several genes might result in the same epilepsy phenotype (McTague, Howell, Cross, Kurian, & Scheffer, 2016; Wei et al., 2017). In particular, gene-related potassium channel dysfunction causes a clinical spectrum of DEEs including epilepsy of infancy with migrating focal seizures (*KCNT1*), early-onset DEEs with suppression-burst (*KCNQ2*), and nonspecific DEEs (e.g., *KCNA2*, *KCND2*, *KCND3*, *KCNH5*, *KCNJ2*, *KCNJ10*, *KCNMA1*, *KCNQ3*, *KCNQ5*, *KCNT2*, and *KCNV2*; Ambrosini et al., 2014; Barcia et al., 2012; Gururaj et al., 2017; Jorge et al., 2011; Lee, Lin, Kornblum, Papazian, & Nelson, 2014; Lehman et al., 2017; Pena & Coimbra, 2015; Sicca et al., 2011; Soldovieri et al., 2014; Tabarki, AlMajhad, AlHashem, Shaheen, & Alkuraya, 2016; Veeramah et al., 2013; Wang et al., 2019; Weckhuysen et al., 2012).

Torkamani et al. (2014) identified de novo variants in the potassium voltage-gated channel subfamily B member 1 (*KCNB1*) in three sporadic patients affected by early-onset DEE. This study provided the initial evidence of the deleterious effect of variants p.Ser347Arg, p.Thr374Ile, and p.Gly379Arg on *KCNB1* function. Following the initial identification of *KCNB1* variants (Torkamani et al., 2014), 29 new *KCNB1* variants have been reported in 37 patients detected through next-generation high-throughput sequencing in cohorts of individuals with developmental delay and/or DEE (Allen et al., 2016; Fitzgerald et al., 2015; Saito et al., 2015; Soden et al., 2014; Srivastava et al., 2014; Thiffault et al., 2015; Torkamani et al., 2014; Calhoun, Vanoye, Kok, George, & Kearney, 2017; de Kovel et al., 2016, 2017; Latypova et al., 2017; Marini et al., 2017; Miao, Peng, Chen, Gai, & Yin, 2018, 2018; Parrini et al., 2017; Samanta, 2018; Zhu et al., 2017). The majority of these patients had epilepsy, intellectual disability, and behavioral problems (MIM# 616056; epileptic encephalopathy, early infantile, 26).

In this mutation update, we aim to present an exhaustive review of patients carrying *KCNB1* variants and discuss the evidence for the pathophysiological relevance of these variants. Furthermore, we expand the variant spectrum of *KCNB1* with the description of 27 new unrelated patients carrying 18 novel variants.

## 2 | STRUCTURE OF K<sub>v</sub>2.1 CHANNEL

*KCNB1* (MIM# 600397) is a potassium channel gene located on chromosome 20q13.3 and has a full-length transcript of 11.879 kb (NM\_004975) containing two exons. *KCNB1* protein is a 96-kDa core protein of 858 amino acids forming the  $\alpha$  subunit of the voltage-gated potassium channel subfamily 2 (K<sub>v</sub>2.1). K<sub>v</sub>2.1 channels are expressed across the central nervous system, especially in large clusters on the soma, proximal dendrites, and axonal initial segment of neurons (King,

Manning, & Trimmer, 2014; Trimmer, 1991). Like other voltage-gated potassium channels, they are composed of four  $\alpha$ -subunits surrounding the ion conduction pore. Each  $\alpha$ -subunit has six transmembrane helices (S1–S6) that include a voltage-sensing domain (S1–S4) and a pore domain (S5–P–S6). The voltage-sensor S4 helix contains a series of positively charged amino acids that senses the change in the membrane potential leading to channel opening and closing. The selectivity filter of the pore is formed by the TVGYG amino acids motif located in the re-entrant pore loop between S5 and S6. In addition, K<sub>v</sub>2.1 voltage-gated potassium channels have a N-terminal cytoplasmic region that modulates homotetramerization as well as heterotetramerization with other families of channel-forming subunits, such as the silent  $\alpha$ -subunits K<sub>v</sub>6 (*KCNG*), K<sub>v</sub>8 (*KCNV*), and K<sub>v</sub>9 (*KCNS*; Bocksteins et al., 2014; Hugnot et al., 1996; Salinas, Duprat, Heurteaux, Hugnot, & Lazdunski, 1997; Xu, Yu, Jan, Jan, & Li, 1995). Although the functional role of the intracellular C-terminal domain is yet not fully understood, it mediates the restricted and clustered proximal localization of K<sub>v</sub>2.1 channel (Lim, Antonucci, Scannevin, & Trimmer, 2000) and interacts with the N-terminal domain to regulate intracellular trafficking, surface expression, voltage-dependent activation gating, and phosphorylation-dependent modulation of the K<sub>v</sub>2.1 channel (Ju, Stevens, Leadbitter, & Wray, 2003; Mohapatra, Siino, & Trimmer, 2008). Homotetrameric K<sub>v</sub>2.1 channels mediate a delayed-rectifier voltage-dependent outward potassium current which is essential for membrane repolarization during high-frequency firing. Functional properties of heterotetrameric channels are more complex, depending on the channel subunit composition (Ottshytsch, Raes, van Hoorick, & Snyders, 2002; Sano et al., 2002).

## 3 | IDENTIFICATION OF KCNB1 VARIANTS

The database Pubmed was used to search *KCNB1* pathogenic variants by combining the terms “*KCNB1*” and “variants” or “mutations”. Articles were reviewed and crossed with *KCNB1* variants listed in professional databases (Human Gene Mutation Database [HGMD], Biobase, and Qiagen). We excluded one patient without Sanger confirmation of de novo inheritance and insufficient clinical data available to validate the variant pathogenicity (Zhu et al., 2017).

We collected 27 new unrelated patients with *KCNB1* pathogenic variants through the French reference network for rare epilepsies and international collaborations (Belgium, Italy, Luxembourg, New Zealand, and Australia). *KCNB1* variants were detected by targeted next-generation sequencing panels for either epilepsy or intellectual disability ( $n = 16$ ) or by whole-exome sequencing ( $n = 11$ ), we classified variants according to the international guidelines of the American College of Medical Genetics (ACMG) Laboratory Practice Committee Working Group (Richards et al., 2015; Table S1). Single-nucleotide variants were confirmed by Sanger sequencing and segregation analysis was completed in each family. In silico predictions supporting evidence of pathogenicity for missense variants reported in our 27 new patients are detailed in Table S2. *KCNB1* variants were described according to HGVS variant

nomenclature guidelines (<http://varnomen.hgvs.org/>; Dunnen et al., 2016), using the reference sequence RefSeq NM\_004975.2. Variants have been submitted to ClinVar database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Clinical and EEG data were obtained for all patients, including developmental, neurological, behavioral, and epilepsy history, EEG, and imaging data when available. All parents or legal guardians gave written informed consent for genetic diagnosis procedures and research participation according to the ethics committee of each institution.

#### 4 | VARIANT SPECTRUM

We identified 29 pathogenic variants from 37 unrelated patients reported in the literature (Allen et al., 2016; Calhoun et al., 2017; de Kovel et al., 2016, 2017; Fitzgerald et al., 2015; Latypova et al., 2017; Marini et al., 2017; Miao et al., 2017, 2018; Parrini et al., 2017; Saitsu et al., 2015; Samanta, 2018; Soden et al., 2014; Srivastava et al., 2014; Thiffault et al., 2015; Torkamani et al., 2014).

In our cohort of 27 unrelated patients, we found 25 distinct *KCNB1* variants including 18 novel variants (Table 1). All patients carried heterozygous missense or truncating variants, arising de novo in 24/27 patients. We report the first inherited variant (p.Arg583\*) in Patient 64 and his mother affected by intellectual disability without epilepsy. Study of the maternal grandparents showed that the variant occurred de novo in the proband's mother who carried the variation at the heterozygous state. Segregation could not be completed in both parents for the remaining two variants to confirm their de novo occurrence (Patients 51 and 58), but both were considered pathogenic. The p.Gly395Arg variant in Patient 51 was identified as a de novo variant in Patient 50 in this series. The p.Phe416Leu variant in Patient 58 has been previously reported as likely pathogenic in two patients (Allen et al., 2016; Patient 8; de Kovel et al., 2016; ID-2010D05815).

Overall, including our data and those of the literature, we reviewed data of 47 distinct pathogenic variants identified in 64 unrelated patients (Table 1 and Figure 1). All variants except one were in exon 2. They included 37 missense variants (37/47; 79%), eight nonsense variants (8/47; 17%), and two frameshift variants (2/47; 4%). Ten variants were recurrent.

Most variants (42/47, 89%) were located in the S1 to S6 transmembrane segments of the protein. The K<sup>+</sup> selectivity filter located between the S5 and S6 transmembrane segments (amino acid 377–381) had eight distinct missense variants, including three novel variants in our series. Three were at amino acid position 378 (p.Val378Ala; p.Val378Phe; p.Val378Leu), representing a potential variant hotspot. Two recurrent variants affected the voltage sensor domain. The p.Arg306Cys was found in four patients (Patients 12–15) and the p.Arg312His was found in five patients (Patients 17–21). A different amino acid change at this position, p.Arg312Cys, was also found in one patient (Patient 16). Six recurrent variants were localized in the pore domain of the protein (S5–S6). Two were in the S5 transmembrane segment, each one found in two patients

(p.Ser347Arg, Patients 26 and 27; p.Val349Phe, Patients 28 and 29). The p.Val349Phe variant found in Patient 29 resulted from somatic mosaicism (Marini et al., 2017). Three recurrent variants were located in the S6 transmembrane segment. The p.Phe416Leu variant was found in three patients (Patients 56–58), whereas the p.Gly395Arg and p.Gly401Arg variants were found in two patients each (Patients 50, 51, and 53, 54).

Patient 1 had a *KCNB1* variant in the exon 1, affecting the cytoplasmic N-terminal region (p.Glu43Gly). The highly conserved N-terminal domain is a critical determinant for subunit self-association into tetrameric channels and the p.Glu43Gly variant was thus predicted to be damaging (Xu et al., 1995). This patient also carried a de novo variant in *GABRA5* gene (MIM# 137142, p.Thr301Met), which encodes the  $\alpha 5$  subunit of the gamma-aminobutyric acid type-A (GABA<sub>A</sub>) receptor. Recently, Butler et al. (2018) provided functional evidence of the pathogenic effect of a nearby *GABRA5* variant (p.Val294Leu) in a patient with severe DEE. Therefore, both variants were considered to be contributing to the patient's phenotype.

All variants located within the intracellular C-terminal domain of the protein were truncating. The non-sense variant p.Arg583\* was found in 3 unrelated patients (Patients 62–64; inherited from the mother in Patient 64). Two other nonsense variants were in the pore helix between S5 and S6 (p.Trp369\*; p.Trp370\*). The last four truncating variants were in the linkers: S1–S2 linker (p.Gln228\*), S3–S4 linker (p.Val286Glyfs\*58), S4–S5 linker (p.Tyr328\*), and S5–S6 linker (p.Ser363Thrfs\*13).

#### 5 | FUNCTIONAL RELEVANCE AND CHARACTERIZATION OF *KCNB1* VARIANTS

To date, seven *KCNB1* missense variants have been functionally characterized using different cellular models (Calhoun et al., 2017; Saitsu et al., 2015; Thiffault et al., 2015; Torkamani et al., 2014). Distinct functional effects have been described among studies. The p.Ile199Phe variant, located in the S1 transmembrane segment of the voltage-sensing domain, reduces channel availability due to shift in the voltage dependence of activation compared to the wild-type (WT) channel (Calhoun et al., 2017). A variant in the voltage sensor domain S4, p.Arg306Cys, induces currents similar to those in the WT channel but disrupts sensitivity and cooperativity of the sensor whereas the p.Gly401Arg variant, located in the pore domain S6, has a dominant-negative effect on WT channels and abolishes endogenous currents (Saitsu et al., 2015). Both variants inhibit repetitive neuronal firing by preventing the production of sufficiently deep interspike voltages (Saitsu et al., 2015). Other *KCNB1* variants affecting the pore domain result in loss of ion selectivity and gain of inward cation conductance of K<sub>v</sub>2.1 channels (Thiffault et al., 2015; Torkamani et al., 2014). Since these mutants also induce reduced current density at more depolarized voltages, they were predicted to result in depolarized resting membrane potential and impaired membrane repolarization leading to increased cellular excitability

**TABLE 1** KCNB1 genotype and clinical features of patients in our cohort and the literature

Patient ID	Nucleotide change	Amino acid change	Protein effect	Inheritance	Age (years)/ Gender		DD	Walk	Verbal skills	Behavioral disorders	Epilepsy/Age at seizure onset (months)	References
					De novo	De novo						
1	c.128A>G	p.Glu43Gly <sup>a</sup>	Missense	De novo	29/M	Yes	Yes	Nonverbal	No	Yes/16	This study	
2	c.586A>T	p.Ile196Phe	Missense	De novo	12/F	Yes	NA	Nonverbal	Yes	Yes/18	Marini et al. (2017; ID-4)	
3	c.595A>T	p.Ile199Phe domain of the protein	Missense	De novo	NA/M	Yes	NA	NA	Yes	Yes/NA	Calhoun, Vanoye, Kok, George, and Kearney (2017)	
4	c.605C>T	p.Ser202Phe	Missense	De novo	7/M	Yes	Yes	Sentences	Yes	Yes/24	de Kovel et al. (2017; Patient 26)	
5	c.629C>G	p.Thr210Arg	Missense	De novo	11/M	Yes	Yes	Words	Yes	Yes/48	This study	
6	c.629C>T	p.Thr210Met	Missense	De novo	4/F	NA	NA	NA	NA	No	de Kovel et al. (2017; Patient 24)	
7	c.629C>T	p.Thr210Met	Missense	De novo	8/F	Yes	NA	Nonverbal	Yes	Yes/12	Marini et al. (2017; ID-5)	
8	c.629C>A	p.Thr210Lys	Missense	De novo	7/M	Yes	Yes	Sentences	Yes	Yes/4	de Kovel et al. (2017; Patient 25)	
9	c.632T>C	p.Leu211Pro	Missense	De novo	7/F	Yes	NA	NA	No	Yes/11	de Kovel et al. (2017; Patient 23)	
10	c.682C>T	p.Gln228 <sup>*</sup>	Nonsense	De novo	3.5/F	Yes	Yes	NA	Yes	Yes/10	de Kovel et al. (2017; Patient 22)	
11	c.857del	p.Val286Glyfs*58	Frameshift	De novo	2/M	Yes	Yes	Sentences	No	Yes/5	This study	
12	c.916C>T	p.Arg306Cys	Missense	De novo	8/F	Yes	Yes	Sentences	Yes	Yes/48	This study	
13	c.916C>T	p.Arg306Cys	Missense	De novo	22/F	Yes	Yes	Sentences	No	Yes/6	Marini et al. (2017; ID-3)	
14	c.916C>T	p.Arg306Cys	Missense	De novo	7/M	Yes	Yes	Words	Yes	Yes/12	Saito et al. (2015; Patient 2) and de Kovel et al. (2017; Patient 20)	
15	c.916C>T	p.Arg306Cys	Missense	De novo	9/M	Yes	NA	NA	Yes	Yes/12	de Kovel et al. (2017; Patient 21)	
16	c.934C>T	p.Arg312Cys	Missense	De novo	23/M	Yes	Yes	Words	Yes	No	This study	
17	c.935G>A	p.Arg312His	Missense	De novo	9/M	Yes	Yes	Nonverbal	Yes	Yes/10	de Kovel et al. (2017; Patient 19)	
18	c.935G>A	p.Arg312His	Missense	De novo	1.2/F	Yes	No	Nonverbal	NA	Yes/14	Samanta (2018)	
19	c.935G>A	p.Arg312His	Missense	NA	11/M	Yes	No	Nonverbal	Yes	Yes/14	de Kovel et al. (2016; ID-KIEL20) and de Kovel et al. (2017; Patient 18)	
20	c.935G>A	p.Arg312His	Missense	De novo	33/M	Yes	Yes	Nonverbal	Yes	Yes/18	This study	
21	c.935G>A	p.Arg312His	Missense	De novo	13/M	Yes	Yes	Nonverbal	Yes	Yes/60	This study	
22	c.968C>T	p.Thr323Ile	Missense	De novo	3/M	Yes	Yes	Nonverbal	Yes	Yes/21	This study	
23	c.984C>G	p.Tyr328 <sup>*</sup>	Nonsense	De novo	4.5/ F	Yes	Yes	Words	Yes	Yes/7	This study	
24	c.990G>C	p.Glu330Asp	Missense	De novo	3.6/F	Yes	NA	NA	NA	Yes/18	Miao et al. (2018)	
25	c.1001T>C	p.Ile334Pro	Missense	De novo	5/F	Yes	No	Nonverbal	Yes	Yes/24	This study	
26	c.1041C>G	p.Ser347Arg	Missense	De novo	10/M	Yes	Yes	Sentences	Yes	Yes/18	This study	
27	c.1041C>A	p.Ser347Arg	Missense	De novo	9/F	Yes	Yes	NA	NA	Yes/48	Torkamani et al. (2014; ID-9) and de Kovel et al. (2017; Patient 17)	
28	c.1045G>T	p.Val349Phe	Missense	De novo	1.6/F	Yes	No	Nonverbal	Yes	Yes/9	This study	

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Patient ID	Nucleotide change	Amino acid change	Protein effect	Inheritance	Age (years)/ Gender	DD	Walk	Verbal skills	Behavioral disorders	Epilepsy/Age at seizure onset (months)	References
29	c.1045G>T	p.Val349Phe	Missense	De novo	17/M	Yes	NA	Words	Yes	Yes/11	Marini et al. (2017; ID-6)
30	c.1088delG	p.Ser363Thrfs*13	Frameshift	De novo	2/M	Yes	NA	Nonverbal	No	Yes/14	de Kovel et al. (2017; Patient 16)
31	c.1105T>C	p.Trp369Arg	Missense	De novo	14/M	Yes	No	Nonverbal	Yes	Yes/10	This study
32	c.1107G>A	p.Trp369*	Nonsense	De novo	5/M	Yes	NA	NA	Yes	Yes/18	de Kovel et al. (2017; Patient 15)
33	c.1109G>A	p.Trp370*	Nonsense	De novo	7/M	Yes	NA	Words	No	Yes/9	Parrini et al. (2017) and Marini et al. (2017; ID-1)
34	c.1115C>T	p.Thr372Ile	Missense	De novo	8/M	Yes	Yes	Sentences	No	No	This study
35	c.1115C>A	p.Thr372Asn	Missense	De novo	12/F	Yes	Yes	Sentences	Yes	No	This study
36	c.1121C>T	p.Thr374Ile	Missense	De novo	5/F	Yes	NA	NA	NA	Yes/6	Allen et al. (2016; ND27062), Torkamani et al. (2014; Patient 3), and de Kovel et al. (2017; Patient 13)
37	c.1121C>T	p.Thr374Ile	Missense	De novo	11/F	Yes	With aids	Nonverbal	Yes	Yes/13	de Kovel et al. (2017; Patient 14)
38	c.1130C>A	p.Thr377Asn	Missense	De novo	2/M	Yes	No	Nonverbal	No	Yes/6	This study
39	c.1132G>C	p.Val378Leu	Missense	De novo	10/F	Yes	Yes	Words	Yes	No	Latypova et al. (2017)
40	c.1132G>T	p.Val378Phe	Missense	De novo	8/M	Yes	No	Nonverbal	NA	Yes/14	This study
41	c.1133T>C	p.Val378Ala	Missense	De novo	3/F	Yes	No	Nonverbal	NA	Yes/13	Soden et al. (2014), Thiffault et al. (2015), and de Kovel et al. (2017; Patient 12)
42	c.1135G>A	p.Gly379Arg	Missense	De novo	7/M	Yes	Yes	Nonverbal	Yes	Yes/8	Torkamani et al. (2014; Individual 2), Srivastava et al. (2014), and de Kovel et al. (2017; Patient 11)
43	c.1136G>T	p.Gly379Val	Missense	De novo	2/ND	Yes	NA	NA	NA	Yes/24	Miao et al. (2017)
44	c.1139A>G	p.Tyr380Cys	Missense	De novo	5.5/F	Yes	Yes	Words	No	Yes/6	This study
45	c.1141G>A	p.Gly381Arg	Missense	De novo	7/M	Yes	No	NA	NA	Yes/3	Allen et al. (2016; Patient 7) and de Kovel et al. (2017; Patient 10)
46	c.1144G>A	p.Asp382Asn	Missense	De novo	6/F	Yes	Yes	Nonverbal	No	Yes/8	This study
47	c.1153C>A	p.Pro385Thr	Missense	De novo	17/M	Yes	With aids	Nonverbal	Yes	Yes/13	de Kovel et al. (2017; Patient 9)
48	c.1173A>C	p.Lys391Asn	Missense	De novo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Fitzgerald et al. (2015) and de Kovel et al. (2017; Patient 8)
49	c.1180G>A	p.Gly394Arg	Missense	De novo	9/F	Yes	Yes	Nonverbal	Yes	Yes/3.5	This study
50	c.1183G>A	p.Gly395Arg	Missense	De novo	9.5/F	Yes	Yes	Nonverbal	Yes	Yes/12	This study
51	c.1183G>A	p.Gly395Arg	Missense	NA	14/M	Yes	No	Nonverbal	Yes	Yes/8	This study

(Continues)

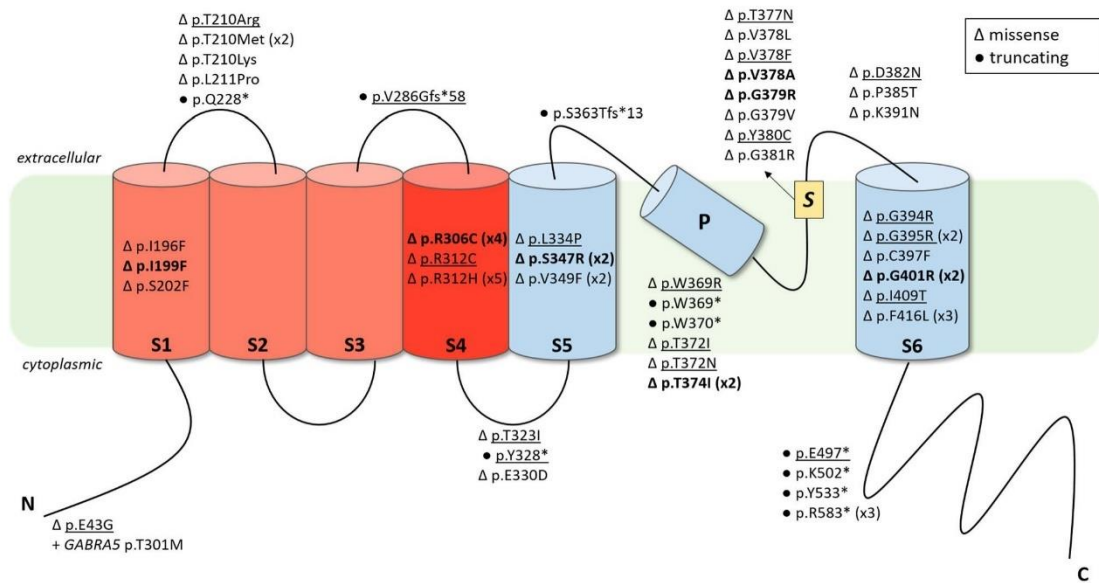
TABLE 1 (Continued)

Patient ID	Nucleotide change	Amino acid change	Protein effect	Inheritance	Age (years)/ Gender	DD	Walk	Verbal skills	Behavioral disorders	Epilepsy/Age at seizure onset (months)	References
52	c.1190G>T	p.Cys397Phe	Missense	De novo	22/M	Yes	NA	NA	NA	Yes/10	de Kovel et al. (2017; Patient 7)
53	c.1201G>A	p.Gly401Arg	Missense	De novo	4/M	Yes	No	Nonverbal	NA	Yes/17	Saitou et al. (2015; Patient 1) and de Kovel et al. (2017; Patient 6)
54	c.1201G>A	p.Gly401Arg	Missense	De novo	9/M	Yes	No	Nonverbal	NA	Yes/8	This study
55	c.1222T>C	p.Ile409Thr	Missense	De novo	8/M	Yes	Yes	Sentences	Yes	No	This study
56	c.1248C>G	p.Phe416Leu	Missense	De novo	15/F	Yes	NA	NA	Yes	Yes/14	Allen et al. (2016; Patient 8) and de Kovel et al. (2017; Patient 5)
57	c.1248C>G	p.Phe416Leu	Missense	De novo	18/F	Yes	NA	NA	NA	Yes/42	de Kovel et al. (2016; ID-2010D005815) and de Kovel et al. (2017; Patient 4)
58	c.1248C>A	p.Phe416Leu	Missense	NA	14/F	Yes	Yes	Nonverbal	No	Yes/10 days	This study
59	c.1489G>T	p.Glu497*	Nonsense	De novo	20/M	Yes	Yes	Sentences	Yes	No	This study
60	c.1503dup	p.Lys502*	Nonsense	De novo	10/M	Yes	NA	NA	Yes	No	Fitzgerald et al. (2015) and de Kovel et al. (2017; Patient 3)
61	c.1599C>A	p.Tyr533*	Nonsense	De novo	32/M	Yes	Yes	NA	NA	Yes/5	de Kovel et al. (2016; ID-EP1852) and de Kovel et al. (2017; Patient 2)
62	c.1747C>T	p.Arg583*	Nonsense	De novo	8/F	Yes	NA	Nonverbal	No	Yes/5	Marini et al. (2017; ID-2)
63	c.1747C>T	p.Arg583*	Nonsense	De novo	11/F	Yes	Yes	Sentences	Yes	No	de Kovel et al. (2017; Patient 1)
64	c.1747C>T	p.Arg583*	Nonsense	Maternal	12/F	Yes	Yes	Nonverbal	Yes	No	This study

Note: Numbering is according to the complementary DNA sequence (RefSeq NM\_004975.2). Novel mutations are indicated in bold.

Abbreviation: NA, not available.

\*This patient also carries a de novo variant in GABRA5 (NM\_000810:c.902C>T, p.Thr301Met).



**FIGURE 1** Schematic representation of  $K_v2.1$  protein structure and location of *KCNB1* previously described and novel variants. Variants are displayed as changes at protein level (p). Underlined variants correspond to novel variants reported for the first time in this report. For recurrent variants, the number of reported patients is indicated between parentheses next to the variant. Triangles and black circles respectively indicate missense variants and truncating variants (frameshift or nonsense variants). Variants, where functional studies have been previously conducted, are indicated in bold. Functional domains are represented by N: N-terminal domain (residues 1–186), S1: Segment S1 (residues 187–208), S2: Segment S2 (residues 229–250), S3: Segment S3 (residues 260–280), S4: Segment S4 (residues 295–316), S5: Segment S5 (residues 331–351), P: pore helix (residues 365–376), S: Selectivity filter (residues 377–381), S6: Segment S6 (residues 392–420), C: C-terminal domain (residues 421–858)

(Torkamani et al., 2014). Changes in channel expression and localization were also suggested to contribute to the pathophysiology of  $K_v2.1$  pore variants (Thiffault et al., 2015). Therefore, given the biophysical properties of these pathogenic variants on  $K_v2.1$ , they should be considered as loss-of-function rather than gain-of-function.

Finally, delayed-rectifier potassium current is diminished in hippocampal neurons cultured from *Kcnb1*<sup>-/-</sup> ( $K_v2.1$ <sup>-/-</sup>) mice (Specca et al., 2014). Interestingly, mice lacking  $K_v2.1$  have no spontaneous seizures but display increased seizure susceptibility in response to proconvulsant drugs and exhibit a range of behavioral disorders associated with marked hyperactivity (Specca et al., 2014).

## 6 | EXPANDING THE PHENOTYPIC SPECTRUM OF *KCNB1* VARIANTS

The cohort of 64 patients included 34 males and 28 females (sex ratio M/F 1.2; data available for  $n = 62/64$ ) with pathogenic *KCNB1* variants, aged from 1.2 to 33 years (median age at study, 8 years; data available for  $n = 62/64$ ).

We report here six new patients aged from 8 to 23 years who did not develop seizures (Patients 16, 34, 35, 55, 59, 64).

Overall, 53/63 patients (85%) developed epilepsy with a median age at seizure onset of 12 months (range: 10 days–5 years; mean, 15 months; data available for  $n = 52/53$ ). All patients had developmental delay before

seizure onset. Thirty-seven patients (70%) exhibited several seizure types during follow-up, including generalized tonic-clonic seizures ( $n = 28$ ), focal seizures ( $n = 24$ ), epileptic spasms ( $n = 21$ ), tonic seizures ( $n = 14$ ), myoclonic seizures ( $n = 14$ ), atypical absences ( $n = 13$ ), atonic seizures ( $n = 9$ ), and clonic seizures ( $n = 5$ ). Nine patients (18%) developed only epileptic spasms at a mean age of 12 months (range, 5–21 months), consistent with the syndrome of infantile spasms (Pavone, Striano, Falsaperla, Pavone, & Ruggieri, 2014). Behavioral issues occurred in 37/49 patients with available data (76%), including autism spectrum disorder in 26 (53%), aggression in 20 (41%), and hyperactivity in 12 (24%).

Developmental delay was reported in all patients with available data ( $n = 62/64$ ). A severe expressive language disorder was found in all 42 patients aged 3 years or older in whom some language data was available. Twenty-four patients (57%) were nonverbal whereas the remaining were able to speak some words or short sentences. Data on ambulation was available for 43 out of 61 patients aged 2 years or older. Thirty-one patients (72%) achieved independent walking. Two patients (5%) aged 11 and 17 years walked with assistance and 10 patients (23%) were nonambulatory. The median age of walking reported for 22/31 patients was 24 months (range, 18–54 months). Neurological examination data were available for 52 patients. Hypotonia was the most frequently reported sign ( $n = 25/52$ , 48%), followed by spasticity ( $n = 11$ , 21%), ataxia ( $n = 10$ , 19%), extrapyramidal symptoms including dystonia and choreiform movements ( $n = 8$ , 15%) and hyperlaxity ( $n = 8$ , 15%).



Electroencephalographic (EEG) data were available for 51 patients with epilepsy. EEG recordings were characterized by slow background activity, with a combination of multifocal ( $n = 30$ ), focal ( $n = 12$ ) or generalized spikes and/or spikes and waves ( $n = 23$ ). Hypsarrhythmia was reported in eight children. Sleep activation of EEG abnormalities was found in 13 patients and photosensitivity in four patients. Thirty-eight patients (72%) had pharmacoresistant epilepsy, whereas 13 patients (26%) responded to antiepileptic drugs. In particular, six out of nine patients who developed only infantile spasms became seizure-free with treatment.

Data on brain magnetic resonance imaging (MRI) was available for 54/64 patients. MRI was normal in 42 of the patients carrying *KCNB1* variants (78%). One patient had a normal computed tomography scan. Mild atrophy was reported in seven patients and documented as progressive by serial MRIs in three of them (Patients 47, 53, and 54). Nonspecific periventricular white matter abnormalities were reported in two patients (Patients 37 and 52). One patient had two areas of focal cortical dysplasia associated with focal seizures, multifocal spikes on EEG and responded to carbamazepine (Patient 4). Another patient had small bilateral periventricular heterotopias (Patient 34).

## 7 | GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATION

Patients with *KCNB1* variants have a wide phenotypic spectrum including intellectual disability, behavioral disorders, and frequent epilepsy. We examined whether the localization or the type of variant correlated with the phenotype.

We reported the first pathogenic variant in the N-terminal domain in a patient who have a DEE with early developmental delay and a seizure onset at 16 months, evolving into severe cognitive impairment and intractable focal and generalized seizures (Patient 1). Interestingly, a pathogenic variant in *GABRA5* was also identified in this patient, located in the pore-forming M2 transmembrane domain of the GABA receptor (p.Thr301Met). A nearby pathogenic *GABRA5* variant (p.Val294Leu) was reported in a patient with severe developmental delay who differs from our patient as that patient had earlier seizure onset, autistic behavior and spastic quadriplegia (Butler et al., 2018). As both variants (*KCNB1* and *GABRA5*) were predicted to be damaging, a double hit mechanism may be responsible for our patient's phenotype.

In a previous review of 26 patients with a *KCNB1* variant, missense variants in the voltage sensor domain or the pore region of the protein were thought to correlate with a more severe phenotype of epilepsy and global developmental delay (de Kovel et al., 2017). Our results show that nonambulatory patients were more frequent in those with a variant in the S4 to S6 crucial domains ( $n = 10/31$ ) compared with those with a variant in other regions of the protein ( $n = 0/10$ ;  $p = .048$ , unilateral Fisher's exact test). However, there was no significant difference in terms of epilepsy severity, language acquisition or behavioral issues. In particular, we report here four new variants in the S4 to S6 domains in

patients with no epilepsy and a moderate developmental delay (Patients 16, 34, 35, and 55). These findings do not support a clear correlation of mutations in these domains to the most severe phenotype (de Kovel et al., 2017). The epilepsy phenotype was highly variable, as illustrated in patients carrying the same variant. For instance, the recurrent variant p.Arg312His in the voltage sensor domain was associated with infantile spasms (Patients 17 and 18), infantile-onset focal seizures (Patient 19), pharmacoresponsive late-onset focal seizures (Patient 21), and intractable generalized seizures (Patient 20). In addition, a patient carrying a different amino acid change at the same position (p.Arg312Cys, Patient 16) did not develop epilepsy but had a developmental encephalopathy with intellectual disability and behavioral issues. Therefore, no genotype-phenotype correlations can be established based on the localization of the missense variants on the protein domains and more experimental studies are needed to understand the underlying pathophysiology of this phenotype heterogeneity.

Interestingly, all four variants found in the C-terminal part of the protein were truncating. Though these patients had severe developmental delay and behavioral disorders, four out of six did not develop seizures (Patients 59, 60, 63, and 64) and both patients that developed epilepsy had pharmacoresponsive infantile spasms syndrome (Patients 61). As all these truncating variants occur within the last exon, they are not anticipated to result in a nonsense-mediated messenger RNA (mRNA) decay but rather to produce a truncated protein with a potential dominant-negative effect on channel function (Khajavi, Inoue, & Lupski, 2006). C-terminal truncation of  $K_v2.1$  channel has been shown to impact surface expression, voltage-dependent gating function, and phosphorylation-dependent modulation of the channel (Jensen et al., 2017; Mohapatra et al., 2008). Truncated  $K_v2.1$  channel could thus impact trafficking of tetrameric  $K_v2.1$  channel to the cell membrane leading to functional consequences on channel properties, as demonstrated in few other channelopathies (Aizawa et al., 2004; Duarri et al., 2015; Mezghrani et al., 2008; Puckerin et al., 2016). Other truncating variants were also in the last exon of the gene but located upstream the C-terminal domain, either in extracellular loops or in the pore helix, with no obvious phenotypic difference compared to missense variants. We speculate that they may also escape nonsense-mediated mRNA decay and result in either a nonfunctional or even deleterious truncated protein missing vital channel domains. Indeed, most functionally studied missense variants displayed a range of dominant-negative effects (Calhoun et al., 2017; Saitsu et al., 2015; Thiffault et al., 2015; Torkamani et al., 2014) that might thus represent the main underlying pathogenic mechanism of *KCNB1* variants, as for some other potassium channelopathies-related DEE (Jorge et al., 2011; Masnada et al., 2017; Orhan et al., 2014; Smets et al., 2015). The phenotype severity might be related to the extent of mutation-induced functional  $K_v2.1$  channel impairment, in addition to other (genetic or environmental) modulating factors that could interact with the mutation during development shaping the phenotype. More electrophysiological studies and animal models are now needed to confirm the pathogenic mechanism of truncating *KCNB1* variants.

## 8 | CLINICAL AND DIAGNOSTIC RELEVANCE

Even though targeted therapy is not yet available for *KCNB1* encephalopathies, genetic diagnosis is important in clinical practice to stop unnecessary diagnostic tests, to correctly inform parents about prognosis and allow accurate genetic counseling.

All the *KCNB1* variants identified occurred de novo except in one patient who inherited her p.Arg583\* variant from her affected mother. Her mother had an intellectual disability with delayed language skills, no reading and writing abilities but could live independently. She did not develop epilepsy. Her 12-year-old daughter did not have seizures but had a severe neurodevelopmental disorder with no language acquisition, autism spectrum disorder and behavioral disorders. We thus report the first inherited *KCNB1* variant, associated with intrafamilial variable expressivity. This observation that individuals harboring a *KCNB1* variant with a "less-severe" phenotype can transmit a severe disease is important for accurate interpretation of inherited variants, prenatal diagnosis, and genetic counseling.

In addition, Patient 1 carrying *KCNB1* and *GABRA5* variants suggests the co-occurrence of two deleterious variants in the same patient. This 30-year-old patient had a severe phenotype of DEE with social withdrawal, no language acquisition, and daily seizures. Additional data from exome and genome studies will enable us to better understand such double hit genotypes and will help in genetic counseling. In some patients, seizure frequency attenuates and disappears over time with prolonged periods of remission and the possibility of withdrawn antiepileptic drugs (Marini et al., 2017). In this study, we also reported six new patients without epilepsy, further strengthening the importance of *KCNB1* in neurodevelopmental disorders, beyond DEEs.

## 9 | CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

We review the clinical and molecular spectrum of patients with *KCNB1* variants through the description of 18 unreported pathogenic variants in 27 new unrelated patients and an exhaustive review of the literature increasing the number of patients to 64 and of pathogenic variants to 47. *KCNB1* encephalopathies encompass a wide spectrum of neurodevelopmental disorders, including early-onset global developmental delay with predominant language difficulties and behavioral impairment. Epilepsy is frequent, including the DEEs, but syndrome type and prognosis are variable. Identification of new patients is thus important to fully delineate the phenotypic spectrum of *KCNB1* dysfunction. Most variants occur de novo and mainly consist of missense variants with some hotspots located in the voltage sensor and the pore domain of the protein. Few truncating variants are reported with one hotspot in the C-terminal domain associated without epilepsy or with a mild epilepsy. However, available data do not inform further genotype–phenotype correlations, especially in terms of neurodevelopmental outcome. The variety of reported functional effects might contribute to the heterogeneous phenotype. Potential modulation by coexisting pathogenic variants in other genes is

likely to be another modifier of the phenotype. Beyond the variant effects on ion currents, new animal models reproducing *KCNB1* variants are needed to explore more accurately the associated pathophysiological mechanisms of disrupted neurodevelopmental pathways and to develop targeted therapies.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the association "KCNB1 France" as well as patients and their families for their participation in this study. This study was supported by State funding from the Agence Nationale de la Recherche under "Investissements d'avenir" program (ANR-10-IAHU-01) and the Fondation Bettencourt Schueller (C. B. and R. N.), the ERC Consolidator Grant (E. K.), the Curekids New Zealand and the Health Research Council of New Zealand (L. S. and I. E. S.), the National Health and Medical Research Council of Australia (I. E. S.), the European Commission Seventh Framework Programme under the project DESIRE (Grant agreement No. 602531, R. G.).

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

## ORCID

Claire Bar  <http://orcid.org/0000-0003-1489-0211>

Rima Nabbout  <http://orcid.org/0000-0001-5877-4074>

## REFERENCES

- Aizawa, Y., Ueda, K., Wu, L., Inagaki, N., Hayashi, T., Takahashi, M., ... Hiraoka, M. (2004). Truncated KCNQ1 mutant, A178fs/105, forms hetero-multimer channel with wild-type causing a dominant-negative suppression due to trafficking defect. *FEBS Letters*, 574, 145–150.
- Allen, N. M., Conroy, J., Shahwan, A., Lynch, B., Correa, R. G., Pena, S. D. J., ... King, M. D. (2016). Unexplained early onset epileptic encephalopathy: Exome screening and phenotype expansion. *Epilepsia*, 57, e12–e17.
- Ambrosini, E., Sicca, F., Brignone, M. S., D'Adamo, M. C., Napolitano, C., Servettini, I., ... Pessia, M. (2014). Genetically induced dysfunctions of Kir2.1 channels: Implications for short QT3 syndrome and autism-epilepsy phenotype. *Human Molecular Genetics*, 23, 4875–4886.
- Barcia, G., Fleming, M. R., Deligniere, A., Gazula, V.-R., Brown, M. R., Langouet, M., ... Nabbout, R. (2012). De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nature Genetics*, 44, 1255–1259.
- Bocksteins, E., Mayeur, E., van Tilborg, A., Regnier, G., Timmermans, J.-P., & Snyders, D. J. (2014). The subfamily-specific interaction between Kv2.1 and Kv6.4 subunits is determined by interactions between the N- and C-termini. *PLoS One*, 9, e98960.
- Butler, K. M., Moody, O. A., Schuler, E., Coryell, J., Alexander, J. J., Jenkins, A., & Escayg, A. (2018). De novo variants in *GABRA2* and

- GABRA5 alter receptor function and contribute to early-onset epilepsy. *Brain*, 141, 2392–2405.
- Calhoun, J. D., Vanoye, C. G., Kok, F., George, A. L., & Kearney, J. A. (2017). Characterization of a KCNB1 variant associated with autism, intellectual disability, and epilepsy. *Neurology: Genetics*, 3, e198.
- Duarri, A., Lin, M.-C. A., Fokkens, M. R., Meijer, M., Smeets, C. J. L. M., Nibbeling, E. A. R., ... Verbeek, D. S. (2015). Spinocerebellar ataxia type 19/22 mutations alter heterocomplex Kv4.3 channel function and gating in a dominant manner. *Cellular and Molecular Life Science*, 72, 3387–3399.
- den Dunnen, J. T., Dalgleish, R., Maglott, D. R., Hart, R. K., Greenblatt, M. S., McGowan-Jordan, J., ... Taschner, P. E. M. (2016). HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Human Mutation*, 37, 564–569.
- Fitzgerald, T., Gerety, S., Jones, W., Kogelenberg, M., van King, D., McRae, J., ... Bayzatinova, T. (2015). Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature*, 519, 223–228.
- Gururaj, S., Palmer, E. E., Sheehan, G. D., Kandula, T., Macintosh, R., Ying, K., ... Bhattacharjee, A. (2017). A de novo mutation in the sodium-activated potassium channel subunit with specific inhibitory properties towards Shab and Shaw channels. *The EMBO Journal*, 15, 3322–3331.
- Jensen, C. S., Watanabe, S., Stas, J. I., Klaphaak, J., Yamane, A., Schmitt, N., ... Misonou, H. (2017). Trafficking of Kv2.1 channels to the axon initial segment by a novel nonconventional secretory pathway. *Journal of Neuroscience*, 37, 11523–11536.
- Jorge, B. S., Campbell, C. M., Miller, A. R., Rutter, E. D., Gurnett, C. A., Vanoye, C. G., ... Kearney, J. A. (2011). Voltage-gated potassium channel KCNV2 (Kv8.2) contributes to epilepsy susceptibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 5443–5448.
- Ju, M., Stevens, L., Leadbitter, E., & Wray, D. (2003). The roles of N- and C-terminal determinants in the activation of the Kv2.1 potassium channel. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 12769–12778.
- Khajavi, M., Inoue, K., & Lupski, J. R. (2006). Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *European Journal of Human Genetics*, 14, 1074–1081.
- King, A. N., Manning, C. F., & Trimmer, J. S. (2014). A unique ion channel clustering domain on the axon initial segment of mammalian neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 522, 2594–2608.
- de Kovel, C. G. F., Brilstra, E. H., van Kempen, M. J. A., van't Slot, R., Nijman, I. J., Afawi, Z., ... Koeleman, B. P. C. (2016). Targeted sequencing of 351 candidate genes for epileptic encephalopathy in a large cohort of patients. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 4, 568–580.
- de Kovel, C. G. F., Syrbe, S., Brilstra, E. H., Verbeek, N., Kerr, B., Dubbs, H., ... Koeleman, B. P. C. (2017). Neurodevelopmental disorders caused by de novo variants in KCNB1 genotypes and phenotypes. *JAMA Neurol*, 74, 1228.
- Latypova, X., Matsumoto, N., Vineslas-Muller, C., Bézieau, S., Isidor, B., & Miyake, N. (2017). Novel KCNB1 mutation associated with non-syndromic intellectual disability. *Journal of Human Genetics*, 62, 569–573.
- Lee, H., Lin, M. A., Kornblum, H. I., Papazian, D. M., & Nelson, S. F. (2014). Exome sequencing identifies de novo gain of function missense mutation in KCND2 in identical twins with autism and seizures that slows potassium channel inactivation. *Human Molecular Genetics*, 23, 3481–3489.
- Lehman, A., Thouta, S., Mancini, G. M. S., Naidu, S., van Slegtenhorst, M., McWalter, K., ... Vercauteren, S. (2017). Loss-of-function and gain-of-function mutations in KCNQ5 cause intellectual disability or epileptic encephalopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 101, 65–74.
- Lim, S. T., Antonucci, D. E., Scannevin, R. H., & Trimmer, J. S. (2000). A novel targeting signal for proximal clustering of the Kv2.1 K<sup>+</sup> channel in hippocampal neurons. *Neuron*, 25, 385–397.
- Marini, C., Romoli, M., Parrini, E., Costa, C., Mei, D., Mari, F., ... Guerrini, R. (2017). Clinical features and outcome of 6 new patients carrying de novo KCNB1 gene mutations. *Neurology: Genetics*, 3, e206.
- Masnada, S., Hedrich, U. B. S., Gardella, E., Schubert, J., Kaiwar, C., Klee, E. W., ... Rubboli, G. (2017). Clinical spectrum and genotype-phenotype associations of KCNA2-related encephalopathies. *Brain*, 140, 2337–2354.
- McTague, A., Howell, K. B., Cross, J. H., Kurian, M. A., & Scheffer, I. E. (2016). The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *The Lancet Neurology*, 15, 304–316.
- Mezghrani, A., Monteil, A., Watschinger, K., Sinnegger-Brauns, M. J., Barrere, C., Bourinet, E., ... Lory, P. (2008). A destructive interaction mechanism accounts for dominant-negative effects of misfolded mutants of voltage-gated calcium channels. *Journal of Neuroscience*, 28, 4501–4511.
- Miao, P., Feng, J., Guo, Y., Wang, J., Xu, X., Wang, Y., ... Cheng, H. (2018). Genotype and phenotype analysis using an epilepsy-associated gene panel in Chinese pediatric epilepsy patients. *Clinical Genetics*, 94, 512–520.
- Miao, P., Peng, J., Chen, C., Gai, N., & Yin, F. (2017). A novel mutation in KCNB1 gene in a child with neuropsychiatric comorbidities with both intellectual disability and epilepsy and review of literature. *Zhonghua Er Ke Za Zhi. Chinese Journal of Pediatrics*, 55, 115–119.
- Mohapatra, D. P., Siino, D. F., & Trimmer, J. S. (2008). Interdomain cytoplasmic interactions govern the intracellular trafficking, gating, and modulation of the Kv2.1 channel. *Journal of Neuroscience*, 28, 4982–4994.
- Orhan, G., Bock, M., Schepers, D., Ilina, E. I., Reichel, S. N., Löffler, H., ... Maljevic, S. (2014). Dominant-negative effects of KCNQ2 mutations are associated with epileptic encephalopathy. *Annals of Neurology*, 75, 382–394.
- Ottshchytch, N., Raes, A., van Hoorick, D., & Snyder, D. J. (2002). Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel subunits identified in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 7986–7991.
- Parrini, E., Marini, C., Mei, D., Galuppi, A., Cellini, E., Pucatti, D., ... Guerrini, R. (2017). Diagnostic targeted resequencing in 349 patients with drug-resistant pediatric epilepsies identifies causative mutations in 30 different genes. *Human Mutation*, 38, 216–225.
- Pavone, P., Striano, P., Falsaperla, R., Pavone, L., & Ruggieri, M. (2014). Infantile spasms syndrome, West syndrome and related phenotypes: What we know in 2013. *Brain and Development*, 36, 739–751.
- Pena, S. D. J., & Coimbra, R. L. M. (2015). Ataxia and myoclonic epilepsy due to a heterozygous new mutation in KCNA2: Proposal for a new channelopathy: Aaxia and myoclonic epilepsy due to a heterozygous new mutation. *Clinical Genetics*, 87, e1–e3.
- Puckerin, A., Aromolaran, K. A., Chang, D. D., Zukin, R. S., Colecraft, H. M., Boutjdir, M., & Aromolaran, A. S. (2016). hERG 1a LQT2 C-terminus truncation mutants display hERG 1b-dependent dominant negative mechanisms. *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society*, 13, 1121–1130.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17, 405–423.
- Saito, H., Akita, T., Tohyama, J., Goldberg-Stern, H., Kobayashi, Y., Cohen, R., ... Matsumoto, N. (2015). De novo KCNB1 mutations in infantile epilepsy inhibit repetitive neuronal firing. *Scientific Reports*, 5, 5.
- Salinas, M., Duprat, F., Heurteaux, C., Hugnot, J. P., & Lazdunski, M. (1997). New modulatory  $\alpha$  subunits for mammalian ShabK+Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 24371–24379.

- Samanta, D. (2018). Epileptic spasm and de novo KCNB1 mutation: If it is not one potassium channel, it is another! *Acta Neurologica Belgica*, 1–4. <https://doi.org/10.1007/s13760-018-0950-8>
- Sano, Y., Mochizuki, S., Miyake, A., Kitada, C., Inamura, K., Yokoi, H., ... Furuichi, K. (2002). Molecular cloning and characterization of Kv6.3, a novel modulatory subunit for voltage-gated K(+) channel Kv2.1. *FEBS Letters*, 512, 230–234.
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., ... Perucca, E. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for classification and terminology. *Epilepsia*, 58, 512–521.
- Sicca, F., Imbrici, P., D'Adamo, M. C., Moro, F., Bonatti, F., Brovedani, P., ... Pessia, M. (2011). Autism with seizures and intellectual disability: Possible causative role of gain-of-function of the inwardly-rectifying K + channel Kir4.1. *Neurobiology of Disease*, 43, 239–247.
- Smetts, K., Duarri, A., Deconinck, T., Ceulemans, B., Warrenburg, B. P., van de Züchner, S., ... Verbeek, D. S. (2015). First de novo KCND3 mutation causes severe Kv4.3 channel dysfunction leading to early onset cerebellar ataxia, intellectual disability, oral apraxia and epilepsy. *BMC Medical Genetics*, 16, 51.
- Soden, S. E., Saunders, C. J., Willig, L. K., Farrow, E. G., Smith, L. D., Petrikin, J. E., ... Noll, A. (2014). Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Science Translational Medicine*, 6, 265ra168.
- Soldovieri, M. V., Boutry-Kryza, N., Milh, M., Doummar, D., Heron, B., Bourel, E., ... Echenne, B. (2014). Novel KCNQ2 and KCNQ3 mutations in a large cohort of families with benign neonatal epilepsy: First evidence for an altered channel regulation by syntaxin-1A. *Human Mutation*, 35, 356–367.
- Specia, D. J., Ogata, G., Mandikian, D., Bishop, H. I., Wiler, S. W., Eum, K., ... Nerbonne, J. M. (2014). Deletion of the Kv2.1 delayed rectifier potassium channel leads to neuronal and behavioral hyperexcitability. *Genes, Brain and Behavior*, 13, 394–408.
- Srivastava, S., Cohen, J. S., Vernon, H., Barañano, K., McClellan, R., Jamal, L., ... Fatemi, A. (2014). Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Annals of Neurology*, 76, 473–483.
- Tabarki, B., AlMajhad, N., AlHashem, A., Shaheen, R., & Alkuraya, F. S. (2016). Homozygous KCNMA1 mutation as a cause of cerebellar atrophy, developmental delay and seizures. *Human Genetics*, 135, 1295–1298.
- Thiffault, I., Specia, D. J., Austin, D. C., Cobb, M. M., Eum, K. S., Safina, N. P., ... Trimmer, J. S. (2015). A novel epileptic encephalopathy mutation in KCNB1 disrupts Kv2.1 ion selectivity, expression, and localization. *Journal of General Physiology*, 146, 399–410.
- Torkamani, A., Bersell, K., Jorge, B. S., Bjork, R. L., Friedman, J. R., Bloss, C. S., ... Kearney, J. A. (2014). De novo KCNB1 mutations in epileptic encephalopathy. *Annals of Neurology*, 76, 529–540.
- Trimmer, J. S. (1991). Immunological identification and characterization of a delayed rectifier K+ channel polypeptide in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 10764–10768.
- Veeramah, K. R., Johnstone, L., Karafet, T. M., Wolf, D., Sprissler, R., Salogiannis, J., ... Pazzi, M. (2013). Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies. *Epilepsia*, 54, 1270–1281.
- Wang, J., Lin, Z.-J., Liu, L., Xu, H.-Q., Shi, Y.-W., Yi, Y.-H., ... Liao, W.-P. (2017). Epilepsy-associated genes. *Seizure*, 44, 11–20.
- Wang, J., Wen, Y., Zhang, Q., Yu, S., Chen, Y., Wu, X., ... Bao, X. (2019). Gene mutational analysis in a cohort of Chinese children with unexplained epilepsy: Identification of a new KCND3 phenotype and novel genes causing Dravet syndrome. *Seizure*, 66, 26–30.
- Weckhuysen, S., Mandelstam, S., Suls, A., Audenaert, D., Deconinck, T., Claes, L. R. F., ... Ceulemans, B. (2012). KCNQ2 encephalopathy: Emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Annals of Neurology*, 71, 15–25.
- Wei, F., Yan, L.-M., Su, T., He, N., Lin, Z.-J., Wang, J., ... Liao, W.-P. (2017). Ion channel genes and epilepsy: Functional alteration, pathogenic potential, and mechanism of epilepsy. *Neuroscience Bulletin*, 33, 455–477.
- Xu, J., Yu, W., Jan, Y. N., Jan, L. Y., & Li, M. (1995). Assembly of voltage-gated potassium channels conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the  $\alpha$ -subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 24761–24768.
- Zhu, X., Padmanabhan, R., Copeland, B., Bridgers, J., Ren, Z., Kamalakaran, S., ... Guerrini, R. (2017). A case-control collapsing analysis identifies epilepsy genes implicated in trio sequencing studies focused on de novo mutations. *PLOS Genetics*, 13, e1007104.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Bar C, Barcia G, Jennesson M, et al. Expanding the genetic and phenotypic relevance of *KCNB1* variants in developmental and epileptic encephalopathies: 27 new patients and overview of the literature. *Human Mutation*. 2020;41:69–80. <https://doi.org/10.1002/humu.23915>

## **2. Spectre développemental et épileptique de l'encéphalopathie *KCNBI* et devenir à long terme**

---

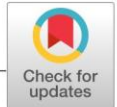
### **2.1. Avant-propos**

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au spectre phénotypique et au devenir à long terme des patients avec une encéphalopathie *KCNBI*. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, peu de patients avait été rapportés dans la littérature et leur phénotype développemental et épileptique n'était pas toujours détaillé. Il existait très peu de données sur le devenir à long terme de ces patients, leur espérance de vie, l'évolution de l'épilepsie dans le temps. Ces données sont pourtant primordiales pour permettre aux médecins de communiquer une information libre et éclairée aux familles de patients, mais aussi pour guider leur prise en charge thérapeutique. Entre l'étude précédente publiée en 2019 et celle-ci, publiée en 2020, nous avons continué d'inclure de nouveaux patients porteurs d'un variant pathogène dans *KCNBI*. Nous avons ainsi augmenté la taille de notre série, passant de 27 à 36 patients suivi pour une encéphalopathie *KCNBI*. Nous avons collecté toutes les données génétiques, cliniques, électroencéphalographiques et d'imagerie de ces patients. Nous les avons classés selon la dernière classification de l'ILAE, en différenciant les patients avec un phénotype d'encéphalopathie développementale et épileptique (EDE) de ceux avec un phénotype d'encéphalopathie développementale (ED), avec ou sans épilepsie. Avec l'ajout des patients de la littérature, nous avons ensuite décrit le spectre phénotypique de 73 patients présentant une encéphalopathie *KCNBI* et détaillé le devenir des 22 patients âgés de plus de 12 ans au moment de l'étude. Enfin, nous avons recherché la présence de corrélations génotype-phénotype et confirmé la présence d'un phénotype épileptique plus sévère chez les patients avec un variant faux-sens comparé aux patients avec un variant tronquant.

Cette étude a donc permis d'affiner le spectre phénotypique de l'encéphalopathie *KCNBI*. Elle montre l'hétérogénéité du phénotypique épileptique, allant de l'EDE sévère et précoce à une ED avec épilepsie plus tardive et pharmaco-sensible, ou sans épilepsie. Le pronostic développemental est globalement péjoratif avec une déficience intellectuelle chez tous les patients, associée à des troubles du comportement chez une majorité d'entre eux.

### **2.2. Article correspondant**





## Developmental and epilepsy spectrum of *KCNB1* encephalopathy with long-term outcome

Claire Bar<sup>1,2</sup> | Mathieu Kuchenbuch<sup>1,2</sup> | Giulia Barcia<sup>2,3</sup> | Amy Schneider<sup>4</sup> |  
 Mélanie Jennesson<sup>5</sup> | Gwenaël Le Guyader<sup>6,7</sup> | Gaetan Lesca<sup>8,9</sup> | Cyril Mignot<sup>10,11</sup> |  
 Martino Montomoli<sup>12</sup> | Elena Parrini<sup>12</sup> | Hervé Isnard<sup>13</sup> | Anne Rolland<sup>14</sup> |  
 Boris Keren<sup>11</sup> | Alexandra Afenjar<sup>15</sup> | Nathalie Dorison<sup>16,17</sup> | Lynette G. Sadleir<sup>18</sup> |  
 Delphine Breuillard<sup>1,2</sup> | Raphael Levy<sup>19</sup> | Marlène Rio<sup>3,20</sup> | Sophie Dupont<sup>10,21</sup> |  
 Susanna Negrin<sup>22</sup> | Alberto Danieli<sup>22</sup> | Emmanuel Scalais<sup>23</sup> | Anne De Saint Martin<sup>24</sup> |  
 Salima El Chehadeh<sup>25</sup> | Jamel Chelly<sup>25</sup> | Alice Poisson<sup>26</sup> | Anne-Sophie Lebre<sup>27</sup> |  
 Anca Nica<sup>28,29</sup> | Sylvie Odent<sup>30,31</sup> | Tayeb Sekhara<sup>32</sup> | Vesna Brankovic<sup>33</sup> |  
 Alice Goldenberg<sup>34</sup> | Pascal Vrielynck<sup>35</sup> | Damien Lederer<sup>36</sup> | Hélène Maurey<sup>37</sup> |  
 Gaetano Terrone<sup>38</sup> | Claude Besmond<sup>39</sup> | Laurence Hubert<sup>39</sup> | Patrick Berquin<sup>40</sup> |  
 Thierry Billette de Villemeur<sup>17</sup> | Bertrand Isidor<sup>41</sup> | Jeremy L. Freeman<sup>42,43</sup> | Heather  
 C. Mefford<sup>44</sup> | Candace T. Myers<sup>44</sup> | Katherine B. Howell<sup>42,43</sup> | Andrés Rodríguez-  
 Sacristán Cascajo<sup>45,46</sup> | Pierre Meyer<sup>47,48</sup> | David Genevieve<sup>49</sup> | Agnès Guët<sup>50</sup> |  
 Diane Doummar<sup>17</sup> | Julien Durigneux<sup>42</sup> | Marieke F. van Dooren<sup>51</sup> | Marie Claire Y. de  
 Wit<sup>52</sup> | Marion Gerard<sup>53</sup> | Isabelle Marey<sup>11</sup> | Arnold Munnich<sup>2,3</sup> | Renzo Guerrini<sup>12</sup> |  
 Ingrid E. Scheffer<sup>4,42,43,54</sup> | Edor Kabashi<sup>2</sup> | Rima Nabbout<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Neurology, Reference Center for Rare Epilepsies, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Necker-Enfants Malades Hospital, Paris, France

<sup>2</sup>Imagine Institute, Mixed Unit of Research 1163, University of Paris, Sorbonne University, Paris, France

<sup>3</sup>Department of Clinical Genetics, AP-HP, Necker-Enfants Malades Hospital, Paris, France

<sup>4</sup>Department of Medicine, Epilepsy Research Centre, Austin Health, University of Melbourne, Heidelberg, Victoria, Australia

<sup>5</sup>Department of Pediatrics, American Memorial Hospital, Reims, France

<sup>6</sup>Department of Genetics, Poitiers University Hospital Center, Poitiers Cedex, France

<sup>7</sup>EA3808-NEUVACOD Neurovascular and Cognitive Disorders Unit, University of Poitiers, Poitiers, France

<sup>8</sup>Department of Genetics, Lyon Civil Hospices, Lyon, France

<sup>9</sup>NeuroMyoGène Institute, National Center for Scientific Research, Mixed Unit of Research 5310, National Institute of Health and Medical Research U1217, University of Lyon, Claude Bernard Lyon 1 University, Villeurbanne, France

<sup>10</sup>National Institute of Health and Medical Research, U1127, National Center for Scientific Research Mixed Unit of Research 7225, Pierre and Marie Curie University Paris 6 Mixed Unit of Research S1127, Brain and Spine Institute, Sorbonne University, Paris, France

<sup>11</sup>Department of Genetics, Rare Causes of Intellectual Disability Reference Center, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Sorbonne University, Paris, France

<sup>12</sup>Pediatric Neurology, Neurogenetics, and Neurobiology Unit and Laboratories, Neuroscience Department, A. Meyer Children's Hospital, University of Florence, Florence, Italy

<sup>13</sup>Pediatric Neurologist, Medical Office, Lyon, France

- <sup>14</sup>Department of Pediatrics, Nantes University Hospital Center, Nantes, France
- <sup>15</sup>Department of Genetics and Medical Embryology, Reference Center for Malformations and Congenital Diseases of the Cerebellum and Rare Causes of Intellectual Disabilities, Sorbonne University, AP-HP, Trousseau Hospital, Paris, France
- <sup>16</sup>Pediatric Neurosurgery Department, Rothschild Foundation Hospital, Paris, France
- <sup>17</sup>Department of Pediatric Neurology, AP-HP, Armand Trousseau Hospital, Sorbonne University, Paris, France
- <sup>18</sup>Department of Pediatrics and Child Health, University of Otago, Wellington, New Zealand
- <sup>19</sup>Department of Pediatric Radiology, Necker-Enfants Malades Hospital, Paris, France
- <sup>20</sup>Laboratory of Developmental Brain Disorders, National Institute of Health and Medical Research Mixed Unit of Research 1163, Imagine Institute, Sorbonne University, Paris, France
- <sup>21</sup>Epileptology Unit and Rehabilitation Unit, AP-HP, Pitie-Salpêtrière-Charles Foix Hospital, Paris, France
- <sup>22</sup>Epilepsy and Clinical Neurophysiology Unit, Scientific Institute, IRCCS E. Medea, Treviso, Italy
- <sup>23</sup>Pediatric Neurology Unit, Luxembourg Hospital Center, Luxembourg City, Luxembourg
- <sup>24</sup>Department of Pediatric Neurology, Strasbourg University Hospital, Hautepierre Hospital, Strasbourg, France
- <sup>25</sup>Department of Medical Genetics, Strasbourg University Hospitals, Hautepierre Hospital, Strasbourg, France
- <sup>26</sup>GénoPsy, Reference Center for Diagnosis and Management of Genetic Psychiatric Disorders, le Vinatier Hospital Center and EDR-Psy Team (National Center for Scientific Research and Lyon 1 Claude Bernard University), Villeurbanne, France
- <sup>27</sup>Reims University Hospital Center, Maison Blanche Hospital, Biology Department, Reims, France
- <sup>28</sup>Neurology Department, Center for Clinical Research (CIC 1414), Rennes University Hospital, Rennes, France
- <sup>29</sup>Laboratory of Signal Processing, National Institute of Health and Medical Research Mixed Unit of Research 1099, Rennes, France
- <sup>30</sup>Reference Center for Rare Developmental Abnormalities CLAD-Ouest, Rennes University Hospital Center, Rennes, France
- <sup>31</sup>National Center for Scientific Research Mixed Unit of Research 6290, Institute of Genetics and Development of Rennes (IGDR), University of Rennes, Rennes, France
- <sup>32</sup>Department of Pediatric Neurology, C.H.I.R.E.C, Brussels, Belgium
- <sup>33</sup>Clinic for Child Neurology and Psychiatry, Belgrade, Serbia
- <sup>34</sup>Reference Center for Developmental Anomalies and Malformation Syndromes, Rouen University Hospital Center, Rouen, France
- <sup>35</sup>Reference Center for Refractory Epilepsy, Catholic University of Louvain, William Lennox Neurological Hospital, Ottignies, Belgium
- <sup>36</sup>Human Genetic Center, IPG, Gosselies, Belgium
- <sup>37</sup>Department of Pediatric Neurology, AP-HP, Bicêtre University Hospital, Kremlin Bicêtre, France
- <sup>38</sup>Department of Translational Medical Sciences, Section of Pediatrics, Child Neurology Unit, Federico II University, Naples, Italy
- <sup>39</sup>Translational Genetics, National Institute of Health and Medical Research Mixed Unit of Research 1163, Imagine Institute, University of Paris, Paris, France
- <sup>40</sup>Department of Pediatric Neurology, Amiens-Picardie University Hospital Center, University of Picardy Jules Verne, Amiens, France
- <sup>41</sup>Department of Clinical Genetics, Nantes University Hospital Center, Nantes, France
- <sup>42</sup>Departments of Neurology and Paediatrics, Royal Children's Hospital, University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia
- <sup>43</sup>Murdoch Children's Research Institute, Melbourne, Victoria, Australia
- <sup>44</sup>Department of Pediatrics, Division of Genetic Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, United States
- <sup>45</sup>Pediatric Neurology Unit, Department of Pediatric, Virgen Macarena Hospital, Seville, Spain
- <sup>46</sup>Department of Pediatrics, School of Medicine, University of Seville, Seville, Spain
- <sup>47</sup>Department of Pediatric Neurology, Montpellier University Hospital Center, Montpellier, France
- <sup>48</sup>PhyMedExp, National Institute of Health and Medical Research, U1046, National Center for Scientific Research Mixed Unit of Research 9214, University of Montpellier, Montpellier, France
- <sup>49</sup>Department of Medical Genetics, Rare Disease, and Personalized Medicine, IRMB, University of Montpellier, National Institute of Health and Medical Research, Montpellier University Hospital Center, Montpellier, France
- <sup>50</sup>Department of Pediatrics, Louis-Mourier Hospital, Colombes, France
- <sup>51</sup>Department of Clinical Genetics, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, the Netherlands
- <sup>52</sup>Department of Pediatric Neurology and ENCORE Expertise Center, Erasmus University Medical Center, Sophia Children's Hospital, Rotterdam, the Netherlands
- <sup>53</sup>Clinical Genetics, Côte de Nacre University Hospital Center, Caen, France
- <sup>54</sup>Florey Institute of Neurosciences and Mental Health, Heidelberg, Victoria, Australia



**Correspondence**

Rima Nabbout, Department of Pediatric Neurology, Reference Center for Rare Epilepsies, Necker Enfants Malades Hospital, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France.  
Email: rimanabbout@yahoo.com

**Funding information**

FP7 Ideas: European Research Council; National Health and Medical Research Council; Health Research Council of New Zealand; Curekids New Zealand; Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-10IAHU-01; Medical Research Future Fund of Australia; Fondation Bettencourt Schueller; Ligue Française Contre l'Épilepsie; European Commission Seventh Framework Program, Grant/Award Number: 602531

**Abstract**

**Objective:** We aimed to delineate the phenotypic spectrum and long-term outcome of individuals with *KCNB1* encephalopathy.

**Methods:** We collected genetic, clinical, electroencephalographic, and imaging data of individuals with *KCNB1* pathogenic variants recruited through an international collaboration, with the support of the family association “KCNB1 France.” Patients were classified as having developmental and epileptic encephalopathy (DEE) or developmental encephalopathy (DE). In addition, we reviewed published cases and provided the long-term outcome in patients older than 12 years from our series and from literature.

**Results:** Our series included 36 patients (21 males, median age = 10 years, range = 1.6 months-34 years). Twenty patients (56%) had DEE with infantile onset seizures (seizure onset = 10 months, range = 10 days-3.5 years), whereas 16 (33%) had DE with late onset epilepsy in 10 (seizure onset = 5 years, range = 18 months-25 years) and without epilepsy in six. Cognitive impairment was more severe in individuals with DEE compared to those with DE. Analysis of 73 individuals with *KCNB1* pathogenic variants (36 from our series and 37 published individuals in nine reports) showed developmental delay in all with severe to profound intellectual disability in 67% (n = 41/61) and autistic features in 56% (n = 32/57). Long-term outcome in 22 individuals older than 12 years (14 in our series and eight published individuals) showed poor cognitive, psychiatric, and behavioral outcome. Epilepsy course was variable. Missense variants were associated with more frequent and more severe epilepsy compared to truncating variants.

**Significance:** Our study describes the phenotypic spectrum of *KCNB1* encephalopathy, which varies from severe DEE to DE with or without epilepsy. Although cognitive impairment is worse in patients with DEE, long-term outcome is poor for most and missense variants are associated with more severe epilepsy outcome. Further understanding of disease mechanisms should facilitate the development of targeted therapies, much needed to improve the neurodevelopmental prognosis.

**KEYWORDS**

autism spectrum disorders, developmental and epileptic encephalopathy, developmental encephalopathy, drug-resistant epilepsy, potassium channels, sudden unexpected death in epilepsy

**1 | INTRODUCTION**

Over the past decade, the large application of next generation sequencing has significantly increased the discovery of genes involved in both neurodevelopmental disorders and epilepsy.<sup>1</sup> The International League Against Epilepsy introduced the term *developmental and epileptic encephalopathy* (DEE) to define severe neurodevelopmental disorders in which developmental consequences arise directly from the underlying etiology, which is often genetic, as well as from frequent epileptic activity.<sup>2</sup> The term *epileptic encephalopathy* alone applies to individuals without preexisting developmental delay where the adverse developmental impact is due to seizures and epileptiform activity.<sup>2,3</sup> The term *developmental encephalopathy* (DE) should be used for individuals presenting with developmental impairment without

frequent epileptic activity causing regression or further slowing of development.<sup>2</sup>

Pathogenic variants in ion-channel genes represent a major cause of DEE.<sup>4,5</sup> Despite the genetic heterogeneity, some strong phenotypes are emerging in relation to pathogenic variants in some specific genes, as for *KCNT1*, *KCNQ2*, *SCN1A*, and *SCN2A*.<sup>4</sup> *KCNB1* codes for the  $\alpha$  subunit of the voltage-gated potassium channel subfamily 2 ( $K_v2.1$ ).<sup>6</sup> In 2014, de novo pathogenic variants in *KCNB1* were first recognized to cause infantile onset epileptic encephalopathy in three patients.<sup>7</sup> Two series, including six and 25 individuals in total, have been reported, in addition to case reports.<sup>8-15</sup> Individuals exhibited global developmental delay, behavioral disorders, and various epilepsies.<sup>8-15</sup> A few individuals had developmental delay without seizures.<sup>11,16</sup> Outcome data are

**Key Points**

- *KCNBI* encephalopathy has a wide phenotypic spectrum, typically with poor long-term cognitive, psychiatric, and behavioral outcomes.
- *KCNBI* pathogenic variants are associated with developmental and epileptic encephalopathies or developmental encephalopathies with or without epilepsy.
- Patients with developmental and epileptic encephalopathy show a worse cognitive outcome, emphasizing the impact of early epilepsy.
- Epilepsy is less frequent and less severe in individuals with truncating variants compared to those with missense variants.

limited, as few adults have been described. It has been suggested that truncating variants in the C-terminal domain correlate with less severe epilepsy outcome.<sup>11,16</sup>

Here, we analyze a series of 36 individuals with pathogenic *KCNBI* variants to delineate the phenotypic spectrum of *KCNBI* encephalopathy. We explore genotype-phenotype correlations and long-term outcome to guide patient management and inform genetic and prognostic counseling.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Individuals

Individuals with *KCNBI* pathogenic variants were collected through a large international collaboration between the network of the French Reference Center for Rare Epilepsies and centers in Belgium, Italy, Spain, Luxembourg, New Zealand, and Australia, with the support of the family association *KCNBI* France. For each individual, we collected information on medical and developmental history, epilepsy, clinical examination, electroencephalography (EEG), and brain imaging findings. The severity of intellectual disability (ID) was classified by the referring physician according to developmental scales used at their institution or based on clinical evaluation. We classified seizures and epilepsy types and, where possible, epilepsy syndromes according to the International League Against Epilepsy proposal.<sup>2,17</sup> Individuals were classified as having *KCNBI* DEE when epilepsy (seizures and EEG) resulted in developmental slowing or regression. Individuals were classified as *KCNBI* DE when they had less active epilepsy, often with late onset seizures and without clear regression or slowing of development. The DE group also included individuals without seizures. Because

of the limited number of patients and their broad age range, the cutoff age of 12 years was chosen to look at long-term outcome and to include a sufficient number of patients. Informed written consent was obtained for all participants for research participation, including the use of photographs, according to the human research ethics committee of each participating institution.

### 2.2 | Variant analysis

*KCNBI* variants were identified by targeted next generation sequencing gene panels or whole exome sequencing. Sanger sequencing confirmed single nucleotide variants, and segregation analysis was performed in each family. We classified variants according to the guidelines of the American College of Medical Genetics.<sup>18</sup> *KCNBI* variants were described according to Human Genome Variation Society variant nomenclature guidelines (<http://varnomen.hgvs.org/>),<sup>19</sup> using the reference sequence RefSeq NM\_004975.2. Variants have been submitted to the ClinVar database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

### 2.3 | Literature review

PubMed was searched for reports of individuals with *KCNBI* pathogenic variants by combining the terms “*KCNBI*” and “variants” or “mutations”. Articles were reviewed and compared with variants listed in professional databases (Human Gene Mutation Database, Biobase, and Qiagen). The accuracy of variant description was checked using Alamut 2.10 (Interactive Biosoftware).

### 2.4 | Statistics

Descriptive data are represented as median (interquartile range). Statistical tests were performed using a two-sided Fisher exact test with statistical significance determined by  $P < .05$ .

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Series

#### 3.1.1 | Demographic data

Our cohort included 36 unrelated individuals (21 males) with *KCNBI* pathogenic variants (Table S1). Age at study ranged from 1.6 months to 34 years (median = 10 years, interquartile range = 6–15 years). Pregnancy and delivery were unremarkable for 32 of 36 (89%) individuals. Patient 19’s mother reported decreased fetal movements

and Patient 23's mother suspected in utero seizures. Emergency Caesarean section for fetal deceleration was performed at term for Patients 17 and 28, without neonatal distress.

### 3.1.2 | Variants

Our series comprises 28 patients with previously reported *KCNBI* variants<sup>16</sup> and eight new patients (Table S1). The 36 patients had 30 different *KCNBI* pathogenic variants, including 25 (83%) missense, four (13%) nonsense, and one (3%) frameshift. Three variants were recurrent: p.Arg312His in five patients, and p.Arg306Cys and p.Gly395Arg in two patients each. Patient 1 with p.Glu43Gly affecting the cytoplasmic N-terminal region also carried a de novo variant in *GABRA5* (p.Thr301Met), which encodes the alpha 5 subunit of the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor. Both variants were predicted to be damaging and thus considered pathogenic and contributing to the individual's phenotype.<sup>16</sup> Variants occurred de novo in 31 of 36 individuals. In four individuals (Patients 2, 10, 25, 30), segregation could not be completed because parental samples were not available. Patient 36 inherited p.Arg583\* from her heterozygous mother who had mild ID without epilepsy. The variant arose de novo in the mother.

### 3.1.3 | Neurodevelopment

All individuals had developmental delay, recognized in the first year of life in 32 of 36 (89%) patients (Table S1). ID ranged from mild in five of 36 (14%), to moderate (10/36, 28%), severe (19/36, 53%), and profound (2/36, 6%). Of 33 of 36 patients older than 3 years, 17 of 33 (52%) had no words, nine of 33 (27%) used some words, and seven of 33 (21%) spoke short sentences. Orofacial apraxia was reported in two of 36 (6%). Behavioral and psychiatric disorders were reported in 28 of 34 (82%), including stereotypies and other autistic features in 18 of 34 (53%), uncontrolled aggression in 11 of 34 (32%), and impulsiveness or attention-deficit/hyperactivity disorder in 13 of 34 (38%). Antipsychotic treatments were used in eight of 36 (22%) and psychostimulants in three of 36 (8%) patients. In 12 of 36 (33%) patients aged 2-29 years, families reported sleep disorders, particularly frequent waking during nighttime sleep. Polysomnography was performed on two of them, revealing parasomnia and frontal motor seizures in Patient 6 and central apnea in Patient 23. Twenty-nine of 35 (83%) patients older than 2 years acquired independent walking at a median age of 24 months (interquartile range = 18-36 months, range = 16-54 months).

### 3.1.4 | Examination

Hypotonia was observed in 19 of 36 (53%) patients in infancy and varied in severity. Hyperlaxity and ataxia were each reported in eight of 36 (22%) patients. Pyramidal signs, dystonia, and choreoathetosis were each observed in six of 36 (17%) different patients. Normal head circumference was present in all but three patients, who had acquired microcephaly reaching  $-2$  to  $-3$  SD. Two patients had a gastrostomy with some oral intake. Morphological analysis of 14 patients revealed minor dysmorphic features including sunken eyes in 13 and large median incisors in six (Figure 1). Of note, Patient 8 had more pronounced dysmorphic features. He had chromosomal microarray without evidence for copy number variants and, except for the *KCNBI* pathogenic variant, no other pathogenic variants have been found on whole exome sequencing. He is the oldest patient (34 years), and morphological evolution over time has not yet been documented in this population.

### 3.1.5 | Epilepsy

Thirty patients (30/36, 83%) had epilepsy (Table S1). Median age at seizure onset was 17 months (interquartile range = 8-35 months, range = 10 days-25 years), with preexisting developmental delay in all patients. Twenty patients (20/36, 56%) had *KCNBI* DEE, whereas 16 (16/36, 44%) had *KCNBI* DE, including six without epilepsy (Figure 2).

The 20 patients with *KCNBI* DEE had a median age at seizure onset of 10 months (interquartile range = 8-17 months, range = 10 days-3.5 years). Eleven individuals showed developmental slowing or plateauing after seizure onset, whereas nine had developmental regression. The first seizure was generalized in 16 individuals (16/20, 80%), including epileptic spasms ( $n = 6$ ), tonic or tonic-clonic seizures ( $n = 3$ ), atypical absences ( $n = 3$ ), myoclonic ( $n = 2$ ), and atonic seizures ( $n = 1$ ). With increasing age, most individuals developed several seizure types; 15 of 20 (75%) had  $>2$  seizure types and 12 of 20 (60%)  $>3$  seizure types. Only five patients (5/20, 25%) could be classified into a specific epilepsy syndrome such as infantile spasms ( $n = 3$ ) and Lennox-Gastaut syndrome ( $n = 2$ ). The remaining 15 patients (15/20, 75%) had "unclassified DEE," with frequent multifocal epileptiform activity on EEG (Figure 3). Four individuals (4/20, 20%) had activation of EEG abnormalities during sleep. At follow-up, median age for individuals with *KCNBI* DEE was 9 years (interquartile range = 4-16, range = 19 months-34 years). Fourteen patients (14/20, 70%) had drug-resistant epilepsy, with daily seizures in eight of 14, weekly in four of 14, and monthly in two of 14. Two patients with infantile spasms were in remission by 8 and 14 months, respectively. Patients received a median of



**FIGURE 1** Photographs of patients with *KCNB1* encephalopathy. Note sunken eyes (A, C) and large median incisors (A-C, E, G, H)

seven antiseizure medications (ASMs; interquartile range = 3-10). Response to vigabatrin occurred in five of seven patients with epileptic spasms. All five individuals receiving the ketogenic diet were responders.

In the 16 patients with *KCNB1* DE, 10 had epilepsy. The first seizure occurred at a median age of 5 years (interquartile range = 2-5 years, range = 18 months-25 years). Epilepsy was generalized in three of 10, focal in three of 10, and combined generalized and focal in one of 10. Three individuals only had a few motor seizures of unknown onset and did not require ASM. Seizures remitted in three patients at age 16 months, 6 years, and 12 years, respectively. Six patients aged 4.5-20 years had not had seizures.

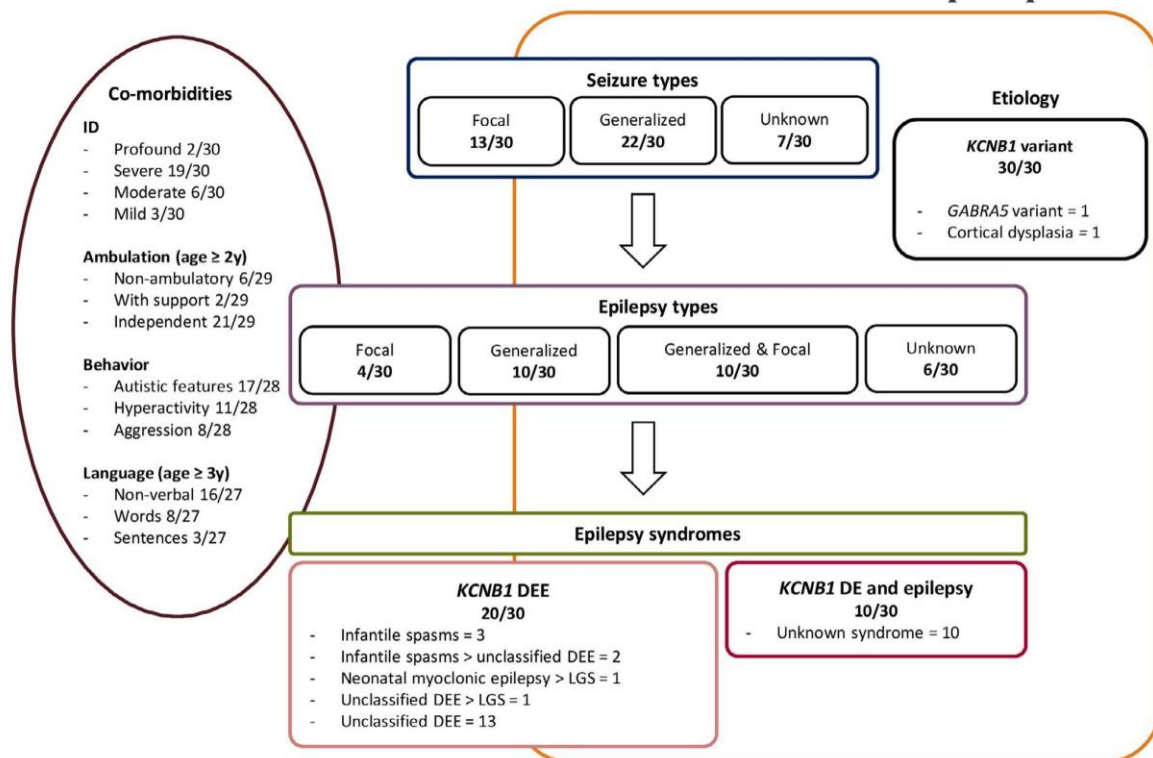
ID and language disorder were more severe in patients with *KCNB1* DEE compared to those with *KCNB1* DE and epilepsy. Sixteen of 20 patients with *KCNB1* DEE had severe to profound ID compared to four of 10 patients with *KCNB1* DE and epilepsy ( $P = .04$ ). Of patients older than 3 years, 13 of 17 with *KCNB1* DEE were nonverbal compared with three of 10 with *KCNB1* DE and epilepsy ( $P = .04$ ). However, we found no difference in independent walking and behavioral or psychiatric characteristics between these two groups.

### 3.1.6 | Magnetic resonance imaging data

Twenty-five individuals (25/33, 76%) had a normal brain magnetic resonance imaging (MRI) performed at a median age of 3 years (interquartile range = 2-6; Table S1). Patient 6 with *KCNB1* DE and focal epilepsy had two areas of focal cortical dysplasia (Figure 4). Brain MRI of Patient 20, who did not develop epilepsy, showed small bilateral periventricular heterotopia. Cortical and subcortical nonspecific findings and moderate atrophy were reported in three patients. In Patient 31 with *KCNB1* DEE, atrophy was probably progressive. He showed moderate atrophy on MRI at 7 years after a previous normal MRI at 2.5 years. In the other three patients, MRI showed delayed myelination at 3.5 years (Patient 16), nonspecific bilateral central tegmental tract hyperintensity on serial MRI (Patient 24), and a mild brachycephaly (Patient 26).

### 3.2 | Analysis of all cases

In addition to our series of 36 individuals, 37 published individuals with *KCNB1* encephalopathy were identified in nine reports.<sup>7,8,10,11,13-15,20,21</sup> Taken together, this series of 73



**FIGURE 2** Epilepsy phenotype of the 30 individuals with *KCNB1* encephalopathy and epilepsy, according to the International League Against Epilepsy classification. Individuals with epilepsy were classified as having *KCNB1* developmental and epileptic encephalopathy (DEE) or *KCNB1* developmental encephalopathy (DE) and epilepsy. Number of individuals with each seizure type and epilepsy type are indicated as well as the epilepsy syndromes for each group. Comorbidities represent the neurodevelopmental phenotype of individuals with epilepsy. Data on ambulation and oral language are indicated for individuals older than 2 and 3 years, respectively. ID, intellectual disability; LGS, Lennox-Gastaut syndrome

individuals included 50 distinct *KCNB1* pathogenic variants. Variants typically arose de novo except for the maternally inherited variant p.Arg583\* in Patient 36. Variants were scattered throughout the *KCNB1* protein, with 27 of 50 (54%) located in the pore-forming region (S5-S6 transmembrane domains). Thirty-nine variants (78%) were missense, and 11 were truncating (22%). Eleven variants were recurrent in two to eight individuals (Figure 5). Median age was 9 years (interquartile range = 5-15, data available for  $n = 70/73$ ). We summarized the epilepsy and developmental spectrum of all 73 individuals (55% males; Table 1).

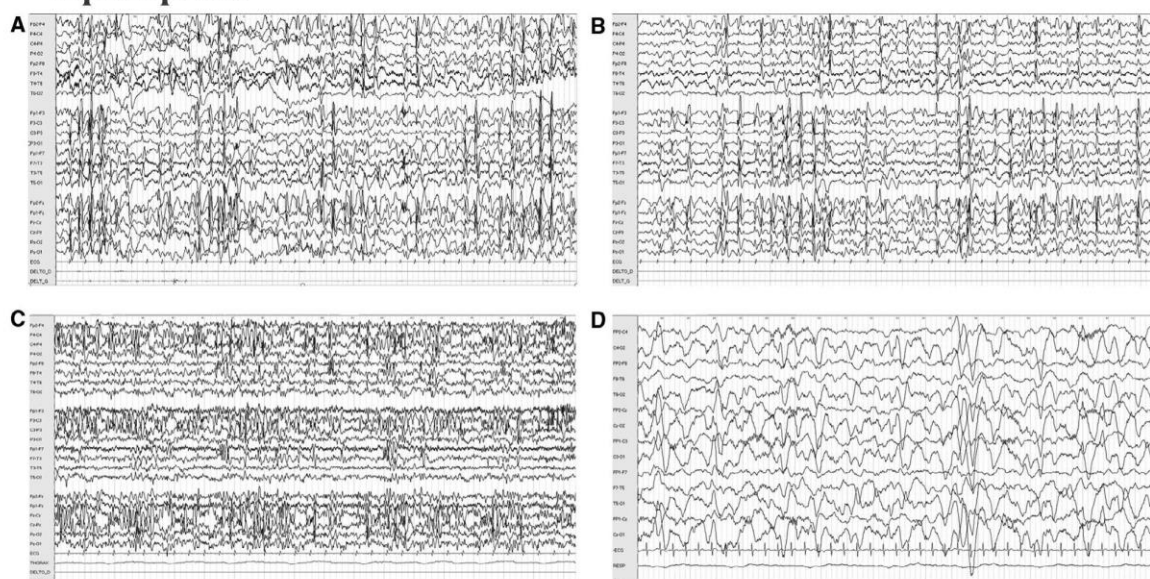
### 3.2.1 | Phenotype-genotype correlation

Epilepsy was more frequent in individuals with missense variants (55/59) compared to those with truncating variants (8/13,  $P = .008$ ). Epilepsy was also more frequently drug-resistant in individuals with missense (25/34) compared to those with truncating variants (0/4,  $P = .01$ ). Epilepsy was less frequent in individuals with variants in the C-terminal

domain (5/7 vs 4/61,  $P = .0002$ ). This was expected, because all variants of the C-terminal domain were truncating. We observed no further correlations between the neurodevelopmental phenotype and the variant type or its position in the protein (Figure 5). Individuals with recurrent variants had a similar range of neurodevelopmental disorders. Their phenotypic spectrum ranged from DE with or without mild epilepsy to drug-resistant DEE (Figure 5).

### 3.2.2 | Long-term outcome

We reviewed the long-term outcome of *KCNB1* encephalopathy in 22 patients older than 12 years: 14 from our series and eight published cases.<sup>11,13</sup> Median age was 17 years (interquartile range = 15-22 years, range = 12-34 years). Nineteen patients (19/22) had epilepsy. Epilepsy beginning in infancy or early childhood remitted in five individuals who became seizure-free at a median age of 11 years (interquartile range = 9-16 years), and ASMs were progressively withdrawn. Three of them had *KCNB1* DE, one had *KCNB1*



**FIGURE 3** Interelectroencephalographic (EEG) recordings of patients with *KCNB1* encephalopathy (longitudinal bipolar montage, right derivations above left derivations). A, B, Interelectroencephalographic recording of Patient 28 with *KCNB1* developmental and epileptic encephalopathy (DEE) showing slowing of background activity with frequent diffuse spike-and-waves, predominant in anterior regions, during wakefulness (A) and sleep (B) at 9 years. C, Interelectroencephalographic sleep recording of Patient 14 with *KCNB1* DEE showing abundant and multifocal paroxysmal activity at 4 years. D, Interelectroencephalographic sleep recording of Patient 16 with *KCNB1* developmental encephalopathy showing normal background activity with sleep spindles and K-complexes at 12 months

DEE, and the last one from the literature cannot be classified. Duration of remission ranged from 2 to 24 years. Seizure frequency decreased over time in three individuals. Five individuals still had daily to weekly seizures; three evolved to Lennox-Gastaut syndrome of whom one previously had neonatal myoclonic DEE, and the remaining two had unclassified DEE. One individual had a few sporadic seizures at age 25 years and was not treated. Epilepsy outcome was not documented in five individuals.

Developmental outcome was not constantly reported from previous literature reports. Seventeen patients (17/21, 81%) had severe developmental delay, with no information for one patient. Three individuals, two aged 12 and one aged 20 years, did not have epilepsy, and their ID varied from mild to severe. In the 18 patients with reported language skills, 11 of 18 (61%) were nonverbal, four of 18 (22%) spoke words, and three of 18 (17%) used short sentences. Information on behavioral and/or psychiatric disorders was available in 19 individuals, with reported disorders in 16 of 19 (84%). Seven of them required antipsychotic drugs. Finally, walking information was reported in 17 individuals, with 13 of 17 (76%) walking independently, one walked with support, and three needed a wheelchair.

Mortality did not appear to be increased, as there was no history of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) and only one individual with Lennox-Gastaut syndrome

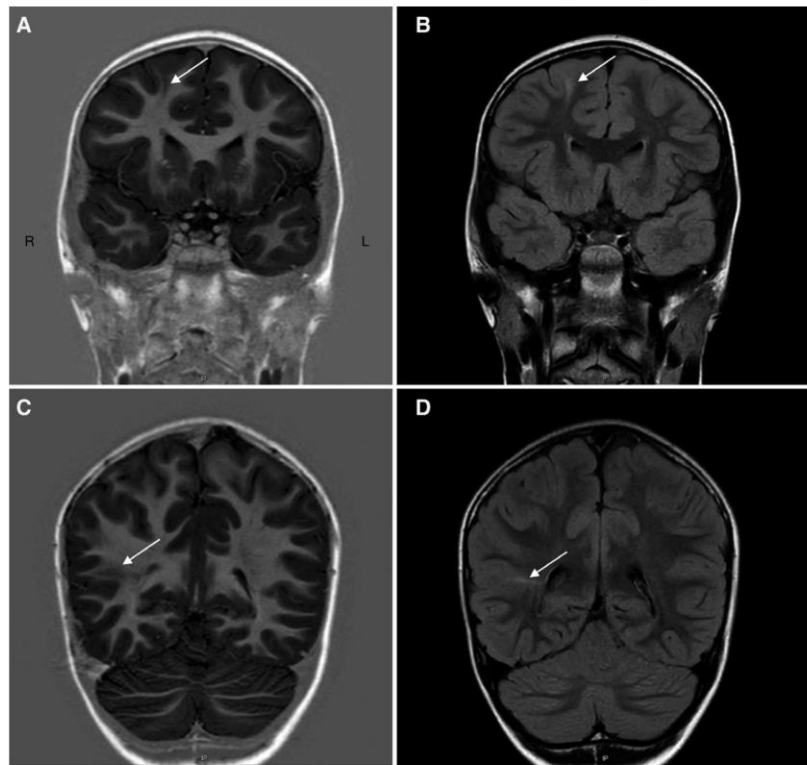
following a neonatal myoclonic DEE died at 17 years due to severe pneumonia.

## 4 | DISCUSSION

We report a large series of individuals with *KCNB1* encephalopathy, delineating the phenotypic spectrum and long-term outcome. This large series is the result of a successful collaboration between academia and a family support group (the family association *KCNB1* France) taking from the shadows dozens of families and patients, in addition to a large international collaboration through seven tertiary epilepsy centers. Early developmental delay is universal, with two-thirds of individuals having severe to profound ID. More than 80% develop epilepsy. Autism spectrum disorder (ASD) and other psychiatric and behavioral disorders occur in more than half of individuals.

The most common phenotype, occurring in 56% cases, was *KCNB1* DEE with infantile onset drug-resistant seizures associated with periods of developmental regression or plateauing. A range of seizure types may occur, including epileptic spasms, and generalized and focal seizures. *KCNB1* should now be included in epilepsy gene panels and interrogated for a pathogenic variant when performing genetic testing in patients with DEE.

**FIGURE 4** Brain magnetic resonance image (MRI) revealing two areas of focal cortical dysplasia in Patient 6 with *KCNBI* encephalopathy and focal epilepsy. Brain MRI of Patient 6 performed at epilepsy onset at 4 years shows a right frontal cortical dysplasia with transmantle sign (arrow) and blurring on T1 inversion recovery coronal sequence (A) and fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) sequence (B), and a right temporoparietal focal cortical dysplasia with transmantle sign (arrow) and blurring on T1 inversion recovery coronal sequence (C) and Flair sequence (D). L, left; R, right



In addition, we identified 10 individuals with *KCNBI* DE and epilepsy who presented later and had pharmacoresponsive epilepsy, without evidence of epileptic encephalopathy. These individuals showed better cognitive outcome compared to those with *KCNBI* DEE, emphasizing the impact of early onset seizures and severe epilepsy on neurodevelopment. Importantly, we studied six individuals aged 4.5–20 years who had not yet had seizures, along with three who had been previously reported, confirming that *KCNBI* also causes early onset DE without epilepsy.

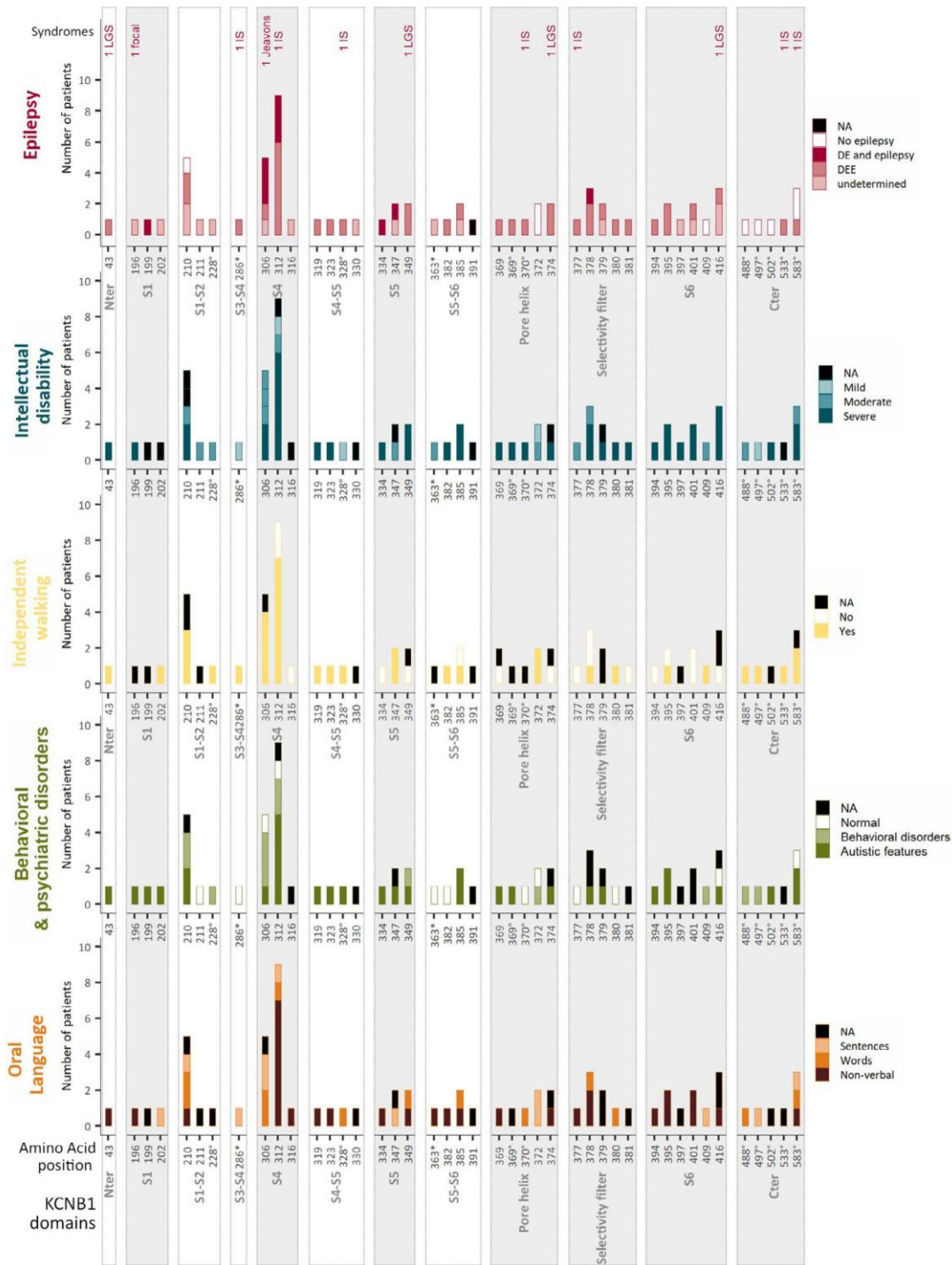
The long-term outcome observed in 22 individuals older than 12 years from our current series and from literature showed that the natural history of epilepsy was highly variable, ranging from individuals with drug-resistant epilepsy to others in remission, allowing ASM withdrawal. Unfortunately, cognition remained poor, with moderate to severe ID in most individuals. Patients also had severe expressive language disorder and frequent behavioral and psychiatric issues impacting on everyday life of the individuals, and their caregivers and families.

Our study showed that truncating *KCNBI* variants were associated with less frequent and less severe epilepsy compared with missense variants. Of the nine individuals with truncating variants and available data, five did not develop seizures, and four had infantile spasms with remission on either vigabatrin or adrenocorticotropic hormone allowing cessation of ASM. This finding suggests that ASM can be withdrawn in

individuals with *KCNBI* truncating variants whose seizures have remitted. This will limit potential side effects related to ongoing ASM use. All truncating variants were in the last exon and thus expected to produce a truncated protein rather than nonsense-mediated mRNA decay.<sup>22</sup> However, few functional studies have been performed to date, with limited data on truncating variants. One recent study showed altered current density for two truncating variants when expressed as homotetramers but normalized current density when coexpressed with wild-type subunits.<sup>23</sup> The epilepsy phenotype might be related to the extent of mutation-induced functional K<sub>v</sub>2.1 channel impairment, influenced by other genetic or environmental factors. No other phenotype-genotype correlations were found.

Epilepsy phenotypes associated with variants in other potassium channel genes show similar phenotypic heterogeneity, such as *KCNA2*, *KCNQ2*, *KCNQ3*, *KCNH1*, *KCNJ10*, and *KCNT1*.<sup>24–29</sup> The underlying pathophysiological explanations for such pleiotropy remain largely unknown. For *KCNA2*, different functional effects of some variants have been associated with distinct epilepsy phenotypes.<sup>30</sup> However, a recent functional study of 17 *KCNBI* variants did not support such a correlation,<sup>23</sup> consistent with the observation that recurrent missense variants cause a spectrum of phenotypes.

In addition to epilepsy and neurodevelopmental phenotypes, pathogenic variants in ion-channel genes have been associated



**FIGURE 5** Distribution of phenotypes according to the type and position of *KCNB1* variant. The phenotypic spectrum (y-axis) associated with each reported *KCNB1* variant is represented according to its amino acid position and domain of the protein (x-axis). Stars and circles beside amino acid position indicate frameshift and nonsense variants, respectively. Functional transmembrane domains of the protein are represented in gray (S1, S4, S5, pore helix, selectivity filter, S6) while extramembrane domains are represented in white columns (N-terminal domain [Nter], S1-S2, S3-S4, S5-S6). Cter, C-terminal domain; DE, developmental encephalopathy; DEE, developmental and epileptic encephalopathy; IS, infantile spasms; LGS, Lennox-Gastaut syndrome; NA, not available; S, segment



**TABLE 1** Phenotypic spectrum of the 73 individuals from this series and published reports

Characteristic	Patients/ patients with available data, n (%) <sup>a</sup>
Median age at study, y (IQR)	9 (5-15)
Clinical examination	
Global or truncal hypotonia	32/62 (52)
Pyramidal signs [hypertonia with spasticity]	15/62 (24)
Ataxia	14/62 (23)
Dystonia, choreoathetosis	10/62 (16)
Hyperlaxity	9/62 (15)
Apraxia, dyspraxia	5/62 (8)
Motor milestones [individuals ≥2 y old]	
Independent walking	36/50 (72)
Median age at walking, mo (IQR)	24 (18-36)
Walk with support	4/50 (8)
Nonambulatory	10/50 (20)
Language development [individuals ≥ 3 y old]	
Nonverbal	25/49 (51)
Single words	13/49 (27)
Speaks short sentences	11/49 (22)
Intellectual disability	
Mild	5/61 (8)
Moderate	15/61 (25)
Severe	39/61 (64)
Profound	2/61 (3)
Behavioral and psychiatric impairment	
Autistic features	32/57 (56)
Aggression	22/57 (39)
Impulsiveness/hyperactivity	20/57 (35)
Epilepsy	
Patients with epilepsy	63/72 (88)
Median age at seizure onset, mo (IQR)	13 (9-24)
Seizure types	
Generalized onset seizures	50/61 (82)
Generalized tonic-clonic seizures	29/61 (48)
Generalized epileptic spasms	21/61 (34)
Generalized tonic seizures	18/61 (30)
Atypical absences	15/61 (25)
Generalized myoclonic seizures	15/61 (23)
Generalized atonic seizures	10/61 (16)
Generalized clonic seizures	4/61 (7)
Absence with eyelid myoclonic	1/61 (2)
Focal onset seizures	30/61 (49)
Focal motor seizures	18/61 (30)

(Continues)

**TABLE 1** (Continued)

Characteristic	Patients/ patients with available data, n (%) <sup>a</sup>
Focal nonmotor seizures	13/61 (21)
Seizures with unknown onset	7/61 (11)
Epilepsy syndromes	
Unclassified DEE	23/45 (51)
Infantile spasms	7/45 (16)
Lennox-Gastaut syndrome	4/45 (9)
Jeavons syndrome	1/45 (2)
Unknown	10/45 (22)

Abbreviations: DEE, developmental and epileptic encephalopathy; IQR, interquartile range.

<sup>a</sup>Unless otherwise indicated.

with other central nervous system (CNS) and extra-CNS manifestations. Extra-CNS manifestations are thought to be related to the expression of these genes in different organs outside the CNS.<sup>31,32</sup> *KCNBI* encodes the  $\alpha$  subunit of  $K_{v}2.1$ , which is widely expressed across the CNS but also in the heart, lung, liver, colon, kidney, and adrenal gland.<sup>33</sup> Cardiac disorders and SUDEP have not yet been reported in individuals with *KCNBI* encephalopathy. Hypotonia was reported in half of the patients and likely has a central basis considering the strong expression of  $K_{v}2.1$  in the cortex and its major role in regulating excitability in pyramidal neocortical neurons.<sup>34,35</sup> Although ataxia was reported in 20% of individuals, no evidence of cerebellar abnormality was seen on MRI nor signs of motor neuropathy on clinical examination.

Patient 6 had focal epilepsy, beginning at 4 years, with focal cortical dysplasia (Figure 4). She had the recurrent missense variant p.Arg306Cys, identified in three individuals (including Patient 5), and none had focal cortical dysplasia.<sup>8,11</sup> Malformations of cortical development have been described in epilepsies due to ion-channel gene variants, including *SCN1A* and *KCNT1*.<sup>36,37</sup> However, the underlying pathogenesis of cortical malformation due to these genes remains unclear, especially as neuropathological data are scarce given the ongoing debate regarding the efficacy of epilepsy surgery in this population.<sup>38</sup>

The retrospective nature of our study, without quantitative evaluation of neurodevelopment and ASD, is a limitation. Recruitment of most individuals occurred via tertiary epilepsy centers, which may have led to an underestimation of the prevalence of individuals with *KCNBI* DE without epilepsy. However, the frequency of *KCNBI* DE without epilepsy was higher in our series (6/36) than in published cases (3/37).<sup>11</sup>

We establish *KCNBI* as an important cause of DEE, early DE, and DE and epilepsy. All are associated with a poor long-term cognitive, psychiatric, and behavioral prognosis. Although frequent, epilepsy exhibits a wide phenotypic

spectrum, ranging from drug-resistant early onset DEE to DE and pharmacoresponsive epilepsy. These findings highlight the urgent need to develop experimental models to gain insight to the underlying pathophysiological mechanisms of *KCNB1* encephalopathy and to develop targeted compounds that can ameliorate the neurodevelopmental outcome.

## ETHICAL PUBLICATION STATEMENT

We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the association KCNB1 France as well as all patients and their families from around the world for their participation in this study. This study was funded by grants from the National Research Agency under the "Investissements d'avenir" program (ANR-10IAHU-01), the Bettencourt Schueller Foundation (C.Ba. and R.N.), the French League Against Epilepsy (C.Ba.), the ERC Consolidator Grant (E. K.), Curekids New Zealand and the Health Research Council of New Zealand (L.G.S. and I.E.S.), the National Health and Medical Research Council of Australia and Medical Research Future Fund of Australia (I.E.S.), and the European Commission Seventh Framework Program under the project DESIRE (grant agreement 602531, R.G.).

## CONFLICT OF INTEREST

I.E.S. serves/has served on the editorial boards of the *Annals of Neurology*, *Neurology*, and *Epileptic Disorders*; may accrue future revenue on pending patent WO61/010176 (filed in 2008), "Therapeutic Compound"; has a patent for SCN1A testing held by Biomimics and licensed to various diagnostic companies; has a patent "Molecular Diagnostic/Theranostic Target for Benign Familial Infantile Epilepsy (BFIE) [PRRT2]" 2011904493, 2012900190, and PCT/AU2012/001321 (TECH ID: 2012-009), with royalties paid; has served on scientific advisory boards for UCB, Eisai, GlaxoSmithKline, BioMarin, Nutricia, Rogcon, and Xenon Pharmaceuticals; has received speaker honoraria from GlaxoSmithKline, UCB, BioMarin, Biocodex and Eisai; has received funding for travel from UCB, Biocodex, GlaxoSmithKline, Biomarin, and Eisai; has consulted for UCB, Zynerva Pharmaceuticals, and Ovid Therapeutics; and receives/has received research support from the National Health and Medical Research Council of Australia, Health Research Council of New Zealand, CURE, Australian Epilepsy Research Fund, March of Dimes, and National Institutes of Health/National Institute of Neurological Disorders and Stroke. None of the other authors has any conflict of interest to disclose.

## ORCID

Claire Bar  <https://orcid.org/0000-0003-1489-0211>  
 Mathieu Kuchenbuch  <https://orcid.org/0000-0002-5944-2204>  
 Gaetan Lesca  <https://orcid.org/0000-0001-7691-9492>  
 Lynette G. Sadleir  <https://orcid.org/0000-0002-5355-7115>  
 Sophie Dupont  <https://orcid.org/0000-0003-2080-8253>  
 Ingrid E. Scheffer  <https://orcid.org/0000-0002-2311-2174>

## REFERENCES

- Bamshad MJ, Nickerson DA, Chong JX. Mendelian gene discovery: fast and furious with no end in sight. *Am J Hum Genet. Cell Press.* 2019;105:448–55.
- Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2017;58(4):512–21.
- Nabbout R, Dulac O. Epileptic encephalopathies: a brief overview. *J Clin Neurophysiol.* 2003;20(6):393–7.
- Wang J, Lin ZJ, Liu L, Xu HQ, Shi YW, Yi YH, et al. Epilepsy-associated genes. 2017;44:11–20.
- McTague A, Howell KB, Cross JH, Kurian MA, Scheffer IE. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol.* 2016;15(3):304–16.
- Hwang PM, Fotuhi M, Brecht DS, Cunningham AM, Snyder SH. Contrasting immunohistochemical localizations in rat brain of two novel K<sup>+</sup> channels of the Shab subfamily. *J Neurosci.* 1993;13(4):1569–76.
- Torkamani A, Bersell K, Jorge BS, Bjork RL, Friedman JR, Bloss CS, et al. De novo KCNB1 mutations in epileptic encephalopathy. *Ann Neurol.* 2014;76(4):529–40.
- Saito H, Akita T, Tohyama J, Goldberg-Stern H, Kobayashi Y, Cohen R, et al. De novo KCNB1 mutations in infantile epilepsy inhibit repetitive neuronal firing. *Sci Rep.* 2015;5:15199.
- Thiffault I, Specia DJ, Austin DC, Cobb MM, Eum KS, Safina NP, et al. A novel epileptic encephalopathy mutation in KCNB1 disrupts Kv2.1 ion selectivity, expression, and localization. *J Gen Physiol.* 2015;146(5):399–410.
- Calhoun JD, Vanoye CG, Kok F, George AL, Kearney JA. Characterization of a KCNB1 variant associated with autism, intellectual disability, and epilepsy. *Neurol Genet.* 2017;3(6):e198.
- De Kovel CGF, Syrbe S, Brilstra EH, Verbeek N, Kerr B, Dubbs H, et al. Neurodevelopmental disorders caused by de novo variants in KCNB1 genotypes and phenotypes. *JAMA Neurol.* 2017;74(10):1228–36.
- Latypova X, Matsumoto N, Vincelas-Muller C, Bézieau S, Isidor B, Miyake N. Novel KCNB1 mutation associated with non-syndromic intellectual disability. *J Hum Genet.* 2017;62(5):569–73.
- Marini C, Romoli M, Parrini E, Costa C, Mei D, Mari F, et al. Clinical features and outcome of 6 new patients carrying de novo KCNB1 gene mutations. *Neurol Genet.* 2017;3(6):e206.
- Miao P, Feng J, Guo Y, Wang J, Xu X, Wang Y, et al. Genotype and phenotype analysis using an epilepsy-associated gene panel in Chinese pediatric epilepsy patients. *Clin Genet.* 2018;94(6):512–20.
- Samanta D. Epileptic spasm and de novo KCNB1 mutation: if it is not one potassium channel, it is another! *Acta Neurol Belg.* 2020;120(2):417–20.

16. Bar C, Barcia G, Jennesson M, Le Guyader G, Schneider A, Mignot C, et al. Expanding the genetic and phenotypic relevance of KCNB1 variants in developmental and epileptic encephalopathies: 27 new patients and overview of the literature. *Hum Mutat.* 2020;41(1):69–80.
17. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2017;58(4):522–30.
18. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–24.
19. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Hum Mutat.* 2016;37(6):564–9.
20. Soden SE, Saunders CJ, Willig LK, Farrow EG, Smith LD, Petrikin JE, et al. Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Sci Transl Med.* 2014;6(265):265ra168.
21. Schönewolf-Greulich B, Bisgaard AM, Møller RS, Dunø M, Brøndum-Nielsen K, Kaur S, et al. Clinician's guide to genes associated with Rett-like phenotypes—investigation of a Danish cohort and review of the literature. *Clin Genet.* 2019;95:221–30.
22. Khajavi M, Inoue K, Lupski JR. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(10):1074.
23. Kang SK, Vanoye CG, Misra SN, Echevarria DM, Calhoun JD, O'Connor JB, et al. Spectrum of KV2.1 dysfunction in KCNB1-associated neurodevelopmental disorders. *Ann Neurol.* 2019;86(6):899–912.
24. Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, et al. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet.* 1998;18(1):53–5.
25. Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, et al. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet.* 1998;18:25–9.
26. Sicca F, Imbrici P, D'Adamo MC, Moro F, Bonatti F, Brovedani P, et al. Autism with seizures and intellectual disability: possible causative role of gain-of-function of the inwardly-rectifying K<sup>+</sup> channel Kir4.1. *Neurobiol Dis.* 2011;43(1):239–47.
27. Barcia G, Fleming MR, Deligniere A, Gazula V-R, Brown MR, Langouet M, et al. De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nat Genet.* 2012;44(11):1255–9.
28. Simons C, Rash LD, Crawford J, Ma L, Cristofori-Armstrong B, Miller D, et al. Mutations in the voltage-gated potassium channel gene KCNH1 cause Temple-Baraitser syndrome and epilepsy. *Nat Genet.* 2015;47(1):73–7.
29. Syrbe S, Hedrich UBS, Riesch E, Djémié T, Müller S, Møller RS, et al. De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy. *Nat Genet.* 2015;47(4):393–9.
30. Masnada S, Hedrich UBS, Gardella E, Schubert J, Kaiwar C, Klee EW, et al. Clinical spectrum and genotype–phenotype associations of KCNA2-related encephalopathies. *Brain.* 2017;140(9):2337–54.
31. Gitiaux C, Chemaly N, Quijano-Roy S, Barnerias C, Desguerre I, Hully M, et al. Motor neuropathy contributes to crouching in patients with Dravet syndrome. *Neurology.* 2016;87(3):277–81.
32. Goldman AM, Behr ER, Semsarian C, Bagnall RD, Sisodiya S, Cooper PN. Sudden unexpected death in epilepsy genetics: molecular diagnostics and prevention. *Epilepsia.* 2016;57(Suppl 1):17–25.
33. Schnitzler MM, Rinné S, Skrobek L, Renigunta V, Schlichthörl G, Derst C, et al. Mutation of histidine 105 in the T1 domain of the potassium channel Kv2.1 disrupts heteromerization with Kv6.3 and Kv6.4. *J Biol Chem.* 2009;284(7):4695–704.
34. Bekkers JM. Distribution and activation of voltage-gated potassium channels in cell-attached and outside-out patches from large layer 5 cortical pyramidal neurons of the rat. *J Physiol.* 2000;525(3):611–20.
35. Guan D, Tkatch T, Surmeier DJ, Armstrong WE, Foehring RC. Kv2 subunits underlie slowly inactivating potassium current in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol.* 2007;581(3):941–60.
36. Barba C, Parrini E, Coras R, Galuppi A, Craiu D, Kluger G, et al. Co-occurring malformations of cortical development and SCN1A gene mutations. *Epilepsia.* 2014;55(7):1009–19.
37. Rubboli G, Plazzi G, Picard F, Nobili L, Hirsch E, Chelly J, et al. Mild malformations of cortical development in sleep-related hypermotor epilepsy due to KCNT1 mutations. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;6(2):386–91.
38. Stevelink R, Sanders MWCB, Tuinman MP, Brilstra EH, Koeleman BPC, Jansen FE, et al. Epilepsy surgery for patients with genetic refractory epilepsy: a systematic review. *Epileptic Disord.* 2018;20(2):99–115.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Bar C, Kuchenbuch M, Barcia G, et al. Developmental and epilepsy spectrum of *KCNB1* encephalopathy with long-term outcome. *Epilepsia.* 2020;61:2461–2473. <https://doi.org/10.1111/epi.16679>



### **3. Comportement adaptatif et comorbidités psychiatriques dans l'encéphalopathie *KCNB1***

---

#### **3.1. Avant-propos**

Les deux premiers travaux présentés ci-dessus ont mis en évidence l'hétérogénéité phénotypique associée à l'encéphalopathie *KCNB1*, associant différents degrés de déficience intellectuelle, de troubles du comportement et des épilepsies de sévérité variable. Le recueil de données nous avait montré la difficulté d'obtenir une évaluation standardisée du trouble neurodéveloppemental de ces patients. Dans cette troisième étude, nous avons donc voulu aller plus loin dans le phénotypage de cette population en essayant d'affiner le profil neuropsychologique des patients.

Pour cela, nous avons distribué des questionnaires standardisés aux parents des patients français de notre série. Nous avons choisi d'évaluer le fonctionnement adaptatif à l'aide de la Vineland-II, une échelle de comportement adaptatif (Vineland Adaptive Behavior Scales, Second Edition, VABS-II), le comportement global avec l'Inventaire de Comportements (Childhood Behavioral Check-List, CBCL, Achenbach) et les troubles du spectre autistique (TSA) avec le Questionnaire de Communication Social (Social Communication Questionnaire, SCQ).

L'analyse de ces questionnaires confirmait l'atteinte développementale hétérogène mais constante chez tous les patients de l'étude, avec une prévalence importante de comorbidités psychiatriques (trouble de l'attention et TSA). L'analyse du comportement adaptatif selon l'âge des patients suggérait une stagnation du développement mais pas de régression au cours du temps. Grâce à une analyse originale en clusters, nous avons identifié 2 sous-groupes de patients dont l'un présentait un comportement adaptatif plus sévère que l'autre. Le facteur prédictif d'évolution vers l'un ou l'autre de ces 2 groupes était la sévérité du phénotype épileptique (EDE vs ED), confirmant les conséquences délétères de l'épilepsie précoce, en plus de l'impact de la mutation génétique, chez les patients avec une encéphalopathie *KCNB1*. Ce travail est accepté dans *Epilepsy&Behavior*.

#### **3.2. Article correspondant**

# Adaptive behavior and psychiatric comorbidities in *KCNBI* encephalopathy

Claire Bar<sup>1,2\*</sup>, Delphine Breuillard<sup>1,2\*</sup>, Mathieu Kuchenbuch<sup>1,2</sup>, Mélanie Jennesson<sup>3</sup>, Gwenaël Le Guyader<sup>4,5</sup>, Hervé Isnard<sup>6</sup>, Anne Rolland<sup>7</sup>, Diane Doummar<sup>8</sup>, Joel Fluss<sup>9</sup>, Alexandra Afenjar<sup>10</sup>, Patrick Berquin<sup>11</sup>, Anne De Saint Martin<sup>12</sup>, Sophie Dupont<sup>13,14</sup>, Alice Goldenberg<sup>15</sup>, Damien Lederer<sup>16</sup>, Gaétan Lesca<sup>17,18</sup>, Hélène Maurey<sup>19</sup>, Pierre Meyer<sup>20,21</sup>, Cyril Mignot<sup>22,23</sup>, Anca Nica<sup>24,25</sup>, Sylvie Odent<sup>26,27</sup>, Alice Poisson<sup>28</sup>, Emmanuel Scalais<sup>29</sup>, Tayeb Sekhara<sup>30</sup>, Pascal Vrielynck<sup>31</sup>, Giulia Barcia<sup>2,32</sup>, Rima Nababout<sup>1,2\*</sup>

## Affiliations:

<sup>1</sup> APHP, Reference centre for rare epilepsies, Department of Pediatric Neurology, Hôpital Necker-Enfants Malades, member of ERN EPICARE, Université de Paris, Paris, France

<sup>2</sup> Laboratory of Translational Research for Neurological Disorders, INSERM UMR 1163, Imagine Institute, Université de Paris, Paris, France

<sup>3</sup> Department of Pediatrics, American Memorial Hospital, Reims, France

<sup>4</sup> Department of Genetics, CHU de Poitiers, BP 577, 86021 Poitiers Cedex

<sup>5</sup> EA3808 - NEUVACOD Unité neurovasculaire et troubles cognitifs, Université de Poitiers, Pôle Biologie Santé

<sup>6</sup> Pediatric neurologist, medical office 28 rue de la république, Lyon 69002, France

<sup>7</sup> Department of Pediatrics, CHU de NANTES, Nantes, France

<sup>8</sup> Department of Pediatric Neurology, AP-HP, Hôpital Armand Trousseau, Sorbonne Université, Paris, France

<sup>9</sup> Pediatric Neurology Unit, Geneva Children's Hospital, 6 rue Willy-Donzé, 1211 Genève 4, Switzerland

<sup>10</sup> Sorbonne Universités, Centre de Référence Malformations et maladies congénitales du cervelet et déficiences intellectuelles de causes rares, département de génétique et embryologie médicale, Hôpital Trousseau, AP-HP, Paris, France

<sup>11</sup> Department of Pediatric Neurology, CHU Amiens-Picardie, Université de Picardie Jules Verne, Amiens France

Pediatric Neurology Unit

<sup>12</sup> Department of Pediatric Neurology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France

<sup>13</sup> Epileptology Unit and Rehabilitation Unit AP-HP, GH Pitie-Salpêtrière-Charles Foix, F-75013, Paris, France

<sup>14</sup> Sorbonne University, UPMC Univ. Paris 06, F-75005, Paris, France

<sup>15</sup> Centre de Référence Anomalies du Développement et Syndromes Malformatifs, CHU Rouen, Rouen, France

<sup>16</sup> Human Genetic Centre, IPG, Gosselies, Belgium

<sup>17</sup> Department of Genetics, Hospices Civils de Lyon, 69002 Lyon, France

<sup>18</sup> Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR 5310 - INSERM U1217, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1

<sup>19</sup> Department of Pediatric Neurology, AP-HP, Hôpital Universitaire Bicêtre, Kremlin Bicêtre, France

<sup>20</sup> Department of Pediatric Neurology, CHU Montpellier, Montpellier; France

<sup>21</sup> PhyMedExp, U1046 INSERM, UMR9214 CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France

<sup>22</sup> INSERM, U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06 UMR S 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, Paris, France

<sup>23</sup> APHP, Sorbonne Université, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Department of Genetics ; Centre de Référence Déficience Intellectuelle de Causes Rares

<sup>24</sup> Neurology Department, Center for Clinical Research (CIC 1414), Rennes University Hospital

<sup>25</sup> Laboratory Of Signal Processing (LTSI), UMR 1099 INSERM, Rennes F-35000

<sup>26</sup> Service de Génétique clinique, Reference centre for rare developmental abnormalities CLAD-Ouest, member of ERN ITHACA, CHU Rennes, France

<sup>27</sup> CNRS UMR 6290 Institut de Génétique et Développement de Rennes IGDR, Univ Rennes, Rennes, France

<sup>28</sup> GénoPsy, Reference Center for Diagnosis and Management of Genetic Psychiatric Disorders, Centre Hospitalier le Vinatier and EDR-Psy Team (Centre National de la Recherche Scientifique & Lyon 1 Claude Bernard University)

<sup>29</sup> Pediatric Neurology Unit, Centre Hospitalier de Luxembourg, Luxembourg

<sup>30</sup> Department of Pediatric Neurology, C.H.I.R.E.C, Brussels, Belgium

<sup>31</sup> William Lennox Neurological Hospital, Reference Center for Refractory Epilepsy UCLouvain, Ottignies, Belgium

<sup>32</sup> APHP, Department of Clinical Genetics, Necker-Enfants Malades Hospital, Paris, France

\*These authors contributed equally to this work

**Corresponding author:**

Rima Nabbout

Reference centre for rare epilepsies

Department of Pediatric Neurology

Necker Enfants Malades Hospital

149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France

Phone: +33 144381536

Email: [rimanabbout@yahoo.com](mailto:rimanabbout@yahoo.com)

## **Abstract**

Aim: *KCNB1* encephalopathy encompasses a broad phenotypic spectrum associating intellectual disability, behavioral disturbances and epilepsies of various severity. Using standardized parental questionnaires, we aimed to capture the heterogeneity of the adaptive and behavioral features in a series of patients with *KCNB1* pathogenic variants.

Methods: We included 25 patients with a *KCNB1* encephalopathy, aged from 3.2 to 34.1 years (median = 10 years). Adaptive functioning was assessed in all patients using the French version of the Vineland Adaptive Behavior Scales, Second Edition (VABS-II) questionnaire. We screened global behavior with the Childhood Behavioral Check-List (CBCL, Achenbach) and autism spectrum disorder (ASD) with the Social Communication Questionnaire (SCQ). We used a cluster analysis to identify subgroups of adaptive profiles.

Results: VABS-II questionnaire showed pathological adaptive behavior in all participants with a severity of adaptive deficiency ranging from mild in 8/20 to severe in 7/20. Eight out of 16 were at risk for Attention Problems at the CBCL and 13/18 were at risk for autism spectrum disorder (ASD). The adaptive behavior composite score significantly decreased with age (Spearman's  $\rho = -0.72$ ,  $p < 0.001$ ) but not the equivalent ages, suggesting stagnation and slowing but no regression over time. The clustering analysis identified two subgroups of patients, one showing more severe adaptive behavior. The severity of the epilepsy phenotype predicted the severity of the behavioral profile with a sensitivity of 70% and a specificity of 90.9%.

Conclusion: This study confirms the deleterious consequences of early onset epilepsy in addition to the impact of the gene dysfunction in patients with *KCNB1* encephalopathy. ASD and attention disorders are frequent. Parental questionnaires should be considered as useful tools for early screening and care adaptation.

## **Keywords**

*KCNB1*, developmental and epileptic encephalopathy, autism spectrum disorder, adaptive behavior, parental questionnaires, psychometric evaluation



## 1. Introduction

The recent development of high throughput sequencing techniques led to the identification of a large number of genes involved in neurodevelopmental disorders, associated or not with epilepsy. The phenotype of these pathogenic variants needs further delineation as one gene can be associated to different phenotypes or a spectrum of phenotypes. This delineation can help to achieve better care path and outcome prediction.

*KCNB1* codes for the  $\alpha$ -subunit of the voltage-gated potassium channel subfamily 2 (Kv2.1). Kv2.1 channels are widely expressed across the central nervous system, mediating delayed rectifier potassium current which is an important modulator of membrane repolarization in neuronal cells [1,2]. Pathogenic variants in *KCNB1* have initially been described in patients with infantile-onset epileptic encephalopathy [3,4]. However, recent studies have shown that *KCNB1* pathogenic variants can be associated with a broader phenotypic spectrum [4–7]. All reported individuals show early psychomotor developmental delay and mild to profound intellectual disability (ID) has been reported without formal psychometric evaluation. In addition, autistic features, impulsiveness, hyperactivity and aggressivity are clinically reported in more than half of individuals [5]. Most individuals (80%) develop epilepsy consisting either in developmental and epileptic encephalopathy (DEE) with infantile onset drug-resistant seizures or in developmental encephalopathy (DE) with late-onset and often pharmacoresponsive epilepsy [5]. Individuals with *KCNB1* DEE have a more severe long-term cognitive outcome compared to those with *KCNB1* DE [5,8]. The former denomination emphasizes the impact of early onset epilepsy on neuro-development in addition to the role of the gene dysfunction.<sup>3</sup> Pathogenic variants are either missense (80%) or truncating (20%) [6].\*

---

\* **Abbreviations** : ASD: autism spectrum disorder, CBCL: Childhood Behavioral Check-List, DE: developmental encephalopathy, DEE: developmental and epileptic encephalopathy, ID: intellectual disability, SCQ: Social Communication Questionnaire, VABS-II: Vineland Adaptive Behavioral Scale second edition

Despite small series reported, individuals with truncating variants seem to have less severe and less active epilepsy compared to those with missense variants [5].

We aim to explore the developmental phenotype of individuals harbouring pathogenic variants in *KCNBI* with standardized scales in order to better delineate their neurodevelopment profile and identify their special needs.

## **2. Patients and Methods**

### *2.1 Participants*

Individuals with *KCNBI* pathogenic variants were recruited through a European collaboration between the network of the French Reference Centre for Rare Epilepsies and other centers in Belgium, Switzerland and Luxembourg with the support of the families' association "KCNB1 France" [5]. French speaking families were included in this study. For each individual, we collected demographic data, information on epilepsy history and developmental milestones and details of the genetic *KCNBI* variant. We collected seizures' types, age at seizure onset and offset, epilepsy duration in months, number of current and tried antiseizure medications (ASM), current seizure frequency and drug response, age at sitting and walking achievement. Seizures and epilepsy types were determined according to the International League Against Epilepsy (ILAE) classification proposal [8]. Individuals with "KCNBI developmental and epileptic encephalopathy" (DEE) had active epilepsy (seizures and EEG) thought to interfere with the ongoing neurodevelopment with often early onset seizures. Individuals with "KCNBI developmental encephalopathy" (DE) had less active epilepsy, often with late onset and without regression or further slowing of development at seizure onset. This group also included individuals who did not develop seizures at the time of the study.

The study protocol was approved by the ethics committee of our institution and written informed consents were obtained for all participants.

## *2.2 Methods*

Questionnaires were proposed during a face to face clinic or were directly sent to the family after their information and approval. In both situations, parents were asked to fill the scales autonomously. In case for any further information and when the questionnaire had missing answers, the neuropsychologist (DB) contacted the family to complete missing data.

### *2.2.1 VABS-II*

Adaptive behavior was evaluated using the Vineland Adaptive Behavioral Scale second edition (VABS-II) [9]. This parental auto-questionnaire includes items clustered around 4 main domains: Communication (receptive, expressive, written communication skills), Daily Living Skills (personal, domestic and community interaction skills), Socialization (interpersonal relationships, play and leisure time, and coping skills) and Motor Skills (gross and fine). VABS-II provides an Adaptive Behavior Composite score that summarizes the individuals' skills in all four domains. Equivalent age correspond to the developmental age, i.e. age at which a typically developing person usually acquires a certain skill or behavior. Adaptive Behavior Composite and domains standardized scores (mean =100, standard deviation=15), adaptive levels (Low adaptive level, standard score (SS)=[20;70]; Moderately low, SS=[71;85]; Adequate, SS=[86;114]; Moderately high, SS=[115;129]; High, SS=[130;160]) and mean domain equivalent age were reported. For subdomains, v-scores (mean =15, standard deviation =3) and equivalent ages were reported. The motor scale for VABS-II shows a ceiling effect over 6 years so that motor scores were not reported for these individuals. We categorized the scores in four severity degrees of adaptive deficiency: no deficiency (>70), mild deficiency (50-69), moderate (35-49), severe (20-34) and profound deficiency (<20; according to IDC-10) [10].

### *2.2.2 Childhood Behavioral Check-List*

Childhood Behavioral Check-List (CBCL, Achenbach) was used in both preschool (18 months to 5 years old) and school (6 to 18 years old) versions [11].

CBCL questionnaire were not completed for individuals older than 18 years according to the age limitations of the scale. We explored in this study the scores common to the two age-related CBCL versions: Withdrawn/Depressed, Somatic complaints, Anxious/Depressed, Attention Problems, Aggressive Behavior, Internalized Behavior, Externalized Behavior and Total Score. Standardized T-scores were obtained (mean=50, standard deviation=10). T-scores over 70 are pathological and T-scores between 60 and 69 are considered as borderline scores.

### *2.2.3 Social Communication Questionnaire*

Social Communication Questionnaire (SCQ) “Life span version” is a tool used for ASD screening in individuals aged over 4 years [12]. A total score over 15 indicates a possible ASD and suggest further ASD diagnosis evaluation. We reported number of individuals at risk of ASD (scores above threshold).

### *2.3 Data analysis*

We used descriptive analysis to characterize our series. Variables assessed included gender, age, age of major developmental milestones, results of the screening of behavior and autism spectrum disorders (pathological or not) and the presence of epilepsy including current seizure frequency (more or less than 1 per month), epilepsy duration (quoted at 0 for individuals without epilepsy), total number of antiseizure medications previously and currently used and the presence of drug resistance. Normal and non-normal data were represented as median [25th–75th percentiles]. We performed a hierarchical cluster analysis in order to determine the number of clusters present in the subdomain of the VABS-2 (quoted as equivalent age). We chose the equivalent age based on our previous study on Dravet

syndrome showing a stagnation of the neurodevelopment development after the age of three with no loss of abilities [13]. This stagnation leads to a stability of the equivalent age scores, whereas the standardized age score decreases over time due to the continuation of neurodevelopmental acquisitions in the control group. Then, we used nonhierarchical k-means clustering to classify the individuals. To limit the impact of the selected start partitioning, the algorithm was repeated 500 times with a random start partitioning each time. Differences between the equivalent age scores in VABS-II subdomains of children belonging to different cluster subgroups were retrieved using Wilcoxon non-parametric test for numerical variables and chi-squared test for categorical variables. A p value less than 0.05 was considered a significant difference and a p value less than 0.1 a trend.

### **3. Results**

#### *3.1 Population*

Twenty-one individuals (10 males, 11 females) aged from 3.2 to 34.1 years (median = 10.1 [6.3-13.8] years) were included in this study. Nineteen of them have been identified from our previously reported series [5]. The two individuals not reported previously were female monozygotic twins aged 6 years-old and who carried the pathogenic variant p.Arg312His. They had quite similar developmental phenotype with autonomous walk acquired at 36 and 38 months and a severe language disorder. The first had only two febrile seizures at 18 months of age (individual #20) while the second had yearly febrile and non-febrile seizures since the age of 2 years (individual #21). They did not receive ASM.

All individuals achieved independent sitting at a median age of 13 [11-22] months and autonomous walk at a median age of 25 [21-37] months. Twelve individuals (12/21) were nonverbal after the age of 3. Eighteen individuals (18/21) had epilepsy. Median age at seizure onset was 29.5 [18-48] months (range = 10 months-24 years). The median epilepsy duration

was 37 [16-95] months. Eight individuals had *KCNBI* DEE and 13 had *KCNBI* DE including 3 without epilepsy at the time of this study (Table 1). Eight individuals had drug-resistant epilepsy. Seizure frequency reported with the questionnaire was daily in 6 individuals, monthly in 3 and yearly in 4. Seizures had remitted in 4 individuals who showed no seizures since at least 1 year.

### *3.2 Questionnaires results*

#### *3.2.1 VABS-II*

The adaptive behavior composite score was in the low range for 20/21 participants (median = 46 [25-58], Table 1). Individual #5, aged 3 years-old, had an adaptive behavior composite score in the moderately low range (71). Scores were in the low range in 21/21 for Communication, 20/21 for Daily Living Skills, 19/21 for Socialization and 6/6 for Motor Skills. For participants aged 7 years old and older, none reached the maximum score for the motor scale. The severity of the global adaptive deficiency was mild for 8/20, moderate for 5/20 and severe for 7/20.

Considering subdomains, mean v-scores ranged from 3.95 (Expressive in Communication; median = 4 [1-5]), to 7.48 (Domestic in Daily Life Skills; median = 8 [3-10]).

#### *3.2.2 CBCL*

CBCL questionnaire was filled by 16/21 caregivers whose children were aged < 18 years to fulfill the questionnaire age limits. Median standardized scores ranged from 51.5 [50-61.5] for Anxious/Depressed to 71 [66-80.3] for Attention Problems. For Attention Problems, 8/16 participants obtained scores in the pathological range and 6/16 in the borderline range. Second higher proportion of behavioral disturbances in CBCL was for the Aggressive behavior: 3/16 participants obtained scores in the pathological range and 3/16 in the borderline range.

#### *3.2.3 SCQ*

Social Communication Questionnaire was filled by 18/21 caregivers according to the age criteria for this questionnaire (> 4 years). Raw scores ranged from 7 to 37 (median = 20 [14.5-23.8]). Thirteen out of 18 participants had a score above the threshold of risk for ASD.

### *3.3 VABS-II and correlation to age*

Given the large age interval present in our population, we studied correlation between age at study and adaptive behavior scores. The adaptive behavior composite score decreased significantly with increasing age (Spearman's  $Rho = -0.72$ ,  $p < 0.001$ ). Regarding domains standardized scores, a significant decrease of the Communication score (Spearman's  $Rho = -0.67$ ,  $p < 0.001$ ), the Daily Living Skills score (Spearman's  $Rho = -0.74$ ,  $p < 0.001$ ) and the Socialization scores (Spearman's  $Rho = -0.86$ ,  $p < 0.0001$ ) were observed. However, the equivalent age in Communication, Daily Living Skills and Socialization domains were not correlated with the chronological age (Figure 1). Finally, we did not find any significant difference (Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ) between the chronological age of individuals "at risk" for attention problems (CBCL questionnaire) and ASD (SCQ questionnaire) compared to those "not at-risk".

### *3.4 Clustering analysis*

The clustering analysis based on equivalent ages for each subdomain of the VABS-II identified two clusters of individuals. The median adaptive profile of these 2 clusters is shown in Figure 2 and the comparison of the median score for each subdomain are reported in Table 2.

Cluster A included 10 individuals, 5 males and 5 females, and cluster B included 11 individuals, 6 males and 5 females. The cluster A individuals exhibited a lower level of adaptive behavior than cluster B individuals with significantly lower developmental ages in all subdomains (Table 2). The median adaptive behavior composite score was 37 [23.5-45.3] in cluster A and 58 [48.5-58.5] in cluster B ( $p = 0.02$ ).

In addition, more individuals in cluster A had a score indicating a risk of ASD at SCQ questionnaire (8/8) compared to cluster B (5/10,  $p = 0.04$ ). However, the number of individuals presenting pathological score for Attention Problems at CBCL questionnaire was not significantly different between the 2 clusters ( $p = 0.131$ ).

We then compared the demographic, clinical and genetic data of the individuals of the 2 clusters (Table 3). There was no significant difference in term of age at the time of the study. Epilepsy was present similarly in both clusters (9/10 individuals in cluster A and 9/11 in cluster B). However, individuals with epilepsy in cluster A showed a longer duration of epilepsy with an earlier onset, a higher frequency of seizures and more frequent drug resistance compared to individuals of cluster B. Epilepsy have been classified as DEE in 7/10 individuals in cluster A against 1/11 individual in cluster B. Therefore, the classification of the epilepsy phenotype into DEE vs DE predicted the severity of the behavioral profile with a sensitivity of 70% and a specificity of 90.9%.

### *3.5 Genotype-phenotype analysis*

Twenty individuals had a missense variant while one had a truncating variant. Six individuals aged from 3.6 to 34.1 years-old had the recurrent variant p.Arg312His, localized in the voltage-sensor S4 domain of the protein. They were distributed similarly in cluster A and B (3 versus 3). The 8 individuals with a mild adaptative deficiency (VABS-II adaptative composite score  $> 50$ ) had variable localization of the pathogenic variant: Four in the voltage-sensor S4 domain, three had variants in the S5 or S6 pore domains and one in the S1-S2 extramembrane linker domain. The small numbers did not allow further statistical analyses.

## **4.**

## **DISCUSSION**

We used standardized scores and tests based on parental questionnaires to delineate the neurodevelopmental phenotype of individuals with *KCNB1* encephalopathy. All individuals exhibit global dysfunction of their adaptive behavior in all domains (communication, daily



living skills, socialization and motor skills), present attention disorders and are at high risk of ASD. However, the adaptative behavior level was heterogeneous and ranged from mild to severe adaptative deficiency.

#### *4.1 Use of parental questionnaires*

The evaluation of adaptive skills is recommended for the diagnostic of intellectual disability together with the evaluation of reasoning skills (calculating an intellectual quotient) [9,14]. We did not perform intellectual evaluation in this study. This formal evaluation of cognitive functions using standardized performance tests is difficult to perform in this population because of a high rate of intellectual disability and behavioral disorders often leading to floor effects in scores. In another developmental encephalopathy, Dravet syndrome, the use of parental questionnaires as VABS-II show a high consistency with cognitive evaluation [15]. The use of such questionnaires relies on the care givers report with a risk of subjectivity but has the clear benefit of avoiding unreliable results due to the condition of the individual the day of the test, the difficulty to perform such tests due to the fatigue of difficulties of engagement in test sessions (child refuses, important psychomotor agitation, do not answer to questions, do not maintain enough attention on the tasks) and finally the floor effect in classical tests. Moreover, the families are usually the best party to evaluate the impact of chronic diseases as epilepsy on the everyday life [16]. These questionnaires might be useful also as remote evaluation avoiding long travel time for patients and families to reference centres that have the expertise and the human resources to perform such evaluations.

#### *4.2 ASD and attention problems*

We show here that 72% (13/18) of individuals are at risk for ASD at the SCQ questionnaire, supporting the need to screen for ASD in this group and perform diagnostic evaluations using gold standard tools such as ADOS-2 and ADI-R [17,18]. Early detection is recommended for a necessary specific care path and rehabilitation. Our study shows a consistent number of

individuals with attention disorders on CBCL and potential attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Almost half of individuals (8/18) show high score for attention disorders at parental hetero-questionnaires. This finding emphasizes the high occurrence of inattentive behavior and the possible benefit of targeted therapies. The use of methylphenidate should be evaluated and could be helpful in some individuals. The worsening effect of seizures is very unlikely and an individual balance benefit risk should be weighted [19]. Other behavioral domains are less frequently impaired in our population. Studies in populations with ID show behavioral complaints by caregivers such as aggressive behavior, social problems or anxiety [20,21]. On the CBCL questionnaire, assessment of psychopathology is less reliable for persons with moderate, severe or profound ID [22]. Therefore, we cannot exclude the presence of other psychiatric disorders and a child psychiatrist or psychiatrist evaluation should be proposed.

#### *4.3 Adaptive behavior and relation with age at study*

We explored in this study the correlation between the adaptive behavior and psychiatric profile and the age of the individuals at study (Figure 1). Standardized scores for VABS-II, which are scores corrected for age, were lower for older participants in our population for Communication, Daily Life Skills, Socialization as well as for global Adaptive behavior score. Yet, the use of standardized scores or developmental quotients cannot confirm the assumption of a worsening and regression over time [13]. When we considered the equivalent ages, not corrected for the chronological age of the participant, this correlation was no longer significant. These results suggest rather a progressive widening gap over time for adaptive profile between *KCNBI* patients and the typically developing reference population and not a progressive cognitive deterioration. More longitudinal data is needed to confirm this hypothesis. Concerning ASD and attentional screening, age of the participant did not differ

between at-risk and not at-risk groups, in favor of a relative stability of these comorbidities through age.

#### *4.4 Adaptive behavior and relation to epilepsy phenotype*

To go further in understanding the developmental spectrum of individuals with *KCNB1* variants, we performed an original clustering approach. This allowed the delineation of two subgroups with homogeneous profiles based on the interrelatedness of children's abilities across domains of functioning (Figure 2). The cluster A is composed of individuals with the most severe adaptive deficiency with median equivalent age below 15 months in all domains at an age range of 38 months to 34 years. The cluster B exhibited higher level of adaptive behavior with median equivalent age ranging from 25 months in expressive communication domain to 65 months in domestic daily life domain (Table 2). The risk for ASD was higher in the cluster A compared to the cluster B.

Individuals in both clusters, including those with a few seizures or even showing no epilepsy, showed abnormal development and an adaptive behavior deficiency. However, individuals with the most severe profile of adaptive behavior (cluster A) had the most severe epilepsy phenotype. This emphasizes that the early control of seizures might be crucial to limit the additional deleterious impact of seizures beyond the impact of the gene dysfunction. This shows mainly the relevance of the recent terminology of DEE versus DE with or without epilepsy [8]. This adds to this concept of a cumulative effect of the early onset epilepsy and of the pathogenic variant as shown in other conditions such as Dravet syndrome [13]. These findings support on one hand the need for the development of effective antiseizure medications dedicated to early onset seizures and on the other hand for the development of mechanistic and gene therapies hoping that this will offer a rescue of the gene defect and might improve globally the different aspects of the disorder including the seizures. The role of these mechanistic approaches in avoiding epilepsy development is to be further demonstrated.

#### 4.5 Limitations

This study included a limited number of individual and most of them have been referred by tertiary epilepsy centers which may have selected mostly patients with epilepsy and probably the severe spectrum of the developmental profile. The support and the participation of a young families' association (KCNB1 France) might have moderated this tendency and opened for a more holistic individual characteristic. The algorithm of the cluster analysis has been chosen due to its robustness in small sample size studies [23] but the two adaptative behavioral profiles should be validated on larger groups. Two main limits can be drawn with the VABS-II scale. The written communication subscale shows a floor effect as young participants obtain scores in the normal range or low limit while written language is not developed. The motor standardized scores showed a ceiling effect after the age of 7 years. Future studies might use more comprehensive evaluations exploring different dimensions of functioning to complete the picture of the behavioral profiles of individuals with *KCNB1* and other DEs.

### 5. Conclusion

This study describes the adaptive and behavioral profile of individuals with *KCNB1* encephalopathy using standardized hetero-questionnaires filled by caregivers. Individuals show an adaptive behavior deficiency and a high risk for attention disorders and ASD. Cluster analysis based on adaptive behavior scores delineated a more severe profile in DEE group compared to DE. This finding confirms the deleterious consequences of early and severe epilepsy in addition to the impact of the gene dysfunction. Our cross-sectional study emphasizes a trajectory of stagnation of the adaptive behavior without regression over age. The role of parental questionnaire and of the impact on adaptive behavior should be further

explored in order to better understand the natural history of these diseases, the outcome and to establish the most adapted care path.

## **Acknowledgments**

The authors thank the association “KCNB1 France” as well as all patients and their families from around the world for their participation in this study. We thank all biologists who conducted the genetic analysis of each patient reported here. This study was funded by grants from the Agence Nationale de la Recherche under “Investissements d’avenir” program (ANR-10IAHU-01), the Fondation Bettencourt Schueller (C. B. and R. N.) and the Ligue Française Contre l’Épilepsie (C.B).

## **Disclosure of Conflicts of Interest**

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

## **Ethical Publication Statement**

We confirm that we have read the Journal’s position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

## References

- [1] King AN, Manning CF, Trimmer JS. A Unique Ion Channel Clustering Domain on the Axon Initial Segment of Mammalian Neurons. *J Comp Neurol* 2014;522:2594–608. <https://doi.org/10.1002/cne.23551>.
- [2] Trimmer JS. Immunological identification and characterization of a delayed rectifier K<sup>+</sup> channel polypeptide in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:10764–8.
- [3] Torkamani A, Bersell K, Jorge BS, Bjork RL, Friedman JR, Bloss CS, et al. De novo KCNB1 mutations in epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* 2014;76:529–40. <https://doi.org/10.1002/ana.24263>.
- [4] de Kovel CGF, Syrbe S, Brilstra EH, Verbeek N, Kerr B, Dubbs H, et al. Neurodevelopmental Disorders Caused by De Novo Variants in *KCNB1* Genotypes and Phenotypes. *JAMA Neurol* 2017;74:1228. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.1714>.
- [5] Bar C, Kuchenbuch M, Barcia G, Schneider A, Jennesson M, Guyader GL, et al. Developmental and epilepsy spectrum of KCNB1 encephalopathy with long-term outcome. *Epilepsia* 2020;61:2461–73. <https://doi.org/10.1111/epi.16679>.
- [6] Bar C, Barcia G, Jennesson M, Le Guyader G, Schneider A, Mignot C, et al. Expanding the genetic and phenotypic relevance of KCNB1 variants in developmental and epileptic encephalopathies: 27 new patients and overview of the literature. *Hum Mutat* 2020;41:69–80. <https://doi.org/10.1002/humu.23915>.
- [7] Marini C, Romoli M, Parrini E, Costa C, Mei D, Mari F, et al. Clinical features and outcome of 6 new patients carrying de novo KCNB1 gene mutations. *Neurol Genet* 2017;3. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000206>.
- [8] Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for

- Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017;58:512–21.  
<https://doi.org/10.1111/epi.13709>.
- [9] Sparrow SS, Balla DA, Cicchetti DV. Vineland-II adaptive behavior scales. AGS Publishing; 2005.
- [10] World Health Organization. The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva: World Health Organization; 1992.
- [11] Achenbach TM, Rescorla LA. ABESA school age forms and profiles. University of Vermont; 2001.
- [12] Rutter M, Bailey A, Lord C. The social communication questionnaire: Manual. Western Psychological Services. 2003.
- [13] Nabbout R, Chemaly N, Chipaux M, Barcia G, Bouis C, Dubouch C, et al. Encephalopathy in children with Dravet syndrome is not a pure consequence of epilepsy. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:176. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-176>.
- [14] Schalock RL, Borthwick-Duffy SA, Bradley VJ, Buntinx WHE, Coulter DL, Craig EM, et al. Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Supports. Eleventh Edition. American Association on Intellectual and Developmental Disabilities; 2010.
- [15] Ouss L, Leunen D, Laschet J, Chemaly N, Barcia G, Losito EM, et al. Autism spectrum disorder and cognitive profile in children with Dravet syndrome: Delineation of a specific phenotype. *Epilepsia Open* 2018;4:40–53.  
<https://doi.org/10.1002/epi4.12281>.
- [16] Nabbout R, Auvin S, Chiron C, Irwin J, Mistry A, Bonner N, et al. Development and content validation of a preliminary core set of patient- and caregiver-relevant



- outcomes for inclusion in a potential composite endpoint for Dravet Syndrome. *Epilepsy Behav* 2018;78:232–42. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.08.029>.
- [17] Lord C, Rutter M, DiLavore PC, Risi S, Gotham KY, Bishop SL. ADOS 2. Autism Diagnostic Observation Schedule-2. Manual. Western Psychological Services. USA: 2015.
- [18] Le Couteur A, Lord C, Rutter M. The autism diagnostic interview-revised (ADI-R). Los Angeles, CA: Western Psychological Services; 2003.
- [19] Besag F, Gobbi G, Caplan R, Sillanpää M, Aldenkamp A, Dunn DW. Psychiatric and Behavioural Disorders in Children with Epilepsy (ILAE Task Force Report): Epilepsy and ADHD. *Epileptic Disord Int Epilepsy J Videotape* 2016. <https://doi.org/10.1684/epd.2016.0811>.
- [20] Dekker MC, Koot HM, Ende J van der, Verhulst FC. Emotional and behavioral problems in children and adolescents with and without intellectual disability. *J Child Psychol Psychiatry* 2002;43:1087–98. <https://doi.org/10.1111/1469-7610.00235>.
- [21] Green SA, Berkovits LD, Baker BL. Symptoms and Development of Anxiety in Children With or Without Intellectual Disability. *J Clin Child Adolesc Psychol* 2015;44:137–44. <https://doi.org/10.1080/15374416.2013.873979>.
- [22] Koskentausta T, Iivanainen M, Almqvist F. CBCL in the assessment of psychopathology in Finnish children with intellectual disability. *Res Dev Disabil* 2004;25:341–54. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2003.12.001>.
- [23] Steinley D, Brusco MJ. Evaluating mixture modeling for clustering: recommendations and cautions. *Psychol Methods* 2011;16:63–79. <https://doi.org/10.1037/a0022673>.



Table 1. Clinical data and scores of adaptative functioning and behavioral scales.

No. <sup>a</sup>	Age (y)	Gender	KCNBI variant	Epilepsy/phenotype	Age at sz onset (m)	Current number of AED	VABS-II					CBCL	SCQ	
							Communication	Daily Life skill	Socialization	Motor skills <sup>b</sup>	Global Composite score	Level of adaptive deficiency	Attention score <sup>c</sup>	Total score <sup>c</sup>
1 (1)	29.2	M	p.Glu43Gly	Yes/DEE	16	5	21	21	20	-	20	Severe	-	20**
2 (3)	11.0	M	p.Thr210Arg	Yes/DE	48	2	57	62	59	-	59	Mild	-	7
3 (5)	3.8	F	p.Arg306Cys	Yes/DE	20	1	69	81	85	64	71	-	73*	-
4 (6)	7.1	F	p.Arg306Cys	Yes/DE	48	1	30	65	76	-	58	Mild	77*	9
5 (7)	24.1	M	p.Arg312Cys	Yes/DE	288	0	21	29	23	-	20	Severe	-	37**
6 (8)	34.1	M	p.Arg312His	Yes/DEE	18	2	21	21	20	-	20	Severe	-	20**
7 (9)	13.5	M	p.Arg312His	Yes/DE	60	1	31	47	47	-	40	Moderate	78*	24**
8 (11)	3.6	F	p.Arg312His	Yes/DEE	26	2	49	51	66	43	50	Mild	67	-
9 (12)	19.3	M	p.Arg312His	Yes/DE	60	1	26	25	32	-	23	Severe	-	17**
10 (13)	31.8	M	p.Ser319Phe	Yes/DEE	13	1	21	21	20	-	20	Severe	-	25**
11 (14)	3.2	M	p.Thr323Ile	Yes/DEE	21	1	42	51	59	43	47	Moderate	80*	-
12 (16)	4.8	F	p.leu334Pro	Yes/DE	33	0	42	43	57	40	43	Moderate	57	16**
13 (17)	10.8	M	p.Ser347Arg	Yes/DE	18	1	57	59	59	-	58	Mild	81*	26**
14 (19)	13.8	M	p.Trp369Arg	Yes/DEE	10	3	31	43	34	-	33	Severe	69	23**
15 (23)	7.7	F	p.Val378Leu	Yes/DE	92	0	54	62	55	-	58	Mild	91*	9
16 (28)	8.7	F	p.Gly394Arg	Yes/DEE	42	2	42	48	50	-	46	Moderate	82*	21**
17 (29)	10.1	F	p.Gly395Arg	Yes/DEE	12	1	42	40	45	-	41	Moderate	68	20**
18 (32)	8.7	M	p.Ile409Thr	No/DE	-	0	70	62	62	-	64	Mild	92*	23**
19 (36)	12.4	F	p.Arg583Term	No/DE	-	0	31	23	34	-	25	Severe	57	26**
20	6.3	F	p.Arg312His	No/DE	-	0	52	64	68	56	57	Mild	66	13
21	6.3	F	p.Arg312His	Yes/DE	36	0	52	62	68	61	58	Mild	66	14
Median	10,1				29.5	1	42	48	55	49.5	46		71	20
[IQ]	[6.3-13.8]				[18-48]	[0-2]	[30-52]	[29-62]	[34-62]	[43-59.8]	[25-58]		[66-80.3]	[14.5-23.8]

IQ, interquartile range ; y, years; sz : seizure ; AED, antiepileptic drugs ; VABS-II, Vineland Adaptive Behavioral Scale second edition; CBCL, Childhood Behavioral Check-List ; SCQ, Social Communication Questionnaire.

<sup>a</sup> The number reported in parentheses corresponds to the patient's number in the paper of Bar et al., 2020.

<sup>b</sup> VABS-II motor score was not reported for patients older than 6 years-old due to ceiling effect

<sup>c</sup> Missing data is related to the age limits of the questionnaire

\* scores above the pathological threshold, \*\* "at risk" scores

Table 2. Comparison of median equivalent ages (in months) across dimensions of functioning of the VABS-2 questionnaire between clusters.

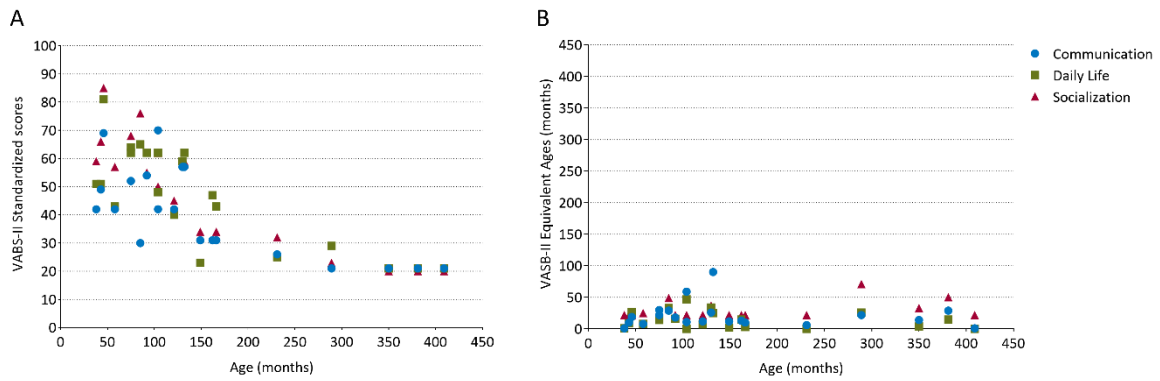
		Cluster A (n=10)	Cluster B (n=11)	p-value
Sex (M/F)		5/5	6/5	1.0
Age at study (y)		11.3 [5.8-17.9]	8.7 [6.7-12.3]	0.78
Age at sitting position (m)		20 [11.5-24]	12 [9.5-17]	0.09
<b>Domains</b>	<b>Subdomains</b>	<b>Cluster A</b>	<b>Cluster B</b>	<b>p-value</b>
Age at independent walk (m)		33.5 [24.8-48.5]	24 [19.5-33]	0.17
Epilepsy	Receptive	9 10[6,5-11,75]	9 26[20,5-29,5]	<10 <sup>-4</sup>
Communication	Expressive	2,5[0,25-6,25]	25[15,5-30]	1.10 <sup>-4</sup>
Epilepsy duration (m)	Written	85.5 [17-153]	16 [0-54,5]	0.08
Number of AED tested		22[22-22]	29[22-49,5]	0,049
Number of AED tested	Personal	7 [3,3-13]	9[6,5-17,75]	2 [0,4]
Drug resistant epilepsy	Domestic	7 7[7-18,25]	1 65[44-71]	0.008 <sup>-4</sup>
Seizure frequency (>1 per mo)	Community	7 0[0-0]	0 34[27-49,5]	0.001 <sup>-4</sup>
DEE phenotype	Interpersonal relationships	4,5[3,25-5,75]	1 28[18-30]	0.005 <sup>-4</sup>
Socialization	Play & leisure time	5[2,5-8,5]	31[26-44,5]	<10 <sup>-4</sup>
	Coping skills	7[1,75-11,5]	36[35-42]	<10 <sup>-4</sup>
Motor skills	Gross Motor	13,5[11-18,25]	31[30-40]	1.10 <sup>-4</sup>
	Fine Motor	7[6-13]	32[23-36]	1.10 <sup>-4</sup>

M, male; F, female; y, years; m, months; AED, antiepileptic drug; DEE, developmental and epileptic encephalopathy.

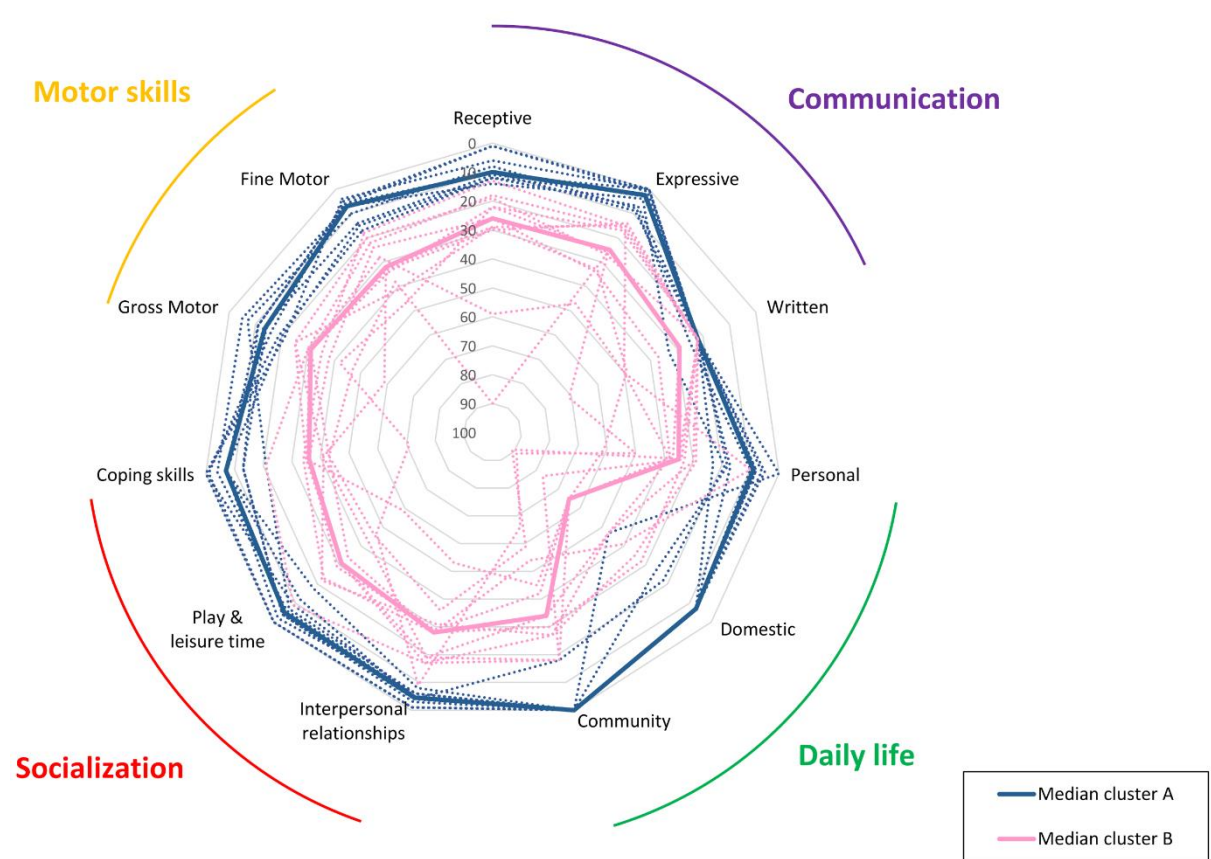
Table 3. Clinical characteristics of the population and analysis of between-cluster differences.

**Figures**

**Figure 1.** Standardized scores (A) and equivalent ages (B) at each subdomain of the VABS-II questionnaire in our series.



**Figure 2.** Comparison of the equivalent age (in months) for each subdomain of the VABS-II questionnaire between cluster A (blue) and cluster B (pink).





## 4. Etude du phénotype comportemental associé à la perte de fonction de *kcnb1* chez le poisson-zèbre

---

### 4.1. Avant-propos

En parallèle du travail de phénotypage clinique de patients avec une encéphalopathie *KCNBI*, nous avons travaillé sur le phénotypage de modèles poissons-zèbres avec perte de fonction de *kcnb1*. Pour cela, nous avons utilisé la lignée *kcnb1* knockout (poissons-zèbres « mutants ») développée par l'équipe du Dr Korzh en Pologne (H. Shen et al., 2016) et nous avons généré un modèle *kcnb1* knockdown (poissons-zèbres « morphants ») en utilisant un oligonucléotide anti-sens (AMO). L'objectif de ce travail était d'étudier les caractéristiques phénotypiques comportementales au cours du développement précoce de ces poissons-zèbres dans une perspective de recherche translationnelle dans l'encéphalopathie *KCNBI*. Pour cela, nous avons utilisé des protocoles bien établis permettant d'évaluer l'activité locomotrice des embryons et larves de poissons-zèbres à différents stades de leur développement. Nous avons montré que l'inhibition partielle (morphants) ou totale (mutants) de *kcnb1* induisait une diminution des contractions stéréotypés de la queue des poissons à 28 hpf, traduisant une perturbation de l'installation des réseaux neuronaux spinaux responsable de ce phénotype précoce. Les morphants *kcnb1* avaient un comportement locomoteur similaire à leurs contrôles entre 3 et 6 dpf, supposant une diminution rapide de l'inhibition. A l'inverse, les poissons mutants *kcnb1*<sup>+/-</sup> et *kcnb1*<sup>-/-</sup> avaient une hyperactivité locomotrice à 48 hpf associée à une trajectoire de nage circulaire, compatible avec le stade 2 du phénotype épileptique décrit par l'équipe de Baraban (Baraban et al., 2005) et rapporté dans d'autres modèles poissons-zèbres d'épilepsie génétique (Baraban et al., 2013; de Calbiac et al., 2018). La réponse motrice au PTZ à 4 jpf était augmentée chez les poissons morphants et mutants, traduisant une diminution du seuil épileptogène comparé aux contrôles. Ces résultats préliminaires soutiennent l'hypothèse de mécanismes perte-de-fonction responsables du phénotype de l'encéphalopathie *KCNBI*, comme suggéré par les études fonctionnelles (Kang et al., 2019). La caractérisation phénotypique va se poursuivre au niveau physiologique, histologique et moléculaire afin de valider ces modèles, d'étudier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents et d'ouvrir la voie au criblage moléculaire à haut débit.

### 4.2. Article correspondant (résultats préliminaires)

## **Phenotypic characterization of *kcnb1* loss of function in developmental zebrafish** (preliminary results)

### **1. Introduction**

*KCNBI* encodes the pore-forming  $\alpha 1$  subunit of the voltage-gated potassium channel subfamily 2 ( $K_v2.1$ ).  $K_v2.1$  is widely and robustly expressed across the central nervous system, especially in large clusters on the soma, proximal dendrites, and axonal initial segment of neurons (Trimmer, 1991; Du et al., 1998; Sarmiere et al., 2008; Bishop et al., 2015). These channels mediate a delayed-rectifier outward potassium current that contribute to membrane repolarization and hyperpolarization, modulating neuronal excitability *via* activity-dependent regulation of  $K_v2.1$  phosphorylation. In addition to their conducting function,  $K_v2.1$  channels are also involved in intracellular protein trafficking and calcium signaling (Antonucci et al., 2001; Johnson et al., 2018).

Pathogenic variants in *KCNBI* have been reported in patients with developmental and epileptic encephalopathy, but also in patients with developmental encephalopathy with late-onset and pharmaco-responsive epilepsy, or without epilepsy (Bar, Kuchenbuch, et al., 2020; de Kovel et al., 2017; Marini et al., 2017). All patients exhibit poor long-term outcome with severe intellectual disability in most patients and high risk for attention disorders and autism spectrum disorder (ASD) (Bar, Kuchenbuch, et al., 2020). Truncating variants have been associated with a less severe epileptic phenotype. Several *KCNBI* variants have been functionally characterized *in vitro* and shown variable degree of loss of function with dominant negative effects, including reduced  $K_v2.1$  conductance and altered ion selectivity, expression and localization (Torkamani et al., 2014; Saitsu et al., 2015; Thiffault et al., 2015; Kang et al., 2019). These results have been confirmed in rodent models with decreased delayed-rectifier potassium current in hippocampal neurons cultured from *Kcnb1* knockout model ( $K_v2.1^{-/-}$ ) (Specia et al., 2014) and decreased expression of  $K_v2.1$  with dominant negative effects on co-expressed WT  $K_v2.1$  subunits in *Kcnb1* knock-in model (*Kcnb1*<sup>G379R</sup>) (Hawkins et al., 2021). Both rodent models exhibited behavioral alteration including locomotor hyperactivity and reduced anxiety-like behavior associated with lower chemoconvulsant seizure thresholds (Specia et al., 2014; Hawkins et al., 2021). Spontaneous seizures were only reported in homozygous knock-in *Kcnb1*<sup>RR</sup> mice. However, the pathogenic pathways underlying *kcnb1* encephalopathy have not yet been elucidate and limitations in



rodent experimentations do not allow rapid drug screens. In the last decade, zebrafish has emerged as an interesting species for modeling human brain disorders due to the relative ease of genetic manipulation, rapid development, and small size amenable to high-throughput screening methods. In particular, the utility of zebrafish to mimic aspects of epilepsy has been first demonstrated in a model of chemically-induced seizures using the convulsant drug pentylenetetrazole (PTZ). PTZ induces seizure-like behavior in zebrafish larvae consisting in stereotypical swimming abnormalities with locomotor hyperactivity (stage I), circular trajectories (stage 2) and clonus-like convulsions (stage 3), correlated with epileptiform-like electrographic activity in the zebrafish optic tectum. The relevance of zebrafish as modeling epilepsy was further confirmed in genetic models such as Dravet syndrome (Baraban et al., 2013; Zhang et al., 2015), *STXBPI* encephalopathy (Grone et al., 2016), pyridoxine-dependent epilepsy (Pena et al., 2017), tuberous sclerosis complex (Scheldeman et al., 2017) or *DEPDC5* related epilepsies (de Calbiac et al., 2018; Swaminathan et al., 2018). Characterization of epilepsy-like behavior have been possible as early as 28 hours post fertilization (hpf), when embryos exhibit stereotyped premotor activity, supporting zebrafish as suitable for studying early neurodevelopmental diseases (de Calbiac et al., 2018). Additionally, drug screening in zebrafish larvae has also been performed in genetic epilepsy models, especially in Dravet syndrome (Baraban et al., 2013; Zhang et al., 2015). There is only one orthologue of *KCNBI* in zebrafish (*Kcnbl*) which share 67% homology with the human *KCNBI*. Its expression increases during zebrafish development, beginning at 19 hpf in zebrafish embryos and mainly found in in the brain in adult zebrafish, with a tissue-specific expression similar to adults mammals (Jedrychowska et al., 2021). A first *kcnbl* zebrafish knock-out mutant have been generated using CRISPR/Cas9 site-specific mutagenesis, leading to a premature termination codon between the N-terminal cytoplasmic domain and the first transmembrane domain (H. Shen et al., 2016). Phenotypic characterization of homozygous mutants *kcnbl*<sup>-/-</sup> revealed small proportion of gastrulation defect and reduced brain ventricles (H. Shen et al., 2016) along with disruption of the inner ear development (Jedrychowska et al., 2021), highlighting the importance of *kcnbl* in developmental signaling pathways. Survival rate was decreased in mutants *kcnbl* adult zebrafish compared to wild-type. However, behavioral phenotyping and especially epilepsy-like behavior had not yet been studied in this mutant model.

In this study, we therefore aimed to describe the behavioral phenotype associated with *kcnbl* loss-of-function (LOF) in the developing zebrafish, looking for relevant phenotypic features of *KCNBI* encephalopathy. Toward this end, we performed standardized and

quantitative behavioral analysis between 24 hpf and 5 dpf in embryos and larvae of the existing *kcnbl* knock-out model (mutant model) and a transient knockdown *kcnbl* model (morphant model) generated by the use of an antisense morpholino oligonucleotide (AMO).

## 2. Materials and methods

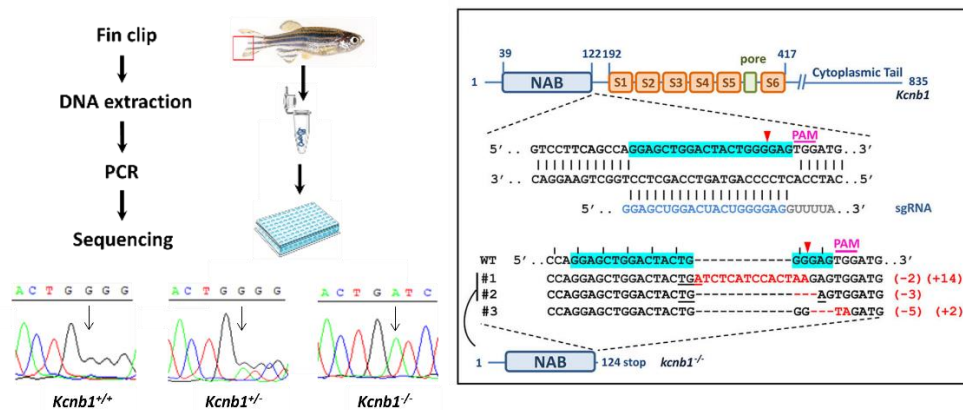
### 2.1. Zebrafish Maintenance

Adult and larval zebrafish (*Danio rerio*) were maintained at the Imagine Institute (Paris, France) fish facility and bred according to the National and European Guidelines for Animal Welfare. Experiments were performed on wild-type embryos and larvae from AB and TU strains (Tübingen, Allemagne) and from the previously reported *kcnbl* mutant zebrafish line (see below, H. Shen et al., 2016). Fertilized eggs were collected via natural spawning and placed per batch of 50 individuals in 100 mm Petri dishes filled with embryo medium: 0.06 g/L aquarium salt (Instant Ocean, Blacksburg, VA) in reverse osmosis water +0.01 mg/L methylene blue. Embryos and larvae zebrafish were raised at  $28 \pm 0.2$  ° C in an AQUALYTIC incubator (DirectIndustry, Marseille, France) until further experiments proceed. Embryos were staged in terms of hours post fertilization (hpf) based on morphological criteria (Kimmel et al., 1995).

### 2.2. Generation of *kcnbl* mutant zebrafish

Heterozygous embryos from *kcnbl* mutant zebrafish line were kindly provided by Dr. Vladimir Korzh (International Institute of Molecular and Cell Biology of Warsaw, Poland). This *kcnbl* mutant line was generated by CRISPR/Cas9 mutagenesis. The targeted allele carried a deletion of 2 bases and an insertion of 14 bases in the exon 1, resulting in a premature stop codon between the between the N-terminal cytoplasmic domain and the first transmembrane domain (H. Shen et al., 2016). We raised *kcnbl*<sup>+/-</sup> mutant fish until adulthood and we then crossed *kcnbl*<sup>+/-</sup> males and *kcnbl*<sup>+/-</sup> females to obtain *kcnbl*<sup>+/-</sup> and *kcnbl*<sup>-/-</sup> zebrafish mutant lines for all experiments of phenotypic analysis. Offspring genotypes were screened through high-precision sequencing (GATC Biotech, Eurofins Genomics). DNA was extracted by cutting a part of the fin from adult zebrafish. Prior to fin-clipping, the adult zebrafish were anesthetized in tricaine (160 µg/mL). A part of their caudal fin was cut and put in 75 µL of extraction solution (25mM NaOH, 0,2 mM EDTA). The samples were then incubated at 98°C for 1 hour and 75 µL of a Tris-HCl (40 mM, pH 5.5) solution was added to the tubes before centrifugation at 4000 rpm for 3 minutes. The samples were amplified by

PCR using Taq polymerase Master Mix (Thermo Scientific K1071) and the following primers: CTGGGAAGCTGCACATGATG (forward primer) and TTGATGGTATCTGGCCTGGC (reverse primer). The PCR products were then sent to GATC Biotech for sequencing (Figure 23).



**Figure 23. Genotyping process of *kcnb1* mutant line.** Adults' offspring of *kcnb1* heterozygous incross were genotyped through sequencing of DNA extracted from fin clip (figure de gauche). Identification of *kcnb1*<sup>+/+</sup>, *kcnb1*<sup>+/-</sup> and *kcnb1*<sup>-/-</sup> were performed based on the sequence of *kcnb1* mutant #1 reported by Shen et al. (figure de droite).

### 2.3. Microinjections of oligonucleotides in zebrafish embryos

Antisense Morpholino oligonucleotides (AMOs) were used to knockdown the expression of the sole orthologue of the *KCNB1* gene in zebrafish. AMO were designed and synthesized by Gene Tools, LLC (Philomath, OR, USA). The target for partial knockdown was the ATG codon of *kcnb1* transcript. A control AMO (Ctrl-AMO), containing five mismatch nucleotides and not binding anywhere in the zebrafish genome, was used to assess the specificity of the observed phenotype. Working concentrations for the *kcnb1* AMO were established from dose-dependent toxicity curves. The optimal AMO concentration for injections was 0.75 mmol/L, determined as the point on the toxicity curve where there was no significant increase in the percentage of morphologically deformed larvae. The microinjections were carried out at one cell stage or two-cell stage embryos under control of a binocular microscope (Olympus SZX9, 10X).

### 2.4. Morphological phenotyping

For each experiment, eggs, embryos and larvae were checked daily and maintained in petri dish in a 28.5°C incubator for the first 6 days post-fertilization (dpf). Embryos and larvae were visually inspected for severe malformations (e.g., pericardial edema, body axis curvature, hemorrhage) and mortality was assessed from 0 to 6 dpf. For morphological analysis, larvae of each condition were photographed once a day between 3 and 6 dpf using a stereomicroscope (SZX16, Olympus Life Science, Rungis, France) equipped with a 16S2M Blackfly S GigE camera (FLIR Systems Inc., Oregon, USA). Measurements were performed manually with ImageJ software, including the head and body length, body area, the cranial perimeter and the distance between the eyes (Figure 24).



**Figure 24. Morphological analysis of zebrafish larvae.** (A) The length of the body (yellow arrow), the head (red arrow) and (B) the head perimeter (red line) and the distance between the eyes (yellow line) were measured. Values were normalized with body length.

## 2.5. Behavioral phenotyping

### 2.5.1. Premotor stereotyped behavior

The first stereotyped locomotor behavior of zebrafish embryos consist of an early period of transient spontaneous coiling contractions observed between 17 and 30 hpf (Saint-Amant & Drapeau, 1998). An increased of this premotor activity have been reported in the *depdc5* zebrafish epilepsy model (de Calbiac et al., 2018). We used a modified protocol of this study to measure spontaneous tail coiling activity in zebrafish embryos from 24 to 32 hpf (Calbiac et al., 2021). For each condition, groups of 10 zebrafish embryos still in their chorion were arrayed into a 100 mm petri dish filled with embryo medium and placed under a stereomicroscope with darkfield illumination (SZX16, Olympus Life Science, Rungis, France). An acclimation period of 5 min was defined to minimize disturbance due to embryos transfer and manipulation. Sixty-seconds movies were obtained with a camera (16S2M Blackfly S GigE, FLIR Systems Inc.), recorded at a frame rate of 70 frames per seconds using SpinView software (FLIR Systems Inc). Movies were obtained in Motion-JPEG compression format and visualized on ImageJ. Coiling or tail flicking events of each embryo were manually counted by an observer blind to the condition (Figure 25).

### **2.5.2. Touch-evoked escape response (TEER)**

At 48 hpf, zebrafish embryos that had not enclosed were manually dechorionated and the morphology was assessed with a stereomicroscope (Figure 25). To perform the TEER test, 50 hpf embryos of normal morphology were placed in the middle of a petri dish with the diameter of 150 mm filled with embryo water at room temperature. As previously described, zebrafish embryos were touched on the tail with a plastic pipette tip to trigger the TEER (Calbiac et al., 2021; Ciura et al., 2013; de Calbiac et al., 2018) which was recorded with a camera (16S2M Blackfly S GigE, FLIR Systems Inc.) at 30 fps using SpinView software (FLIR Systems Inc). The swimming trajectory was traced using the Manual tracking Plug-in (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/manual-tracking.html>) in ImageJ software (NIH). All the consecutive frames recorded from the onset to the end of the swimming episode were analyzed to obtain the x–y coordinates which were used for calculating the distance, velocity, and turning angle. The tortuosity of the trajectory was quantified as the average angle of deviation from a rectilinear trajectory, calculated frame by frame for the individual segments of the pathway projection.

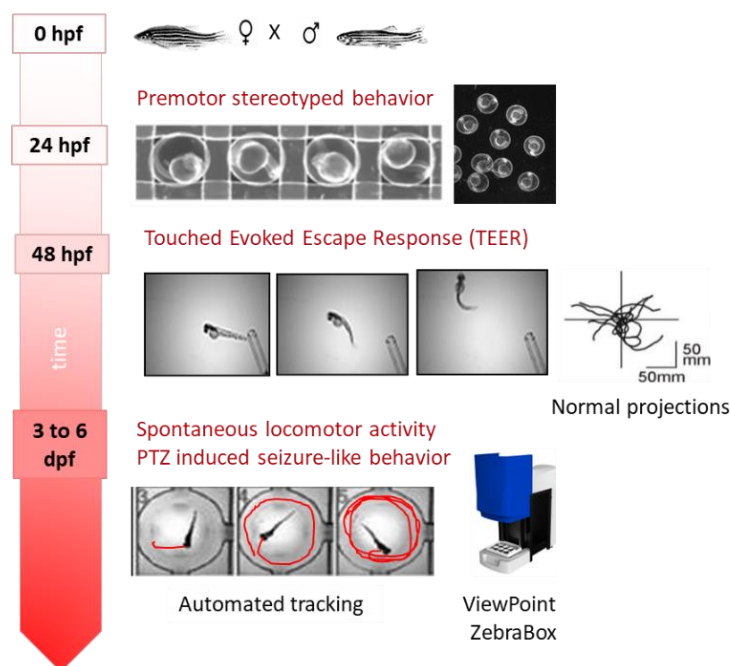
### **2.5.3. Spontaneous locomotor activity**

A ViewPoint setup combined with an automated computer recording system equipped with Zebralab 438 software (Viewpoint, Lyon, France) was used to measure locomotor activity from 3 to 6 dpf (Figure 25). Zebrafish larvae were placed in a 96-well plate (one larva per well) filled with 250 µl of embryo medium. Plates were placed in the Zebrabox with the temperature set at 28°C and the lights off and larvae were allowed to acclimate for thirty minutes prior to analysis. An infrared light constantly illuminates the Zebrabox, allowing the camera to record movement independent of light (ZebraBox, Viewpoint, Lyon, France). Threshold detection settings to identify objects darker than the background were optimized for each experiment. Movement detection thresholds were set at 5.0mm/sec and 2mm/sec for the small/large threshold and the inactive/small threshold respectively. Activities below 2, from 2 to 5, and above 5 were designated by the software as ‘inactive’, ‘small movement’ and ‘large movement’, respectively. After acclimation, larvae activity was recorder according to each protocol using the motility tracking software. For analysis of spontaneous locomotor activity, we used a protocol of 20 minutes recording under dark exposure. For analysis of light-induced activity, we used a protocol of 60 minutes recording split into 10 minutes blocks alternating light and dark conditions. Video recordings were performed at the same time

during daytime period. Locomotion plots were obtained for one fish per well at a recording epoch of 1 min and were analyzed for total distance travelled (in centimeters), large distance travelled (high speed threshold  $> 20$  mm/s) and mean velocity (in centimeters per second).

#### **2.5.4. Pentylentetrazole (PTZ) induced seizure-like behavior**

For PTZ assays, zebrafish larvae were placed in a 96-well plate (one larva per well) filled with embryo medium. After acclimation, larval activity was recorded using the motility tracking software for thirty minutes to determine baseline activity levels for each plate. During this run, powdered PTZ (Sigma-Aldrich (P6500), St Louis, MO) was dissolved into egg water in order to make a fresh working stock for each experiment. After the baseline activity run, the same volume of embryo medium or PTZ stock was added to each well for a final concentration of 5 or 10mM PTZ. Larvae activity was then recorded using the motility tracking software for another thirty minutes to determine larval responses to PTZ. Tracking data for each animal was collected every 5 minutes for the duration of the experiment (1 hour), which allowed us to quantify the distance moved (in cm) of individual larva before and after drug treatment. Each experimental assay was performed at the same relative time of day.



**Figure 25. Behavioral phenotyping protocol of *kcnb1* mutant and morphant zebrafish.** From 24 to 32 hpf, the number of spontaneous tail coiling of zebrafish embryos still in the chorion was recorded. At 50 hpf, the trajectories of the touched-evoked escape response (TEER) were evaluated with a light touch of the tail with a plastic pipette tip. From 3 to 6 dpf, spontaneous and PTZ-induced locomotor behavior were recorded using the ViewPoint ZebraBox system.

## 2.6. Western Blot analysis

Zebrafish embryos (50 hpf, 50-100 per tube) were homogenized in lysis buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4/ 500 mM NaCl/ 5 mM EDTA/ 1% (w/v) Nonidet P-40/ 0.5% (w/v) Triton X-100 supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Complete mini, Roche, Switzerland). Whole tissue lysates were then centrifuged at 14000×g at 4 °C for 20 minutes. Supernatants were collected and frozen at -80°C until biochemical analysis. 30 µg of proteins from 50 hpf embryos homogenized lysates were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Samples were denatured at 98°C for 7 minutes. The separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare, UK) and probed with the primary antibody anti-KCNB1 (SAB5200065, Sigma, USA). There are no anti-*kcnb1* antibody directed against the zebrafish *kcnb1* protein. We thus used an anti-KCNB1 antibody generated using the synthetic peptide from rat  $K_v2.1$  amino acids 11-229 which region showed 89% homology with *kcnb1* zebrafish, the highest percentage of homology within all available anti-KCNB1 antibodies. Anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma, USA) antibody were used as loading controls. The blots were incubated with the corresponding fluorescent secondary antibody and the signal was detected using the ODYSSEY® CLx (Li-Cor, USA). The intensity of bands was measured by the open-source image

processing program ImageJ 1.47 (Sun Microsystems, USA). Western Blot (WB) experiments have been repeated three times.

## **2.7. Statistical analysis**

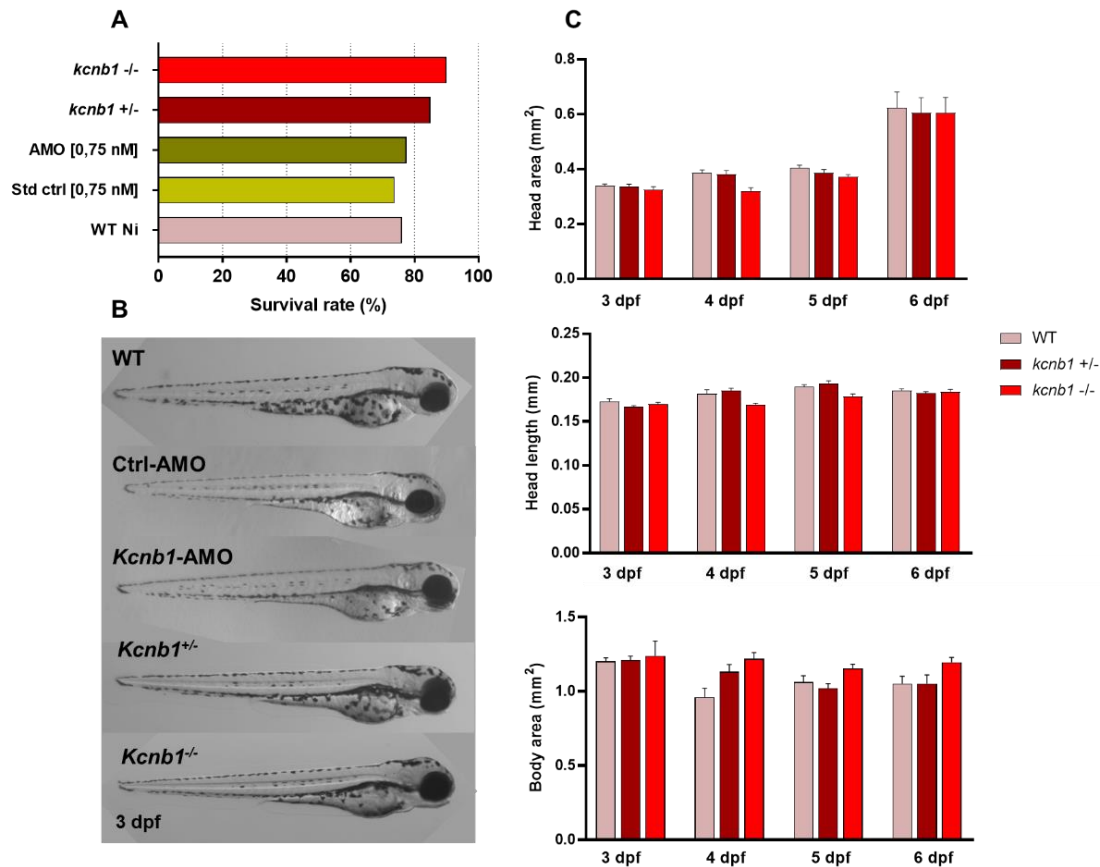
Data were plotted and analyzed using the Excel software (Microsoft, Washington). For statistical analysis and figure generation, GraphPad Prism 7.04 version (San Diego, CA, USA) was used. Normality was determined by Shapiro-Wilke test. Analysis of variance was performed using one or two-way ANOVA tests followed by Tukey's post-hoc test or Kruskal-Wallis test followed by a Dunn post-hoc, as required. P values less than 0.05 were considered statistically significant. Values are presented as mean  $\pm$  SEM.

## **3. Results**

### **3.1. *Kcnb1* mutants and morphants embryos had preserved survival and normal morphology**



Microinjection of Ctrl-MO and *kcnb1*-AMO affected neither mortality rate nor morphology of embryos and larvae between 0 and 6 dpf. The survival rate was similar in all conditions (Figure 26A). Visual inspection of *kcnb1* AMO morphants and *kcnb1* mutants did not revealed morphological malformations (Figure 26B). In particular, measurements of head and body length, body area, cranial perimeter and gap between the eyes were similar between the different conditions (Figure 26C).

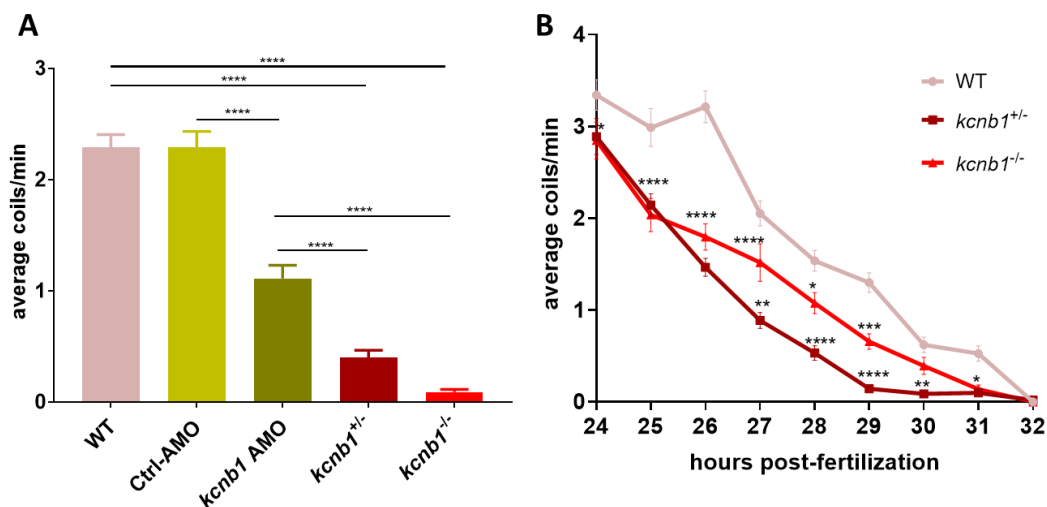


**Figure 26. *Kcnb1* loss of function was not associated with increased mortality nor gross malformations.** (A) Survival assay of larvae zebrafish showed similar rates of live larvae at 6 dpf between conditions. (B) Images showing that *kcnb1* morphants and mutants did not show gross morphological changes at 3 dpf. (C) Measurement of head area (top), head length (middle) and body area (bottom) showed no significant change in either parameter (n=12/genotype).

### 3.2. *Kcnb1* loss of function led to early behavioral phenotype deficiency

Zebrafish embryos exhibit early stereotyped behavior consisting of alternating spontaneous tail coiling in zebrafish involving side-to-side contractions of the trunk. This premotor activity begins at 17 hpf, reaching a peak at 19 hpf, and then decreases gradually until 27 hpf (Saint-Amant & Drapeau, 1998). As described by previous study (de Calbiac et

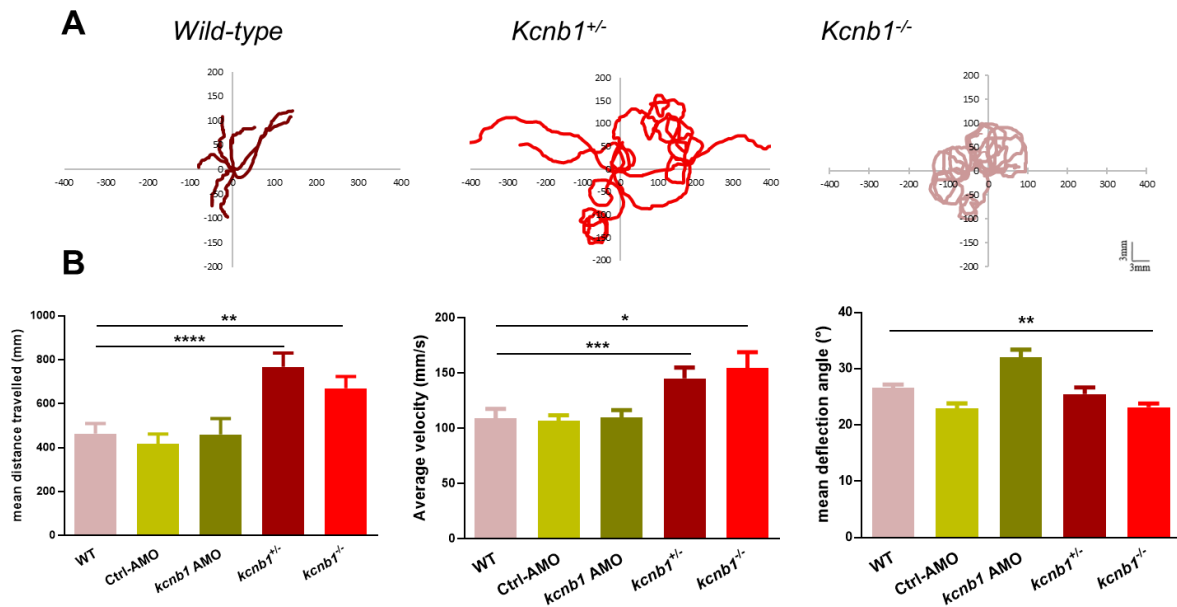
al., 2018; Swaminathan et al., 2018), we first measured spontaneous tail coiling at 28 hpf. At this time, *kcnbl* morphants and *kcnbl* mutants zebrafish showed a drastic decreased of tail coiling activity compared to Ctrl-MO and wild-type zebrafish. The number of spontaneous tail coiling was significantly reduced in *kcnbl* AMO embryos ( $1,12 \pm 0,12$  coils/min,  $n=87$ ) compared with embryos injected with Ctrl-AMO ( $2.3 \pm 0.14$  coils/min,  $n=95$ ;  $P < 0.0001$ ), as well as in *kcnbl*<sup>+/−</sup> ( $0.4 \pm 0.06$  coils/min,  $n=150$ ) and *kcnbl*<sup>−/−</sup> mutants ( $0.09 \pm 0.02$  coils/min,  $n=170$ ) compared to wild-type embryos ( $2.3 \pm 0.1$ ,  $n=230$ ;  $P < 0,0001$ ) (Figure 27A). Interestingly, we observed a genotype-dependent alteration of this early developmental phenotype as the number of tail coiling was significantly decreased in knockout *kcnbl* mutants compared to knockdown *kcnbl* morphants ( $P < 0,0001$ ) (Figure 27A). Given these results and the known variation in coiling activity with embryos developmental age, we quantified tail coiling from 24 to 32 hpf aiming to determine the time point of appearance of this early phenotype in *kcnbl* mutant embryos. A significant decreased of tail coiling activity was found since 24 hpf in both *kcnbl*<sup>+/−</sup> ( $P = 0.0186$ ) and *kcnbl*<sup>−/−</sup> ( $P = 0.0121$ ) mutants compared to wild-type embryos (figure 27B), persisting until 31 hpf.



**Figure 27. *kcnbl* loss of function is associated with early behavioral deficiency in zebrafish embryos.** (A) *Kcnbl*-AMO knockdown morphants had significant decreased spontaneous tail coiling activity compared to Ctrl-AMO as well as *kcnbl* knockout mutants vs wild-type embryos and Ctrl-AMO at 28 hpf. (B) Hetero- and homozygous *kcnbl* mutants showed decreased tail coiling activity from 24 to 31 hpf compared to wild-type (WT). Data are shown as mean  $\pm$  SEM (N=3; WT,  $n = 230$ ; Ctrl-AMO,  $n=95$ ; *kcnbl* AMO,  $n=87$ , *kcnbl*<sup>+/−</sup>,  $n=150$ ; *kcnbl*<sup>−/−</sup>,  $n=170$ ); \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$  ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$

### 3.3. *Kcnbl* mutant exhibited hyperactivity and circular swim behavior at 48 hpf

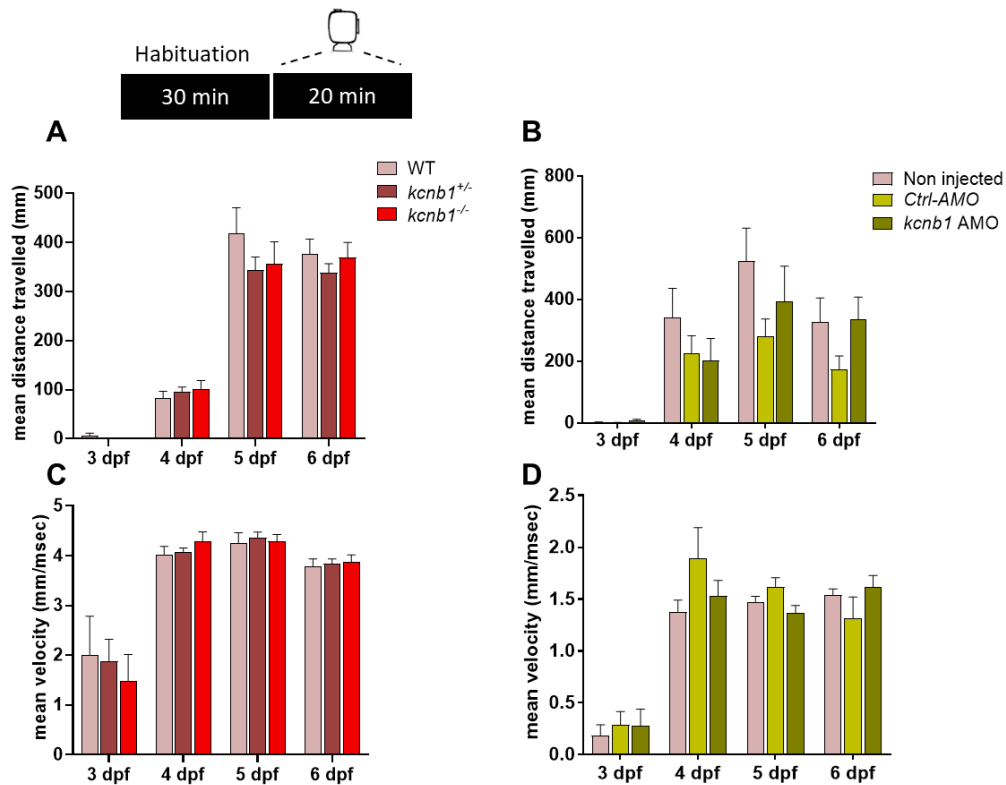
Starting at 21 hpf, the touch-evoked escape responses (TEER) is characterized by rectilinear swimming away from the stimulus at 48 hpf (Saint-Amant & Drapeau, 1998). Spontaneous and PTZ-induced seizure-like behavior have been previously associated with elevated swim activity and “whirlpool-like” circling swim behavior (Baraban et al., 2005, 2013). Therefore, we used the TEER to explore early swim trajectory patterns associated with *kcnbl* loss of function in zebrafish larvae. At 50 hpf, the total distance and velocity of TEER trajectories were increased in *kcnbl*<sup>+/-</sup> mutants compared to wild-type (767.8 ± 63.4 mm, n=67 vs 464.3 ± 45.5 mm, n=73, P <0.0001 and 145.3 ± 9.8 mm/sec, n=67 vs 109 ± 8.7 mm/sec, n=73, P < 0.001) and in *kcnbl*<sup>-/-</sup> mutants compared to wild-type (671 ± 52.8 mm, n=67 vs 464.3 ± 45.5 mm, n=73, P <0.001 and 154.4 ± 14.5 mm/sec, n=67 vs 109 ± 8.7 mm/sec, n=73, P = 0.004 ). In addition, *kcnbl*<sup>+/-</sup> and *kcnbl*<sup>-/-</sup> mutants exhibited aberrant locomotion characterized by rapid motion circular swimming compared to wild type presenting straight line trajectories (Figure 28A). This phenotype was quantify using the previously described deviation angle which measured the turning angle between individual swimming segments in consequent video frames (de Calbiac et al., 2018). The deviation angle of *kcnbl*<sup>-/-</sup> mutant TEER trajectories was significantly decreased in mutants (23.18 ± 0.6°, n=67) compared to controls (26.6 ± 0.6°, n=73; P < 0.01) (Figure 28B). At the same time, we found no difference between the TEER trajectories of *kcnbl* AMO morphants compared to wild-type (Figure 28B).



**Figure 28. *Kcnb1* mutants exhibits rapid circular swimming behavior at 2 dpf.** (A) Representative traces of individual swimming episodes at 50 hpf showing a circular trajectory pattern of *kcnb1* mutants compared to wild-type zebrafish larvae. (B) Hetero- and homozygous *kcnb1* had increased swim activity at 50 hpf characterized by significant larger and faster TEER trajectories compared to wild-type (WT). Swimming quantification of the tortuosity of the swimming trajectory measured as deviation angle shows significant differences between *kcnb1*<sup>-/-</sup> and WT. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (N=3; WT, n = 75; Ctrl-AMO, n=20; *kcnb1* AMO, n=20, *kcnb1*<sup>+/-</sup>, n=70; *kcnb1*<sup>-/-</sup>, n=70); \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$

### 3.4. *Kcnb1*<sup>-/-</sup> mutant displayed light-induced locomotor hyperactivity

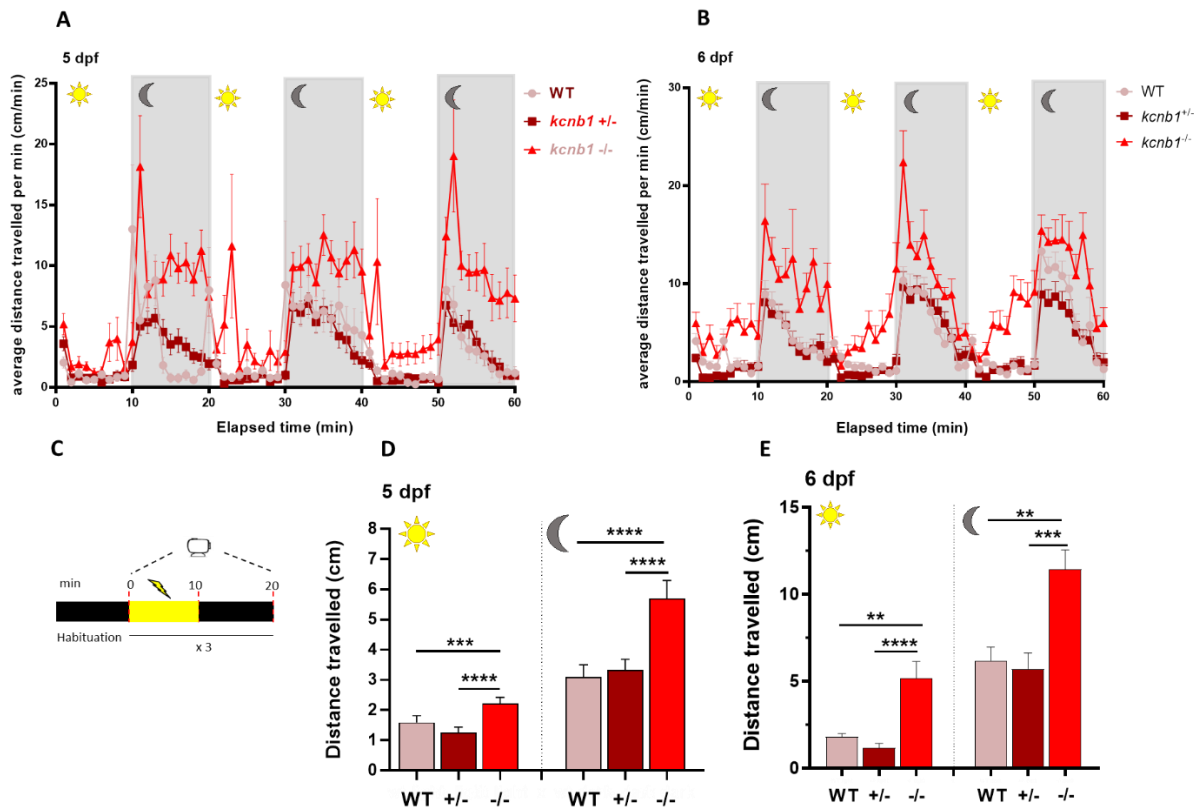
To determine whether the early altered behavioral phenotype associated with *kcnb1* loss of function persists in later developmental stages, we assessed spontaneous locomotor activity in zebrafish larvae from 3 to 6 dpf. We first used a protocol of 20 min recording under dark condition, following 30 min of dark habituation exposure. There was no significant difference in term of total time spent moving, total distance travelled and average total velocity between *kcnb1* morphants and mutants and their respective controls (Figure 29,A-D).



**Figure 29. Spontaneous locomotor activity was conserved in *kcnb1* mutants and morphants larvae under dark condition.** No significant differences of mean distance travelled, and mean velocity was found between *kcnb1* mutants and wild-type larvae (A,C) and between *kcnb1* AMO and Ctrl-AMO or non-injected larvae (B,D). Protocol consisted in 20 min recording under dark condition, following 30 min of dark habituation. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (N = 24 for each genotype); \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$

Previous studies on zebrafish model of genetic epilepsy reported locomotor changes and seizure-like behavior induced by light stimulus (C.-X. Liu et al., 2018; Pena et al., 2017; Scheldeman et al., 2017; Siekierska et al., 2019). We thus examined the responses evoked by light changes in *kcnb1* mutants and morphants from 3 to 6 dpf (light/dark switch, 100 lx for brightness and 0 lx for dark). After a 15-min habituation period, each larva was recorded for 60 minutes over three light/dark cycles (each consisting of 10 min in light and 10 min in dark setting per cycle, Figure 30C). As previously reported, light-to-dark transitions elicited sudden increases of total distance traveled while dark-to-light transitions resulted in sudden decreased distance traveled (Figure 30,A-B). We found no significant difference of locomotor activity between *kcnb1* morphants and Ctrl-AMO (data not shown). There was also no significant difference between *kcnb1* mutants and wild-type at 3 and 4 dpf. However, at 5 and 6 dpf, *kcnb1*<sup>-/-</sup> mutants showed significant locomotor hyperactivity induced by light/dark transitions compared to *kcnb1*<sup>+/-</sup> and wild-type, with significant increased distance travelled

during both light (5 dpf, *kcnb1*<sup>-/-</sup> : 2.2 ± 0.05 cm vs *kcnb1*<sup>+/-</sup> : 1.3 ± 0.04 cm, *P* < 0.0001 and WT : 1.6 ± 0.1 cm, *P* < 0.001 ; 6 dpf, *kcnb1*<sup>-/-</sup> : 5.2 ± 1 cm vs *kcnb1*<sup>+/-</sup> : 1.2 ± 0.3 cm, *P* < 0.0001 and WT : 1.8 ± 0.2 cm, *P* < 0.01) and dark phases (5 dpf, *kcnb1*<sup>-/-</sup> : 5.7 ± 0.1 cm vs *kcnb1*<sup>+/-</sup> : 3.3 ± 0.1 cm, *P* < 0.0001 and WT : 3.1 ± 0.1 cm, *P* < 0.0001 ; 6 dpf, *kcnb1*<sup>-/-</sup> : 11.4 ± 1.1 cm vs *kcnb1*<sup>+/-</sup> : 5.7 ± 1 cm, *P* < 0.001 and WT : 6.2 ± 0.8 cm, *P* < 0.01) (Figure 30,D-E).

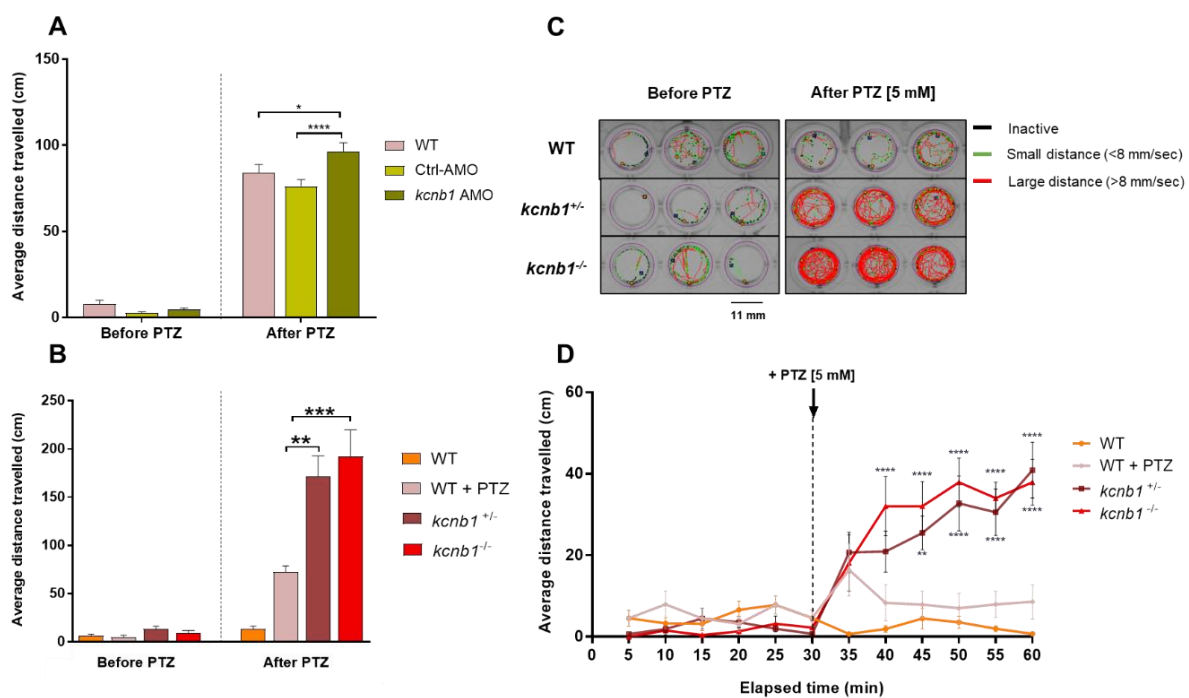


**Figure 30. *Kcnb1*<sup>-/-</sup> mutants displayed spontaneous locomotor hyperactivity induced by light-stimulus.** Light/dark test of wild-type (WT), *kcnb1*<sup>+/-</sup> and *kcnb1*<sup>-/-</sup> larvae at 5 and 6 dpf. (A,B) Representation of the average distance moved within each 1-min bin under either light or dark conditions at 5 dpf (A) and 6 dpf (B). The vertical axis shows the normalized distance (centimeters) traveled by larvae in each 1-min bin. The activity was recorded during three 10-min light/dark intervals (C). *Kcnb1*<sup>-/-</sup> had increased locomotor activity during light and dark phases compared to *kcnb1*<sup>+/-</sup> and WT, at 5 dpf (D) and 6 dpf (E). Data are shown as mean ± SEM (N = 3, n=16 for each genotype); \**P* ≤ 0.05; \*\**P* ≤ 0.01 ; \*\*\**P* ≤ 0.001; \*\*\*\**P* ≤ 0.0001

### 3.5. *Kcnb1* mutants exhibited increased sensitivity to PTZ-induced seizures

Last, the susceptibility of larvae to chemically induced seizures by pentylenetetrazol (PTZ) was tested. Previous studies have demonstrated that exposure of zebrafish larvae to PTZ induces increased locomotor activity and seizure-like stereotypic behavior in a concentration-dependent manner (Baraban et al., 2005; Berghmans et al., 2007; Challal et al.,

2014). We analyzed the locomotor activity of 3 and 4 dpf larvae exposed to PTZ at concentration of 5 mM, which was previously shown to be the minimal concentration that could be used to induce significant changes in swimming behavior in 3 dpf. Consistent with our previous results, the 30 minutes baseline activity of *kcnb1* morphants and mutants was similar to age-matched wild-type in dark condition. At 3 dpf, there was no significant difference of locomotor hyperactivity induced by PTZ exposure between the different conditions. In contrast, after PTZ exposure at 4 dpf, both *kcnb1* morphants and mutants maintained a significant higher swimming activity (*kcnb1* AMO:  $96.6 \pm 4.9$  cm, n=60; *kcnb1*<sup>-/-</sup>  $192.1 \pm 27.1$  cm, n=8; *kcnb1*<sup>+/-</sup>  $171.3 \pm 21.4$  cm, n=8) compared to their control larvae (Ctrl-AMO:  $73.3 \pm 3.7$  cm, n=60,  $P < 0.0001$ ; WT + PTZ:  $72.5 \pm 6.1$  cm, n=8,  $P < 0.01$  vs *kcnb1*<sup>+/-</sup> and  $P < 0.001$  vs *kcnb1*<sup>-/-</sup>) characterized by fast circles indirectly indicating an increase of induced seizure-susceptibility (Figure 31).



**Figure 31. *Kcnb1* loss of function was associated with increased susceptibility to PTZ-induced seizures at 4 dpf.** The increased locomotor activity induced by PTZ exposure was significantly higher in *kcnb1* morphants (A) and mutants (B) compared to their respective controls. Representative plots of the swimming tracking generated from the Viewpoint Zebralab Tracking software for a single larva in normal embryo medium during baseline recording and after exposure to 5 mM PTZ. Plots were obtained from recording epochs 5 min in duration. Green and red lines indicate movements slower and faster than 8 mm/s respectively. Data are shown as mean  $\pm$  SEM; \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$

### **3.6. Characterization of decreased level of *kcnb1* expression in KO and KD *kcnb1* models**

To validate the inhibition of *kcnb1* protein in the knockdown and knockout models, we performed western blot analysis aiming to demonstrate the decrease level of *kcnb1* at 48 hpf. However, we failed to obtain a specific band for *kcnb1*, probably due to the lack of specificity of the rat antibody (data not shown). In the same objective, we analyzed the presence of *kcnb1* transcript by RT-PCR at 2 and 3 dpf in *kcnb1* morphants. We did not find significant difference of *kcnb1* transcript expression level between *kcnb1* AMO and Ctrl-AMO or WT (data not shown). Other analyzes are in progress to validate the specific inhibition of *kcnb1* in these models.

## **4. Discussion**

Mutations in *KCNBI* have recently been associated with a severe developmental encephalopathy with poor cognitive outcome and high frequency of drug-resistant epilepsy. The underlying molecular pathways are not elucidated, and new animal models are needed to accelerate the comprehension of this disease and to identify therapeutic targets. In recent years, the zebrafish has become an attractive alternative model for neurodevelopmental disorders (Gawel et al., 2020; Griffin et al., 2016; Stewart, Braubach, et al., 2014). *Kcnb1* is strongly expressed in the developing vertebrate nervous system, indicating a role for this protein in neuronal development (Jedrychowska et al., 2021).

Our preliminary results revealed that *kcnb1* LOF in embryo and larval zebrafish, either partial using AMO or complete with a knockout model, causes early behavioral impairment and increased susceptibility to chemically induced seizures, thus reproducing some of the core phenotypic features of *KCNBI* encephalopathy. We used the *kcnb1* knockout model developed by Shen et al. (H. Shen et al., 2016) and developed a *kcnb1* knockdown model through antisense morpholino oligonucleotides to performed parallel behavioral phenotyping of these complementary models (Rossi et al., 2015). *Kcnb1* morphants and mutants had no increased mortality nor morphological abnormalities, consistent with the human phenotype of *KCNBI* encephalopathy as no early death have been reported in patients as well as no specific morphological abnormalities (Bar, Kuchenbuch, et al., 2020). We did not noticed gastrulation failure or decreased size of brain ventricles as previously reported in a minority of *kcnb1*<sup>-/-</sup> mutants (H. Shen et al., 2016). Although we did not perform brain imaging, this decreased ventricular system might not be associated with microcephaly as we did not found difference



of cranial perimeter in *kcnbl* mutants compared to wild-type. We showed that *kcnbl* morphants and mutants had decreased coiling activity from 24 hpf until the end of this first behavioral period. Tail coiling activity has been first used in general toxicological screening, to assess the developmental neurotoxicity of chemical products (Kokel et al., 2010; Raftery et al., 2014; Vliet et al., 2017; Ogungbemi et al., 2021). Recently, two studies described for the first time a modification of this premotor activity in zebrafish models of *depdc5*-related epilepsy (de Calbiac et al., 2018; Swaminathan et al., 2018, p. 5). These studies reported opposite effect on tail coiling activity, with an hyperactivity reported in the *depdc5* knockdown model at 28 hpf (de Calbiac et al., 2018) while the *depdc5* knockout model exhibited coiling hypoactivity at 20 hpf (Swaminathan et al., 2018, p. 5). Given the different time point at which tail coiling have been assessed in these studies, we cannot excluded a “biphasic profile” of the effect of *depdc5* inhibition over time, as reported for some neurotoxic compounds (Vliet et al., 2017). This early stereotyped behavior is supported by synchronized spinal locomotor circuits mediated by the innervation of the muscle by the primary motor neurons, which are first present at around 17 hpf (Saint-Amant & Drapeau, 1998). Interestingly, a decreased tail coiling activity have been reported in zebrafish embryos exposed to tricaine (MS-222), a sodium channel blocker used for anesthesia, sedation, and euthanasia of various fish species (Menelaou et al., 2008; Oliveira et al., 2021). These embryos had altered motoneuron axonal morphologies similar to findings in a knockdown zebrafish model of the voltage-gated sodium channel  $Na_v1.6a$  (*SCN8A*), supporting early depolarizing activity as essential in regulating motoneuron development (Menelaou et al., 2008; Pineda et al., 2006). In addition to their expression in brain neurons,  $K_v2.1$  channels are also found in rat spinal cord motoneurons (Muennich & Fyffe, 2004; Romer et al., 2019). Although their developmental expression in spinal cord have not yet been investigated, their early brain expression suggest that they might be implicated in motoneurons developmental pathways, as found for voltage-gated sodium channels. The early hypoactive phenotype of our *kcnbl* models could therefore be linked to abnormal motoneurons resulting from the disruption of the synaptic neuronal activity in these embryonic motoneurons. An anatomical study is now necessary to study the motor neurons morphology at this early stage of development and confirm this hypothesis. At later stages of larval development, previous reports on both drug-induced and genetic models of epilepsy have revealed a stereotyped swimming characteristic of epileptogenic-like activity, where individual larvae swim in a circular, corkscrew-like trajectory (Gawel et al., 2020). We found a similar circular pattern of swim trajectories in *kcnbl*<sup>-/-</sup> mutants at the TEER test at 50 hpf, with an intermediate

phenotype in *kcnbl*<sup>+/-</sup> mutants and associated to an elevated swim activity in both genotypes. These results provide strong evidence for seizure-like behavior in *kcnbl* mutants, further supported by their increased activity induced by PTZ treatment compared to wild-type. Electrographic recordings are now needed to confirm the epileptic phenotype by detecting ictal and/or interictal epileptiform abnormalities. Performing in vivo whole-brain calcium imaging of larval zebrafish using activity-dependent fluorescent reporters would also be interesting to study epileptogenesis networks (Burrows et al., 2020). Finally, *kcnbl*<sup>-/-</sup> mutants exhibited increased response of locomotor activity to a light-dark stimulus as compared to *kcnbl*<sup>+/-</sup> and mutants. It has been demonstrated that light-to-dark transition induces a rapid increase in locomotor activity of zebrafish larvae, which decreases to baseline after a few (5–10) minutes (Burgess & Granato, 2007; Kokel et al., 2010). This hyperactivity upon light switches is consistent with the increased locomotor activity found in previous *kcnbl* rodents model (Hawkins et al., 2021; Speca et al., 2014) and have been reported in *vars* knockout zebrafish model, another genetic developmental and epileptic encephalopathy (Siekierska et al., 2019). The zebrafish photomotor responses is regulated by neuronal connectivity of the hindbrain and spinal cord and multiple neurotransmitter pathways which could be disrupted by an abnormal neuronal activity related to *kcnbl* loss of function (Kokel et al., 2010). However, the characterization of this phenotype requires further studies to determine whether it reflects an epilepsy-like behavior (hyperactivity of the stage 1) or the manifestation of a behavioral disorder.

Knockdown and knockout models are complementary approaches considering advantages and limitations of each model. Our *kcnbl* morphant model had a less severe phenotype than *kcnbl* mutant, which can be explained by the reduced but not suppressed expression of *kcnbl* using AMO compared to the knockout model in which the inhibition is complete. This could also be due to a reduction in the severity of the phenotype as the effect of the translation blocking morpholino oligonucleotide is gradually reduced with time, lasting up to 5-6 days (Kimmel et al., 2003; Zhang et al., 2015). However, it was not possible to detect the expression of *kcnbl* in our models and therefore to date the duration of AMOs effect because of the absence of specific antibodies available in zebrafish. Additional studies are underway aiming to study the expression of *kcnbl* by RT-PCR. To validate the specificity of the phenotype associated with the knockdown model, the use of a different type of AMOs is needed to exclude off-target effects as well as the rescue of the phenotype using *kcnbl* mRNA (Stainier et al., 2017). The *kcnbl* knockout model also has some limitations. The genetic alteration of the *kcnbl* knockout model is different of the genetic conditions associated with

*KCNB1* encephalopathy. The mutation induced by CRISPR/Cas9 leads to a premature termination codon located in the exon 1 which might thus be associated with nonsense-mediated decay while most mutations of *KCNB1* encephalopathy consist in a single amino acid replacement thought to produce a truncated protein with a dominant-negative effect on channel function (Bar, Barcia, et al., 2020). This complete loss of *kcnbl* in a stable genetic line could induce functional compensation over several generations thus limiting the severity of the phenotype in the zebrafish model (Rossi et al., 2015).

Even though the *kcnbl* mutant mice exhibit some of the behavioral features of *KCNB1* encephalopathy (Hawkins et al., 2021; Speca et al., 2014) there are several disadvantages associated with the use of rodent models. For example, zebrafish larvae allow the evaluation of early developmental defects while studies in mice have been performed at adult stages (Speca et al., 2014; Hawkins et al., 2021). In addition, high-throughput drug screening remains difficult in rodent models. Although the zebrafish model is of course insufficient to model all aspects of the human phenotype, we believe that our zebrafish model would be convenient for initial high throughput drug-screening assays that could identify candidate molecules restoring the *kcnbl*<sup>-/-</sup> larval phenotype (i.e., early premotor hypoactivity, light-induced spontaneous hyperactivity and seizure susceptibility) which can later be confirmed in mammalian models.

## 5. Conclusion

The list of confirmed genes associated with developmental encephalopathies continues to grow, but the development of targeted molecular treatments significantly lags behind. These preliminary results suggest these zebrafish models of *kcnbl* loss of function as valuable model to reproduce some aspect of the human phenotype of *KCNB1* encephalopathy, associating early behavioral impairment and increased seizure susceptibility. After further validation, we believe that these larval zebrafish models will be amenable to explore disease neuropathogenesis and conduct high-throughput drug screening, opening up the possibility for the discovery of new therapeutic compounds to improve the long-term prognosis of patients with *KCNB1* encephalopathy.



# **DISCUSSION GENERALE et PERSPECTIVES**

---



## 1. Points forts et limites des différents travaux de la thèse

---

Décrite pour la première fois en 2014, les données de la littérature sur l'encéphalopathie liée aux mutations du gène *KCNBI* restaient limitées, suggérant seulement la pléiotropie phénotypique propre à de nombreux gènes d'EDE et soulignant la nécessité d'un phénotypage avancé de larges cohortes de patients pour délimiter le spectre génotypique et phénotypique associé à ces mutations. Le développement de modèles murins a permis de confirmer le rôle central de *KCNBI* dans la régulation de l'excitabilité neuronale et ouvre la voie à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents. Cependant, l'absence de traitements efficaces et le pronostic globalement péjoratif de cette pathologie justifient l'urgence à développer de nouveaux modèles moins contraignants permettant la réalisation d'un criblage phénotypique et moléculaire à haut débit.

Après avoir établi l'état des connaissances actuelles sur l'encéphalopathie *KCNBI*, une première partie de notre travail s'est concentrée sur la constitution et l'étude d'une cohorte de patients porteurs de variants pathogènes dans *KCNBI*. Notre revue de la littérature complétée par nos travaux ont permis d'étendre le spectre mutationnel de l'encéphalopathie *KCNBI*, de confirmer la corrélation entre le type de mutation et la sévérité de l'épilepsie, de délimiter le spectre phénotypique de ces patients et leur devenir à long-terme.

En parallèle, nous avons étudié le phénotype de modèles poissons-zèbres présentant une inhibition partielle ou totale de *kcnbl*. Cette deuxième partie de nos travaux a permis de confirmer l'effet pathogène de la perte de fonction de *kcnbl* dans ce modèle et d'ouvrir la voie à la validation de ce modèle pour l'étude translationnelle de l'encéphalopathie *KCNBI*.

### 1.1. Point de vue génétique

Comme nous l'avons vu en introduction, les progrès de la génétique et des techniques basées sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) ont révolutionné notre approche diagnostique des patients épileptiques et apporté de nouveaux défis dans l'interprétation des résultats et l'information délivrée aux patients et à leurs familles.

Dans un premier temps, nous avons donc constitué une cohorte de patients porteurs de variants pathogènes de *KCNBI*, grâce au centre de référence des épilepsies rares et de ces collaborations internationales et avec l'aide de l'association *KCNBI*. Nous avons réuni les données génétiques de cette cohorte et des patients de la littérature pour décrire le spectre mutationnel et rechercher des corrélations génotypes-phénotypes. Nous avons rapporté le

premier cas de variant hérité avec une variabilité phénotypique intra-familiale, identifié de nouveaux hotspots mutationnels et confirmé la moindre sévérité de l'épilepsie associée aux variants tronquants comparé aux variants non-sens. Compte tenu de la variabilité génotypique associée aux groupes des EDE, la description détaillée de ces mutations fournit un support essentiel pour le clinicien et le généticien dans l'interprétation de la pathogénicité des variants et le conseil génétique qui en découle. Ces données ont également été mise à disposition sur la base de données ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

De Kovel et al. avait suggéré la présence d'un phénotype plus sévère pour les variants non-sens situés dans le domaine du capteur de tension ou du pore de la protéine (de Kovel et al., 2017). Cependant, notre travail montrait la variabilité phénotypique importante associée à un même variant ou à des variants de localisation proche, comme cela a été rapporté dans d'autres canalopathies potassiques, comme pour les variants du gène *KCNQ2* (Millichap et al., 2016) ou *KCNT1* (Barcia et al., 2012; Heron et al., 2012, p. 1). Les études fonctionnelles réalisées jusque-là n'ont pas permis d'aller plus loin dans la reconnaissance de corrélations entre dysfonction du canal  $K_v2.1$  et sévérité du phénotype clinique (Kang et al., 2019). Le fait qu'une même mutation puisse générer des phénotypes différents suggère que le phénotype résulte d'une interaction complexe entre la perte de fonction du canal potassique voltage-dépendant et des facteurs de régulation notamment environnementaux, génétiques et épigénétiques. Par leur effet dominant-négatif sur l'expression de  $K_v2.1$  à la surface des cellules (Kang et al., 2019) et la formation de jonctions RE-MP (Hawkins et al., 2021), les variants de *KCNBI* pourraient également perturber les fonctions non-conductrices du canal et moduler ainsi le phénotype clinique.

## 1.2. Point de vue phénotypique

Nous avons ensuite regroupé les données cliniques et paracliniques des patients de notre cohorte, que nous avons analysé avec celles des patients de la littérature. Ce travail de phénotypage a permis de mieux délimiter l'étendue du spectre clinique, soulignant ainsi la variabilité de l'atteinte développementale et épileptique mais révélant aussi la sévérité du pronostic à long-terme chez une grande majorité de patients. En effet, les individus porteurs d'un variant pathogène de *KCNBI* développent tous une encéphalopathie développementale avec atteinte cognitive, d'où l'utilisation du terme d'encéphalopathie *KCNBI* qui regroupe les différents phénotypes épileptiques associés, plus ou moins sévères. Ces phénotypes épileptiques ont été décrits en utilisant la dernière classification 2017 de l'ILAE, répartissant les patients en EDE ou ED, avec ou sans épilepsie. L'utilisation de cette classification est



importante dans l'approche thérapeutique des patients et la prise en compte de la balance bénéfique/risque pour le choix des traitements anti-épileptiques. Nous avons montré que les patients du groupe EDE étaient ceux dont le pronostic était le plus sévère. Dans ces situations d'épilepsie précoce, un traitement anti-épileptique aura pour but d'essayer de limiter l'effet délétère additionnel de l'épilepsie à celui de la mutation sous-jacente tout en tenant compte de l'impact négatif des polythérapies anti-épileptiques sur les fonctions cognitives.

La dernière classification 2017 de la ligne internationale contre l'épilepsie insiste également sur l'importance de rechercher des comorbidités tout au long du processus diagnostique d'une épilepsie (Scheffer et al., 2017). Les comorbidités des patients porteurs de variants de *KCNBI* étaient peu documentées et souvent évaluées de manière subjective. L'évaluation quantitative des troubles du neurodéveloppement de ces individus est limitée par les effets plafonds des échelles d'évaluation et les difficultés de passation dues aux troubles du comportement. Nous avons montré que l'utilisation de questionnaires d'hétéroévaluation remplis par les parents permet une évaluation fiable et informative sur le fonctionnement adaptatif des patients et permet également le dépistage de troubles du comportement et de TSA. Grâce à une analyse originale en cluster, nous avons identifié deux sous-groupes de patients dont l'un avait un déficit de fonctionnement adaptatif plus sévère que l'autre, corrélé avec la sévérité du phénotype épileptique. Il est difficile de faire la part des choses entre le rôle réciproque de l'épilepsie précoce et de la mutation génétique sous-jacente sur la sévérité du phénotype ultérieur. Il est cependant évident qu'il ne suffit pas d'arrêter les crises pour améliorer le pronostic et qu'il est nécessaire d'étudier l'impact des variants pathogènes de *KCNBI* sur le développement, ainsi que leurs rôles dans les nombreuses comorbidités observées chez les patients atteints d'encéphalopathie *KCNBI*.

Les principales limites de ce travail de phénotypage sont la taille de la cohorte qui reste faible et peut avoir limité l'identification de corrélations génotype-phénotype et le caractère rétrospectif du recueil des données. Il faut cependant souligner qu'il s'agit de la plus large cohorte de patients porteurs d'une encéphalopathie *KCNBI*, ayant permis de doubler le nombre de patients rapportés dans la littérature.

### **1.3. Point de vue translationnel**

Enfin, en parallèle du travail de phénotypage clinique, le 2<sup>ème</sup> objectif de ce travail consistait à étudier le phénotype comportemental associé à une perte de fonction de l'homologue de *KCNB1* dans un modèle poisson-zèbre (nommé *kcnb1*). En effet, la validation fonctionnelle *in vitro* de variants *KCNBI* dans des cellules hétérologues a mis en

évidence plusieurs effets pathogènes traduisant une perte de fonction du canal  $K_v2.1$  associée à des effets dominants négatifs sur le courant potassique, le niveau d'expression ou la localisation du canal (Kang et al., 2019; Saitsu et al., 2015; Torkamani et al., 2014). Pour modéliser cet effet perte de fonction, deux approches d'inhibition du gène *kcnb1* chez le zebrafish ont été utilisées : un modèle knockdown avec inhibition transitoire et partielle du gène par un oligonucléotide antisens (nommé morphants *kcnb1*) et un modèle knockout *kcnb1* déjà existant mais dans lequel le phénotype comportemental n'avait pas encore été étudié (H. Shen et al., 2016).

Nous n'avons pas trouvé d'anomalie morphologique ni d'augmentation de la mortalité dans ces deux modèles, ce qui est en accord avec notre étude clinique sur les patients porteurs d'une encéphalopathie *KCNB1* (Bar, Kuchenbuch, et al., 2020). Les modèles morphants et mutants présentaient cependant une altération profonde de leur comportement locomoteur dès les premiers stades du développement, suggérant l'impact précoce de la perte de fonction de *kcnb1* sur le neurodéveloppement embryonnaire du poisson-zèbre. Au cours des stades ultérieurs du développement, les mutants *kcnb1*<sup>+/-</sup> et *-/-* présentaient une hyperactivité locomotrice et un pattern de nage circulaire compatible avec la description du stade 2 du phénotype épileptique du poisson-zèbre décrit par Baraban et al. et retrouvé dans d'autres modèles d'épilepsies génétiques (Baraban et al., 2005, 2013; de Calbiac et al., 2018). Enfin, les morphants *kcnb1* et les mutants *kcnb1*<sup>-/-</sup> étaient plus sensibles aux crises induites par l'exposition au PTZ, une molécule proconvulsivante interférant avec la transmission GABAergique.

Plusieurs limites doivent être soulignées concernant ces résultats et l'application de ces modèles. Premièrement, nous n'avons pas pu confirmer la diminution de l'expression protéique de *kcnb1* ou de son ARN dans les deux modèles. Une des raisons pourrait être le fait que la protéine *kcnb1* est une protéine membranaire, difficile à extraire des débris de poisson-zèbre. De plus, il existe peu d'anticorps ayant été développé spécifiquement pour l'utilisation chez le poisson-zèbre. Deuxièmement, les modifications observées du comportement locomoteur des modèles morphants et mutants sont difficiles à interpréter et nécessitent d'autres explorations (cf. perspectives). Au cours de notre travail, l'équipe ayant développé le modèle poisson-zèbre mutant *kcnb1* a publié un article sur l'altération du développement de l'oreille interne dans ce même modèle (Jedrychowska et al., 2021). Dans cette étude, les auteurs rapportaient un pattern de nage circulaire à 5 jpf chez les mutants *kcnb1*<sup>-/-</sup>, concordant avec nos résultats obtenus à 2 jpf. En revanche, ils retrouvaient une modification similaire des trajectoires de nage dans un modèle morphant *kcnb1*, ce que nous

n'avions pas retrouvé dans notre modèle morphant. Cette différence peut s'expliquer par l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens différent, dont l'impact fonctionnel pourrait avoir été plus important dans cette étude. Enfin, les auteurs expliquaient ce phénotype locomoteur par un déficit du système vestibulaire en lien avec les anomalies de développement de l'oreille interne (Jedrychowska et al., 2021). Des explorations complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer l'origine de ce phénotype locomoteur et confirmer ou non, son origine épileptique. Troisièmement, la mutation génétique générée dans le modèle mutant *kcnbl* n'est pas représentative des principales caractéristiques génotypiques des variants responsables d'encéphalopathie *KCNBI*. La majorité de ces variants sont des variants non-sens situés dans le 2<sup>ème</sup> exon du gène *KCNBI* alors que la mutation du modèle poisson-zèbre correspond à une mutation tronquante située dans le 1<sup>er</sup> exon du gène et induisant l'apparition précoce d'un codon stop (H. Shen et al., 2016). Les mécanismes pathogènes impliqués pourraient donc être différents, induisant plutôt une situation d'haploinsuffisance avec dégradation des ARNm tronqués dans le modèle poisson-zèbre et ne reproduisant pas les effets dominants-négatifs de la protéine tronquée décrits chez l'homme (Bar, Barcia, et al., 2020). Le développement de modèles animaux Knock-in basé sur l'insertion de variants pathogènes rapportés chez l'homme est une approche prometteuse pour essayer de reproduire de manière encore plus pertinente les caractéristiques phénotypiques de la maladie humaine et en étudier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents (K. Liu et al., 2019). Un modèle souris Knock-in *kcnbl* a été publié l'année dernière, reproduisant des caractéristiques phénotypiques comportementales et épileptiques intéressantes pour l'étude de l'encéphalopathie *KCNBI* (Hawkins et al., 2021). Néanmoins, l'étude d'un phénotype neurodéveloppemental est limité par les contraintes du modèle murin dont les études phénotypiques portent principalement sur des animaux adultes (Hawkins et al., 2021; Speca et al., 2014).

La simplicité de l'organisme du poisson-zèbre présente de nombreux avantages pour la recherche translationnelle, dont celui de permettre l'étude du développement dès les premiers stades embryonnaires et de réaliser un criblage à haut débit de molécules à visée thérapeutique (de Abreu et al., 2020; Hortopan et al., 2010a). Les larves du zebrafish ne sont considérées comme des animaux qu'à partir du moment où elles se nourrissent, c'est-à-dire au bout de 6 jours d'existence. Elles sont ainsi considérées légalement comme des modèles in vitro (directive 2010/63/EV) et répondent à la règle des « 3R » (Réduire, Raffiner et Remplacer) de la démarche éthique liée à l'expérimentation animale (Sukardi et al., 2011). Dans notre étude, les morphants et mutants *kcnbl* présentent un phénotype très précoce dès

24 hpf. Considérant l'atteinte neurodéveloppement précoce retrouvée chez les patients de notre cohorte, ces résultats préliminaires aux premiers stades embryonnaires sont encourageants dans la modélisation de l'encéphalopathie de *KCNBI* chez le poisson-zèbre et confirment l'effet délétère de la perte de fonction de *kcnb1* dans ce modèle. La diminution de l'activité stéréotypée prémotrice pourrait notamment constituer un marqueur d'évaluation précoce dans des études ultérieures de criblage pharmacologique à haut débit.

## 2. Perspectives

---

### 2.1. Point de vue clinique et génétique

D'un point de vue clinique et génétique, notre étude a permis d'approfondir le spectre phénotypique et épileptique associé aux variants pathogène de *KCNBI*, soulignant la pertinence des termes « d'encéphalopathie développementale et épileptique » vs « encéphalopathie développementale avec ou sans épilepsie » pour préciser le phénotype des individus et guider ainsi leur prise en charge thérapeutique et l'information pronostique aux familles. L'étude du lien de causalité entre sévérité de l'atteinte développementale et sévérité de l'épilepsie nécessite un recueil prospectif des données des patients sur leur devenir. Pour cela, nous prévoyons la mise en place d'un registre de suivi national afin de collecter ces données de manière centralisée. Par ailleurs, les familles de patients ont participé activement à ce travail de phénotypage, via l'association *KCNBI* France qui met en contact les familles de patients et nous a référé les nouveaux patients pendant toute la durée de ce travail. Les familles nous ont également aidé à récolter les données des patients et ont participé au phénotypage neuropsychologique en remplissant les questionnaires d'hétéroévaluation. En retour, les différents résultats de ce travail ont été présentés régulièrement aux familles, lors de journées nationales ou internationales sur l'encéphalopathie *KCNBI*. La collaboration se poursuit actuellement avec l'identification régulière de nouveaux patients permettant d'augmenter la taille de la cohorte et d'identifier de nouveaux variants pathogènes. La prochaine réunion internationale est prévue le 19 mars 2022 où les résultats des travaux sur le modèle poisson-zèbre seront présentés aux familles. Cette approche participative illustre le nouveau paradigme d'une médecine « 4P » centrée sur l'individu : personnalisée, préventive, prédictive et participative, plaçant le patient au centre de sa prise en charge (Nabbout & Kuchenbuch, 2020).

## 2.2. Point de vue translationnel

La caractérisation phénotypique des modèles morphants et mutants *kcnb1* se poursuit actuellement à travers un autre travail de thèse, les avancés de nos travaux ayant été largement impactées par la crise sanitaire liée à l'épidémie SARS-CoV-2.

Afin de confirmer la spécificité du phénotype du modèle morphants *kcnb1* rapporté dans nos résultats préliminaires, plusieurs expériences sont en cours : (1) L'utilisation d'un autre type d'oligonucléotide anti-sens bloquant l'épissage du préARNm afin de vérifier que le phénotype observé n'est pas la conséquence d'une toxicité du morpholino indépendante de sa cible *kcnb1* (2) la démonstration du sauvetage du phénotype sauvage en introduisant l'ADN *KCNBI* humain en parallèle du morpholino (3) La caractérisation phénotypique d'un modèle d'inhibition chimique de *kcnb1* par l'utilisation du GxTX, une molécule isolée de la tarentule *Plesiophrictus guangxiensis* et bloqueur sélectif des canaux  $K_v2.1$  et  $2.2$  (Lee et al., 2010).

Par ailleurs, nos résultats préliminaires ont révélé des modifications précoces du comportement locomoteur dont certaines caractéristiques sont susceptibles de refléter une activité cérébrale épileptogène. La confirmation d'un phénotype épileptique peut se faire à différents niveaux d'analyse. Au niveau physiologique, l'enregistrement extracellulaire électrophysiologique dans le tectum optique de larves morphantes et mutantes *kcnb1* est indispensable pour rechercher des anomalies de l'activité électrique cérébrale. Au niveau moléculaire, la recherche d'une surexpression du proto-oncogène *c-fos* par RT-PCR pourrait également permettre de valider l'hyperactivité neuronale associée aux modifications phénotypiques (Morgan et al., 1987; Baraban et al., 2005; Baxendale et al., 2012). L'utilisation de lignées fluorescentes rapportrices d'une population spécifique de neurones couplée à l'imagerie in vivo pourrait permettre de confirmer visuellement la présence d'une activité neuronale anormale. Enfin, la restauration d'une partie du phénotype sauvage après exposition à différentes molécules anti-épileptiques à large spectre comme les benzodiazépines pourrait permettre de soutenir l'hypothèse d'une activité épileptique sous-jacente (Baraban et al., 2005).

Ces différentes étapes de validation du phénotype vont pouvoir se faire à court et moyen terme, dans l'optique d'effectuer dès que possible un criblage moléculaire à haut débit pour permettre d'identifier de nouveaux traitements ou de nouvelles cibles thérapeutiques. Ce type d'approche a permis par exemple de confirmer pour la première fois dans un modèle animal de syndrome de Dravet l'effet anti-épileptique de la fenfluramine, un agoniste de la

sérotonine dont l'AMM vient d'être obtenue pour le traitement en add-on des patients avec un syndrome de Dravet (Zhang et al., 2015).

Enfin, en parallèle de ce travail de phénotypage des modèles *kcnb1*, nous avons effectué un travail similaire de modélisation chez le poisson-zèbre de l'épilepsie focale migrante du nourrisson, une EDE précoce et sévère associée à des variants pathogènes de *KCNT1* (Barcia et al., 2012, p. 1; Kuchenbuch et al., 2019). Les résultats préliminaires de ce travail ne sont pas présentés ici par souci de cohérence globale de la thèse mais font également l'objet de résultats préliminaires prometteurs et d'explorations complémentaires pour permettre leur validation.

### **3. Conclusion**

---

Cette thèse a permis de mieux caractériser le spectre génotypique et phénotypique de l'encéphalopathie *KCNB1*. Le trouble du neurodéveloppement est présent précocement chez tous les individus mais à des degrés de sévérité variable, incluant des tableaux d'EDE sévère à des ED avec ou sans épilepsie. Le pronostic développemental est globalement péjoratif et aucun traitement spécifique n'est actuellement disponible. Nous espérons que ce travail de thèse permettra d'aider les praticiens à l'interprétation de la pathogénicité des variants *KCNB1*, à la prise en charge des patients et à la délivrance d'une information pronostique aux familles.

En parallèle, nous avons étudié les caractéristiques phénotypiques de modèles poissons-zèbres avec perte-de-fonction de *kcnb1* et obtenu des résultats préliminaires prometteurs pour la modélisation des troubles neurodéveloppementaux de l'encéphalopathie *KCNB1*. Ces modèles ainsi validés s'ajouteront aux modèles existants pour améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents et ouvrir la voie au développement de thérapies ciblées.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---





- Afrikanova, T., Serruys, A.-S. K., Buenafe, O. E. M., Clinckers, R., Smolders, I., de Witte, P. A. M., Crawford, A. D., & Esguerra, C. V. (2013). Validation of the Zebrafish Pentylenetetrazol Seizure Model: Locomotor versus Electrographic Responses to Antiepileptic Drugs. *PLoS ONE*, *8*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054166>
- Allen, N. M., Conroy, J., Shahwan, A., Lynch, B., Correa, R. G., Pena, S. D. J., McCreary, D., Magalhães, T. R., Ennis, S., Lynch, S. A., & King, M. D. (2016). Unexplained early onset epileptic encephalopathy: Exome screening and phenotype expansion. *Epilepsia*, *57*(1), e12-17. <https://doi.org/10.1111/epi.13250>
- Amberg, G. C., & Santana, L. F. (2006). Kv2 channels oppose myogenic constriction of rat cerebral arteries. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *291*(2), C348-356. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00086.2006>
- Antonucci, D. E., Lim, S. T., Vassanelli, S., & Trimmer, J. S. (2001). Dynamic localization and clustering of dendritic Kv2.1 voltage-dependent potassium channels in developing hippocampal neurons. *Neuroscience*, *108*(1), 69-81. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00476-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00476-6)
- Bar, C., Barcia, G., Jennesson, M., Le Guyader, G., Schneider, A., Mignot, C., Lesca, G., Breuillard, D., Montomoli, M., Keren, B., Doummar, D., Billette de Villemeur, T., Afenjar, A., Marey, I., Gerard, M., Isnard, H., Poisson, A., Dupont, S., Berquin, P., ... Nabbout, R. (2020). Expanding the genetic and phenotypic relevance of KCNB1 variants in developmental and epileptic encephalopathies: 27 new patients and overview of the literature. *Human Mutation*, *41*(1), 69-80. <https://doi.org/10.1002/humu.23915>
- Bar, C., Kuchenbuch, M., Barcia, G., Schneider, A., Jennesson, M., Guyader, G. L., Lesca, G., Mignot, C., Montomoli, M., Parrini, E., Isnard, H., Rolland, A., Keren, B., Afenjar, A., Dorison, N., Sadleir, L. G., Breuillard, D., Levy, R., Rio, M., ... Nabbout, R. (2020). Developmental and epilepsy spectrum of KCNB1 encephalopathy with long-term outcome. *Epilepsia*, *61*(11), 2461-2473. <https://doi.org/10.1111/epi.16679>
- Baraban, S. C., Dinday, M. T., & Hortopan, G. A. (2013). Drug screening in Scn1a zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment. *Nature Communications*, *4*, 2410. <https://doi.org/10.1038/ncomms3410>
- Baraban, S. C., Taylor, M. R., Castro, P. A., & Baier, H. (2005). Pentylenetetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience*, *131*(3), 759-768. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.11.031>
- Barcia, G., Fleming, M. R., Deligniere, A., Gazula, V.-R., Brown, M. R., Langouet, M., Chen, H., Kronengold, J., Abhyankar, A., Cilio, R., Nitschke, P., Kaminska, A., Boddaert, N., Casanova, J.-L., Desguerre, I., Munnich, A., Dulac, O., Kaczmarek, L. K., Colleaux, L., & Nabbout, R. (2012). De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nature Genetics*, *44*(11), 1255-1259. <https://doi.org/10.1038/ng.2441>
- Baxendale, S., Holdsworth, C. J., Meza Santoscoy, P. L., Harrison, M. R. M., Fox, J., Parkin, C. A., Ingham, P. W., & Cunliffe, V. T. (2012). Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Disease Models & Mechanisms*, *5*(6), 773-784. <https://doi.org/10.1242/dmm.010090>

- Bedell, V. M., Wang, Y., Campbell, J. M., Poshusta, T. L., Starker, C. G., Krug, R. G., Tan, W., Penheiter, S. G., Ma, A. C., Leung, A. Y. H., Fahrenkrug, S. C., Carlson, D. F., Voytas, D. F., Clark, K. J., Essner, J. J., & Ekker, S. C. (2012). In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, *491*(7422), 114-118. <https://doi.org/10.1038/nature11537>
- Bekkers, J. M. (2000). Distribution and activation of voltage-gated potassium channels in cell-attached and outside-out patches from large layer 5 cortical pyramidal neurons of the rat. *The Journal of Physiology*, *525 Pt 3*, 611-620. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00611.x>
- Berg, A. T., Berkovic, S. F., Brodie, M. J., Buchhalter, J., Cross, J. H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T. A., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D., Plouin, P., & Scheffer, I. E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, *51*(4), 676-685. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x>
- Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., & Goldsmith, P. (2007). Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Research*, *75*(1), 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.03.015>
- Bishop, H. I., Cobb, M. M., Kirmiz, M., Parajuli, L. K., Mandikian, D., Philp, A. M., Melnik, M., Kuja-Panula, J., Rauvala, H., Shigemoto, R., Murray, K. D., & Trimmer, J. S. (2018). Kv2 Ion Channels Determine the Expression and Localization of the Associated AMIGO-1 Cell Adhesion Molecule in Adult Brain Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 1. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00001>
- Blaine, J. T., & Ribera, A. B. (1998). Heteromultimeric Potassium Channels Formed by Members of the Kv2 Subfamily. *Journal of Neuroscience*, *18*(23), 9585-9593. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-09585.1998>
- Bocksteins, E., Mayeur, E., Van Tilborg, A., Regnier, G., Timmermans, J.-P., & Snyders, D. J. (2014). The subfamily-specific interaction between Kv2.1 and Kv6.4 subunits is determined by interactions between the N- and C-termini. *PloS One*, *9*(6), e98960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098960>
- Brain tissue expression of KCNB1—Summary—The Human Protein Atlas*. (s. d.). Consulté 1 octobre 2021, à l'adresse <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000158445-KCNB1/brain>
- Burgess, H. A., & Granato, M. (2007). Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. *Journal of Experimental Biology*, *210*(14), 2526-2539. <https://doi.org/10.1242/jeb.003939>
- Burrows, D. R. W., Samarut, É., Liu, J., Baraban, S. C., Richardson, M. P., Meyer, M. P., & Rosch, R. E. (2020). Imaging epilepsy in larval zebrafish. *European Journal of Paediatric Neurology*, *24*, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2020.01.006>
- Calbiac, H. de, Dabacan, A., Muresan, R., Kabashi, E., & Ciura, S. (2021). Behavioral And Physiological Analysis In A Zebrafish Model Of Epilepsy. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, *176*, e58837. <https://doi.org/10.3791/58837>
- Calhoun, J. D., Vanoye, C. G., Kok, F., George, A. L., & Kearney, J. A. (2017). Characterization of a KCNB1 variant associated with autism, intellectual disability, and epilepsy. *Neurology Genetics*, *3*(6), e198. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000198>
- Challal, S., Buenafe, O. E. M., Queiroz, E. F., Maljevic, S., Marcourt, L., Bock, M., Kloeti, W., Dayrit, F. M., Harvey, A. L., Lerche, H., Esguerra, C. V., de Witte, P. A. M., Wolfender, J.-L., & Crawford, A. D. (2014). Zebrafish Bioassay-Guided Microfractionation Identifies Anticonvulsant Steroid Glycosides from the Philippine

- Medicinal Plant *Solanum torvum*. *ACS Chemical Neuroscience*, 5(10), 993-1004. <https://doi.org/10.1021/cn5001342>
- Chege, S. W., Hortopan, G. A., Dinday, M. T., & Baraban, S. C. (2012). Expression and function of KCNQ channels in larval zebrafish. *Developmental Neurobiology*, 72(2), 186-198. <https://doi.org/10.1002/dneu.20937>
- Chen, T.-W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., Schreiter, E. R., Kerr, R. A., Orger, M. B., Jayaraman, V., Looger, L. L., Svoboda, K., & Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), 295-300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>
- Choe, S. (2002). Potassium channel structures. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(2), 115-121. <https://doi.org/10.1038/nrn727>
- Ciura, S., Lattante, S., Le Ber, I., Latouche, M., Tostivint, H., Brice, A., & Kabashi, E. (2013). Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 74(2), 180-187. <https://doi.org/10.1002/ana.23946>
- Claes, L., Del-Favero, J., Ceulemans, B., Lagae, L., Van Broeckhoven, C., & De Jonghe, P. (2001). De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *American Journal of Human Genetics*, 68(6), 1327-1332. <https://doi.org/10.1086/320609>
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. (1985). Proposal for Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes. *Epilepsia*, 26(3), 268-278. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1985.tb05417.x>
- Costain, G., Cordeiro, D., Matviychuk, D., & Mercimek-Andrews, S. (2019). Clinical Application of Targeted Next-Generation Sequencing Panels and Whole Exome Sequencing in Childhood Epilepsy. *Neuroscience*, 418, 291-310. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.016>
- Cotella, D., Hernandez-Enriquez, B., Wu, X., Li, R., Pan, Z., Leveille, J., Link, C. D., Oddo, S., & Sesti, F. (2012). Toxic Role of K<sup>+</sup> Channel Oxidation in Mammalian Brain. *The Journal of Neuroscience*, 32(12), 4133-4144. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6153-11.2012>
- de Abreu, M. S., Genario, R., Giacomini, A. C. V. V., Demin, K. A., Lakstygai, A. M., Amstislavskaya, T. G., Fontana, B. D., Parker, M. O., & Kalueff, A. V. (2020). Zebrafish as a Model of Neurodevelopmental Disorders. *Neuroscience*, 445, 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.034>
- de Calbiac, H., Dabacan, A., Marsan, E., Tostivint, H., Devienne, G., Ishida, S., Leguern, E., Baulac, S., Muresan, R. C., Kabashi, E., & Ciura, S. (2018). Depdc5 knockdown causes mTOR-dependent motor hyperactivity in zebrafish. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 5(5), 510-523. <https://doi.org/10.1002/acn3.542>
- de Kovel, C. G. F., Brilstra, E. H., van Kempen, M. J. A., van't Slot, R., Nijman, I. J., Afawi, Z., De Jonghe, P., Djémié, T., Guerrini, R., Hardies, K., Helbig, I., Hendrickx, R., Kanaan, M., Kramer, U., Lehesjoki, A.-E. E., Lemke, J. R., Marini, C., Mei, D., Møller, R. S., ... Koeleman, B. P. C. (2016). Targeted sequencing of 351 candidate genes for epileptic encephalopathy in a large cohort of patients. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 4(5), 568-580. <https://doi.org/10.1002/mgg3.235>
- de Kovel, C. G. F., Syrbe, S., Brilstra, E. H., Verbeek, N., Kerr, B., Dubbs, H., Bayat, A., Desai, S., Naidu, S., Srivastava, S., Cagaylan, H., Yis, U., Saunders, C., Rook, M., Plugge, S., Muhle, H., Afawi, Z., Klein, K.-M., Jayaraman, V., ... Koeleman, B. P. C. (2017). Neurodevelopmental Disorders Caused by De Novo Variants in *KCNB1* Genotypes and Phenotypes. *JAMA Neurology*, 74(10), 1228. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.1714>

- Demos, M., Guella, I., DeGuzman, C., McKenzie, M. B., Buerki, S. E., Evans, D. M., Toyota, E. B., Boelman, C., Huh, L. L., Datta, A., Michoulas, A., Selby, K., Bjornson, B. H., Horvath, G., Lopez-Rangel, E., van Karnebeek, C. D. M., Salvarinova, R., Slade, E., Eydoux, P., ... Farrer, M. J. (2019). Diagnostic Yield and Treatment Impact of Targeted Exome Sequencing in Early-Onset Epilepsy. *Frontiers in Neurology, 10*, 434. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00434>
- Deutsch, E., Weigel, A. V., Akin, E. J., Fox, P., Hansen, G., Haberkorn, C. J., Loftus, R., Krapf, D., & Tamkun, M. M. (2012). Kv2.1 cell surface clusters are insertion platforms for ion channel delivery to the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell, 23*(15), 2917-2929. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-01-0047>
- Dinday, M. T., & Baraban, S. C. (2015). Large-Scale Phenotype-Based Antiepileptic Drug Screening in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome. *ENeuro, 2*(4). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0068-15.2015>
- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R. R., Chong, M., McDermid, J. R., & Brustein, E. (2002). Development of the locomotor network in zebrafish. *Progress in Neurobiology, 68*(2), 85-111. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00075-8)
- Du, J., Haak, L. L., Phillips-Tansey, E., Russell, J. T., & McBain, C. J. (2000). Frequency-dependent regulation of rat hippocampal somato-dendritic excitability by the K<sup>+</sup> channel subunit Kv2.1. *The Journal of Physiology, 522*(Pt 1), 19-31. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00019.xm>
- Du, J., Tao-Cheng, J. H., Zerfas, P., & McBain, C. J. (1998). The K<sup>+</sup> channel, Kv2.1, is apposed to astrocytic processes and is associated with inhibitory postsynaptic membranes in hippocampal and cortical principal neurons and inhibitory interneurons. *Neuroscience, 84*(1), 37-48. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00519-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00519-8)
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, 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*(4), 475-482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Perez, E. R., Scheffer, I. E., & Zuberi, S. M. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia, 58*(4), 522-530. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>
- Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia, 46*(4), 470-472. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x>
- Fitzgerald, T., Gerety, S., Jones, W., van Kogelenberg, M., King, D., McRae, J., Morley, K., Parthiban, V., Al-Turki, S., Ambridge, K., Barrett, D., Bayzatinova, T., Clayton, S., Coomber, E., Gribble, S., Jones, P., Krishnappa, N., Mason, L., Middleton, A., ... Hurles, M. (2015). Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature, 519*(7542), 223-228. <https://doi.org/10.1038/nature14135>
- Fox, P. D., Haberkorn, C. J., Akin, E. J., Seel, P. J., Krapf, D., & Tamkun, M. M. (2015). Induction of stable ER-plasma-membrane junctions by Kv2.1 potassium channels. *Journal of Cell Science, 128*(11), 2096-2105. <https://doi.org/10.1242/jcs.166009>
- Fuller, T. D., Westfall, T. A., Das, T., Dawson, D. V., & Slusarski, D. C. (2018). High-Throughput Behavioral Assay to Investigate Seizure Sensitivity in Zebrafish Implicates ZFH3 in Epilepsy. *Journal of neurogenetics, 32*(2), 92-105. <https://doi.org/10.1080/01677063.2018.1445247>

- Gaillard-Seux, P. (2017). L'épilepsie de l'enfant dans l'Antiquité (ier-ve siècles) : Prévention et traitement. *Annales de Bretagne et des Pays de l'Ouest. Anjou. Maine. Poitou-Charente. Touraine*, 124, 175-202. <https://doi.org/10.4000/abpo.3705>
- Gallo, A., Vannier, C., & Galli, T. (2016). Endoplasmic Reticulum–Plasma Membrane Associations : Structures and Functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32(1), 279-301. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125024>
- Gastaut, H. (1970). Clinical and Electroencephalographical Classification of Epileptic Seizures. *Epilepsia*, 11(1), 102-112. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1970.tb03871.x>
- Gawel, K., Langlois, M., Martins, T., van der Ent, W., Tiraboschi, E., Jacmin, M., Crawford, A. D., & Esguerra, C. V. (2020). Seizing the moment : Zebrafish epilepsy models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 116, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.06.010>
- Gawel, K., Turski, W. A., van der Ent, W., Mathai, B. J., Kirstein-Smardzewska, K. J., Simonsen, A., & Esguerra, C. V. (2019). Phenotypic Characterization of Larval Zebrafish (*Danio rerio*) with Partial Knockdown of the cacna1a Gene. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01860-x>
- Gibbs, F. A., LENNOX, W. G., & GIBBS, E. L. (1936). THE ELECTRO-ENCEPHALOGRAM IN DIAGNOSIS AND IN LOCALIZATION OF EPILEPTIC SEIZURES. *Archives of Neurology & Psychiatry*, 36(6), 1225-1235. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1936.02260120072005>
- Green, J., Collins, C., Kyzar, E. J., Pham, M., Roth, A., Gaikwad, S., Cachat, J., Stewart, A. M., Landsman, S., Grieco, F., Tegelenbosch, R., Noldus, L. P. J. J., & Kalueff, A. V. (2012). Automated high-throughput neurophenotyping of zebrafish social behavior. *Journal of Neuroscience Methods*, 210(2), 266-271. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.07.017>
- Griffin, A., Krasniak, C., & Baraban, S. C. (2016). Advancing epilepsy treatment through personalized genetic zebrafish models. In *Progress in Brain Research* (Vol. 226, p. 195-207). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.03.012>
- Grone, B. P., Marchese, M., Hamling, K. R., Kumar, M. G., Krasniak, C. S., Sicca, F., Santorelli, F. M., Patel, M., & Baraban, S. C. (2016). Epilepsy, Behavioral Abnormalities, and Physiological Comorbidities in Syntaxin-Binding Protein 1 (STXBP1) Mutant Zebrafish. *PLoS ONE*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151148>
- Grone, B. P., Qu, T., & Baraban, S. C. (2017). Behavioral Comorbidities and Drug Treatments in a Zebrafish *scn1lab* Model of Dravet Syndrome. *eNeuro*, 4(4). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0066-17.2017>
- Guan, D., Tkatch, T., Surmeier, D. J., Armstrong, W. E., & Foehring, R. C. (2007). Kv2 subunits underlie slowly inactivating potassium current in rat neocortical pyramidal neurons. *The Journal of Physiology*, 581(Pt 3), 941-960. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.128454>
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stühmer, W., & Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 473-508. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.10>
- Hawkins, N. A., Misra, S. N., Jurado, M., Kang, S. K., Vierra, N. C., Nguyen, K., Wren, L., George, A. L., Trimmer, J. S., & Kearney, J. A. (2021). Epilepsy and neurobehavioral abnormalities in mice with a dominant-negative KCNB1 pathogenic variant. *Neurobiology of Disease*, 147, 105141. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105141>

- Helbig, I., & Abou Tayoun, A. N. (2016). Understanding Genotypes and Phenotypes in Epileptic Encephalopathies. *Molecular Syndromology*, 7(4), 172-181. <https://doi.org/10.1159/000448530>
- Helbig, K. L., Farwell Hagman, K. D., Shinde, D. N., Mroske, C., Powis, Z., Li, S., Tang, S., & Helbig, I. (2016). Diagnostic exome sequencing provides a molecular diagnosis for a significant proportion of patients with epilepsy. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 18(9), 898-905. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.186>
- Heron, S. E., Smith, K. R., Bahlo, M., Nobili, L., Kahana, E., Licchetta, L., Oliver, K. L., Mazarib, A., Afawi, Z., Korczyn, A., Plazzi, G., Petrou, S., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E., & Dibbens, L. M. (2012). Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene KCNT1 cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nature Genetics*, 44(11), 1188-1190. <https://doi.org/10.1038/ng.2440>
- Hoffman, E. J., Turner, K. J., Fernandez, J. M., Cifuentes, D., Ghosh, M., Ijaz, S., Jain, R. A., Kubo, F., Bill, B. R., Baier, H., Granato, M., Barresi, M. J. F., Wilson, S. W., Rihel, J., State, M. W., & Giraldez, A. J. (2016). Estrogens Suppress a Behavioral Phenotype in Zebrafish Mutants of the Autism Risk Gene, CNTNAP2. *Neuron*, 89(4), 725-733. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.039>
- Hortopan, G. A., & Baraban, S. C. (2011). Aberrant expression of genes necessary for neuronal development and notch signaling in an epileptic mind bomb zebrafish. *Developmental Dynamics*, 240(8), 1964-1976. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22680>
- Hortopan, G. A., Dinday, M. T., & Baraban, S. C. (2010a). Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy. *Disease Models & Mechanisms*, 3(3-4), 144-148. <https://doi.org/10.1242/dmm.002139>
- Hortopan, G. A., Dinday, M. T., & Baraban, S. C. (2010b). Spontaneous Seizures and Altered Gene Expression in GABA Signaling Pathways in a mind bomb Mutant Zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 30(41), 13718-13728. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1887-10.2010>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498-503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hruscha, A., Krawitz, P., Rechenberg, A., Heinrich, V., Hecht, J., Haass, C., & Schmid, B. (2013). Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 140(24), 4982-4987. <https://doi.org/10.1242/dev.099085>
- Hunyadi, B., Siekierska, A., Sourbron, J., Copmans, D., & de Witte, P. A. M. (2017). Automated analysis of brain activity for seizure detection in zebrafish models of epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods*, 287, 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.05.024>
- Hwang, P. M., Fotuhi, M., Bredt, D. S., Cunningham, A. M., & Snyder, S. H. (1993). Contrasting immunohistochemical localizations in rat brain of two novel K<sup>+</sup> channels of the Shab subfamily. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(4), 1569-1576.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J.-R. J., & Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3), 227-229. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>

- Imbrici, P., Liantonio, A., Camerino, G. M., De Bellis, M., Camerino, C., Mele, A., Giustino, A., Pierno, S., De Luca, A., Tricarico, D., Desaphy, J.-F., & Conte, D. (2016). Therapeutic Approaches to Genetic Ion Channelopathies and Perspectives in Drug Discovery. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 121. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00121>
- Jang, S. S., Kim, S. Y., Kim, H., Hwang, H., Chae, J. H., Kim, K. J., Kim, J.-I., & Lim, B. C. (2019). Diagnostic Yield of Epilepsy Panel Testing in Patients With Seizure Onset Within the First Year of Life. *Frontiers in Neurology*, 10, 988. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00988>
- Jedrychowska, J., Gasanov, E. V., & Korzh, V. (2021). Kcnb1 plays a role in development of the inner ear. *Developmental Biology*, 471, 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.12.007>
- Jędrychowska, J., & Korzh, V. (2019). Kv2.1 voltage-gated potassium channels in developmental perspective. *Developmental Dynamics*, 248(12), 1180-1194. <https://doi.org/10.1002/dvdy.114>
- Jiao, S., Liu, Z., Ren, W.-H., Ding, Y., Zhang, Y.-Q., Zhang, Z.-H., & Mei, Y.-A. (2007). CAMP/protein kinase A signalling pathway protects against neuronal apoptosis and is associated with modulation of Kv2.1 in cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry*, 100(4), 979-991. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04261.x>
- Johnson, B., Leek, A. N., Solé, L., Maverick, E. E., Levine, T. P., & Tamkun, M. M. (2018). Kv2 potassium channels form endoplasmic reticulum/plasma membrane junctions via interaction with VAPA and VAPB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(31), E7331-E7340. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805757115>
- Johnson, B., Leek, A. N., & Tamkun, M. M. (2019). Kv2 channels create endoplasmic reticulum / plasma membrane junctions : A brief history of Kv2 channel subcellular localization. *Channels*, 13(1), 88-101. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1568824>
- Ju, M., Stevens, L., Leadbitter, E., & Wray, D. (2003). The Roles of N- and C-terminal determinants in the activation of the Kv2.1 potassium channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 12769-12778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212973200>
- Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., Craddock, C., Kyzar, E. J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., ... Schneider, and the Z. N. R. C. (ZNRC), Henning. (2013). Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond. *Zebrafish*, 10(1), 70-86. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861>
- Kang, S. K., Vanoye, C. G., Misra, S. N., Echevarria, D. M., Calhoun, J. D., O'Connor, J. B., Fabre, K. L., McKnight, D., Demmer, L., Goldenberg, P., Grote, L. E., Thiffault, I., Saunders, C., Strauss, K. A., Torkamani, A., Smagt, J. van der, Gassen, K. van, Carson, R. P., Diaz, J., ... Kearney, J. A. (2019). Spectrum of KV2.1 Dysfunction in KCNB1-Associated Neurodevelopmental Disorders. *Annals of Neurology*, 86(6), 899-912. <https://doi.org/10.1002/ana.25607>
- Keezer, M. R., Sisodiya, S. M., & Sander, J. W. (2016). Comorbidities of epilepsy : Current concepts and future perspectives. *The Lancet Neurology*, 15(1), 106-115. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00225-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00225-2)
- Keller, P. J., & Ahrens, M. B. (2015). Visualizing Whole-Brain Activity and Development at the Single-Cell Level Using Light-Sheet Microscopy. *Neuron*, 85(3), 462-483. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.039>



- Kim, O.-H., Cho, H.-J., Han, E., Hong, T. I., Ariyasiri, K., Choi, J.-H., Hwang, K.-S., Jeong, Y.-M., Yang, S.-Y., Yu, K., Park, D.-S., Oh, H.-W., Davis, E. E., Schwartz, C. E., Lee, J.-S., Kim, H.-G., & Kim, C.-H. (2017). Zebrafish knockout of Down syndrome gene, DYRK1A, shows social impairments relevant to autism. *Molecular Autism*, 8, 50. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0168-2>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253-310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kimmel, C. B., Ullmann, B., Walker, M., Miller, C. T., & Crump, J. G. (2003). Endothelin 1-mediated regulation of pharyngeal bone development in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 130(7), 1339-1351. <https://doi.org/10.1242/dev.00338>
- King, A. N., Manning, C. F., & Trimmer, J. S. (2014). A Unique Ion Channel Clustering Domain on the Axon Initial Segment of Mammalian Neurons. *The Journal of comparative neurology*, 522(11), 2594-2608. <https://doi.org/10.1002/cne.23551>
- Ko, A., Youn, S. E., Kim, S. H., Lee, J. S., Kim, S., Choi, J. R., Kim, H. D., Lee, S.-T., & Kang, H.-C. (2018). Targeted gene panel and genotype-phenotype correlation in children with developmental and epileptic encephalopathy. *Epilepsy Research*, 141, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.02.003>
- Kokel, D., Bryan, J., Laggner, C., White, R., Cheung, C. Y. J., Mateus, R., Healey, D., Kim, S., Werdich, A. A., Haggarty, S. J., Macrae, C. A., Shoichet, B., & Peterson, R. T. (2010). Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nature Chemical Biology*, 6(3), 231-237. <https://doi.org/10.1038/nchembio.307>
- Kuchenbuch, M., Barcia, G., Chemaly, N., Carme, E., Roubertie, A., Gibaud, M., Van Bogaert, P., de Saint Martin, A., Hirsch, E., Dubois, F., Sarret, C., Nguyen The Tich, S., Laroche, C., des Portes, V., Billette de Villemeur, T., Barthez, M.-A., Auvin, S., Bahi-Buisson, N., Desguerre, I., ... Nabbout, R. (2019). KCNT1 epilepsy with migrating focal seizures shows a temporal sequence with poor outcome, high mortality and SUDEP. *Brain*, 142(10), 2996-3008. <https://doi.org/10.1093/brain/awz240>
- Kuwada, J. Y. (1986). Cell recognition by neuronal growth cones in a simple vertebrate embryo. *Science (New York, N.Y.)*, 233(4765), 740-746. <https://doi.org/10.1126/science.3738507>
- Latypova, X., Matsumoto, N., Vincelas-Muller, C., Bézieau, S., Isidor, B., & Miyake, N. (2017). Novel KCNB1 mutation associated with non-syndromic intellectual disability. *Journal of Human Genetics*, 62(5), 569-573. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.154>
- Lee, S., Milescu, M., Jung, H. H., Lee, J. Y., Bae, C. H., Lee, C. W., Kim, H. H., Swartz, K. J., & Kim, J. I. (2010). Solution structure of GxTX-1E, a high affinity tarantula toxin interacting with voltage sensors in Kv2.1 potassium channels. *Biochemistry*, 49(25), 5134-5142. <https://doi.org/10.1021/bi100246u>
- Li, X. N., Herrington, J., Petrov, A., Ge, L., Eiermann, G., Xiong, Y., Jensen, M. V., Hohmeier, H. E., Newgard, C. B., Garcia, M. L., Wagner, M., Zhang, B. B., Thornberry, N. A., Howard, A. D., Kaczorowski, G. J., & Zhou, Y.-P. (2013). The role of voltage-gated potassium channels Kv2.1 and Kv2.2 in the regulation of insulin and somatostatin release from pancreatic islets. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 344(2), 407-416. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.199083>
- Lim, S. T., Antonucci, D. E., Scannevin, R. H., & Trimmer, J. S. (2000). A novel targeting signal for proximal clustering of the Kv2.1 K<sup>+</sup> channel in hippocampal neurons. *Neuron*, 25(2), 385-397.
- Liu, C., Wang, Y., Deng, J., Lin, J., Hu, C., Li, Q., & Xu, X. (2021). Social Deficits and Repetitive Behaviors Are Improved by Early Postnatal Low-Dose VPA Intervention in

- a Novel shank3-Deficient Zebrafish Model. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 682054. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.682054>
- Liu, C.-X., Li, C.-Y., Hu, C.-C., Wang, Y., Lin, J., Jiang, Y.-H., Li, Q., & Xu, X. (2018). CRISPR/Cas9-induced shank3b mutant zebrafish display autism-like behaviors. *Molecular Autism*, 9, 23. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0204-x>
- Liu, K., Petree, C., Requena, T., Varshney, P., & Varshney, G. K. (2019). Expanding the CRISPR Toolbox in Zebrafish for Studying Development and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00013>
- Liu, P. W., & Bean, B. P. (2014). Kv2 Channel Regulation of Action Potential Repolarization and Firing Patterns in Superior Cervical Ganglion Neurons and Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 34(14), 4991-5002. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1925-13.2014>
- Magiorkinis, E., Sidiropoulou, K., & Diamantis, A. (2010). Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity. *Epilepsy & Behavior*, 17(1), 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.10.023>
- Mandikian, D., Bocksteins, E., Parajuli, L. K., Bishop, H. I., Cerda, O., Shigemoto, R., & Trimmer, J. S. (2014). Cell Type Specific Spatial and Functional Coupling Between Mammalian Brain Kv2.1 K<sup>+</sup> Channels and Ryanodine Receptors. *The Journal of comparative neurology*, 522(15), 3555-3574. <https://doi.org/10.1002/cne.23641>
- Marini, C., Romoli, M., Parrini, E., Costa, C., Mei, D., Mari, F., Parmeggiani, L., Procopio, E., Metitieri, T., Cellini, E., Virdò, S., De Vita, D., Gentile, M., Prontera, P., Calabresi, P., & Guerrini, R. (2017). Clinical features and outcome of 6 new patients carrying de novo KCNB1 gene mutations. *Neurology: Genetics*, 3(6). <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000206>
- McTague, A., Howell, K. B., Cross, J. H., Kurian, M. A., & Scheffer, I. E. (2016). The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *The Lancet Neurology*, 15(3), 304-316. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00250-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00250-1)
- Menelaou, E., Husbands, E. E., Pollet, R. G., Coutts, C. A., Ali, D. W., & Svoboda, K. R. (2008). Embryonic motor activity and implications for regulating motoneuron axonal pathfinding in zebrafish. *The European Journal of Neuroscience*, 28(6), 1080-1096. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06418.x>
- Miao, P., Feng, J., Guo, Y., Wang, J., Xu, X., Wang, Y., Li, Y., Gao, L., Zheng, C., & Cheng, H. (2018). Genotype and phenotype analysis using an epilepsy-associated gene panel in Chinese pediatric epilepsy patients. *Clinical Genetics*, 94(6), 512-520. <https://doi.org/10.1111/cge.13441>
- Miao, P., Peng, J., Chen, C., Gai, N., & Yin, F. (2017). [A novel mutation in KCNB1 gene in a child with neuropsychiatric comorbidities with both intellectual disability and epilepsy and review of literature]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi = Chinese Journal of Pediatrics*, 55(2), 115-119. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2017.02.012>
- Millichap, J. J., Park, K. L., Tsuchida, T., Ben-Zeev, B., Carmant, L., Flamini, R., Joshi, N., Levisohn, P. M., Marsh, E., Nangia, S., Narayanan, V., Ortiz-Gonzalez, X. R., Patterson, M. C., Pearl, P. L., Porter, B., Ramsey, K., McGinnis, E. L., Tagliatalata, M., Tracy, M., ... Cooper, E. C. (2016). KCNQ2 encephalopathy: Features, mutational hot spots, and ezogabine treatment of 11 patients. *Neurology: Genetics*, 2(5), e96. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000096>
- Misonou, H. (2010). Homeostatic regulation of neuronal excitability by K(+) channels in normal and diseased brains. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 16(1), 51-64. <https://doi.org/10.1177/1073858409341085>

- Misonou, H., Menegola, M., Mohapatra, D. P., Guy, L. K., Park, K.-S., & Trimmer, J. S. (2006). Bidirectional activity-dependent regulation of neuronal ion channel phosphorylation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(52), 13505-13514. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3970-06.2006>
- Misonou, H., Mohapatra, D. P., Menegola, M., & Trimmer, J. S. (2005). Calcium- and Metabolic State-Dependent Modulation of the Voltage-Dependent Kv2.1 Channel Regulates Neuronal Excitability in Response to Ischemia. *The Journal of Neuroscience*, 25(48), 11184-11193. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3370-05.2005>
- Misonou, H., Mohapatra, D. P., Park, E. W., Leung, V., Zhen, D., Misonou, K., Anderson, A. E., & Trimmer, J. S. (2004). Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. *Nature Neuroscience*, 7(7), 711-718. <https://doi.org/10.1038/nn1260>
- Misonou, H., Mohapatra, D. P., & Trimmer, J. S. (2005). Kv2.1: A Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel Critical to Dynamic Control of Neuronal Excitability. *NeuroToxicology*, 26(5), 743-752. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2005.02.003>
- Mohapatra, D. P., Misonou, H., Pan, S.-J., Held, J. E., Surmeier, D. J., & Trimmer, J. S. (2009). Regulation of intrinsic excitability in hippocampal neurons by activity-dependent modulation of the KV2.1 potassium channel. *Channels (Austin, Tex.)*, 3(1), 46-56. <https://doi.org/10.4161/chan.3.1.7655>
- Mohapatra, D. P., Siino, D. F., & Trimmer, J. S. (2008). Interdomain Cytoplasmic Interactions Govern the Intracellular Trafficking, Gating, and Modulation of the Kv2.1 Channel. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(19), 4982-4994. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0186-08.2008>
- Møller, R. S., Larsen, L. H. G., Johannesen, K. M., Talvik, I., Talvik, T., Vaher, U., Miranda, M. J., Farooq, M., Nielsen, J. E. K., Svendsen, L. L., Kjelgaard, D. B., Linnet, K. M., Hao, Q., Uldall, P., Frangu, M., Tommerup, N., Baig, S. M., Abdullah, U., Born, A. P., ... Dahl, H. A. (2016). Gene Panel Testing in Epileptic Encephalopathies and Familial Epilepsies. *Molecular Syndromology*, 7(4), 210-219. <https://doi.org/10.1159/000448369>
- Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L., & Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 237(4811), 192-197. <https://doi.org/10.1126/science.3037702>
- Muennich, E. A. L., & Fyffe, R. E. W. (2004). Focal aggregation of voltage-gated, Kv2.1 subunit-containing, potassium channels at synaptic sites in rat spinal motoneurons. *The Journal of Physiology*, 554(Pt 3), 673-685. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.056192>
- Murakoshi, H., & Trimmer, J. S. (1999). Identification of the Kv2.1 K<sup>+</sup> Channel as a Major Component of the Delayed Rectifier K<sup>+</sup> Current in Rat Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 19(5), 1728-1735. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-05-01728.1999>
- Nabbout, R., & Kuchenbuch, M. (2020). Impact of predictive, preventive and precision medicine strategies in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 16(12), 674-688. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0409-4>
- Niday, Z., & Tzingounis, A. V. (2018). Potassium Channel Gain of Function in Epilepsy : An Unresolved Paradox. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 1073858418763752. <https://doi.org/10.1177/1073858418763752>

- Ogungbemi, A. O., Teixeira, E., Massei, R., Scholz, S., & Küster, E. (2021). Automated measurement of the spontaneous tail coiling of zebrafish embryos as a sensitive behavior endpoint using a workflow in KNIME. *MethodsX*, 8, 101330. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101330>
- Oliveira, A. Á. S. de, Brigante, T., & Oliveira, D. (2021). Tail Coiling Assay in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos: Stage of Development, Promising Positive Control Candidates, and Selection of an Appropriate Organic Solvent for Screening of Developmental Neurotoxicity (DNT). *Water*, 13. <https://doi.org/10.3390/w13020119>
- Ottshytsch, N., Raes, A., Van Hoorick, D., & Snyders, D. J. (2002). Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel alpha-subunits identified in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 7986-7991. <https://doi.org/10.1073/pnas.122617999>
- Oyler, J., Maljevic, S., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F., Petrou, S., & Reid, C. A. (2018). Ion Channels in Genetic Epilepsy: From Genes and Mechanisms to Disease-Targeted Therapies. *Pharmacological Reviews*, 70(1), 142-173. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014456>
- Pal, S., Hartnett, K. A., Nerbonne, J. M., Levitan, E. S., & Aizenman, E. (2003). Mediation of neuronal apoptosis by Kv2.1-encoded potassium channels. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(12), 4798-4802.
- Panteliadis, C. P., Vassilyadi, P., Fehlert, J., & Hagel, C. (2017). Historical documents on epilepsy: From antiquity through the 20th century. *Brain & Development*, 39(6), 457-463. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2017.02.002>
- Park, K.-S., Mohapatra, D. P., Misonou, H., & Trimmer, J. S. (2006). Graded regulation of the Kv2.1 potassium channel by variable phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5789), 976-979. <https://doi.org/10.1126/science.1124254>
- Parrini, E., Marini, C., Mei, D., Galuppi, A., Cellini, E., Pucatti, D., Chiti, L., Rutigliano, D., Bianchini, C., Virdò, S., De Vita, D., Bigoni, S., Barba, C., Mari, F., Montomoli, M., Pisano, T., Rosati, A., Clinical Study Group, & Guerrini, R. (2017). Diagnostic Targeted Resequencing in 349 Patients with Drug-Resistant Pediatric Epilepsies Identifies Causative Mutations in 30 Different Genes: HUMAN MUTATION. *Human Mutation*, 38(2), 216-225. <https://doi.org/10.1002/humu.23149>
- Pena, I. A., Roussel, Y., Daniel, K., Mongeon, K., Johnstone, D., Mendes, H. W., Bosma, M., Saxena, V., Lepage, N., Chakraborty, P., Dymont, D. A., van Karnebeek, C. D. M., Verhoeven-Duif, N., Bui, T. V., Boycott, K. M., Ekker, M., & MacKenzie, A. (2017). Pyridoxine-Dependent Epilepsy in Zebrafish Caused by Aldh7a1 Deficiency. *Genetics*, genetics.300137.2017. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300137>
- Pietri, T., Roman, A.-C., Guyon, N., Romano, S. A., Washbourne, P., Moens, C. B., de Polavieja, G. G., & Sumbre, G. (2013). The first mecp2-null zebrafish model shows altered motor behaviors. *Frontiers in Neural Circuits*, 7, 118. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00118>
- Pineda, R. H., Svoboda, K. R., Wright, M. A., Taylor, A. D., Novak, A. E., Gamse, J. T., Eisen, J. S., & Ribera, A. B. (2006). Knockdown of Nav 1.6a Na<sup>+</sup> channels affects zebrafish motoneuron development. *Development*, 133(19), 3827-3836. <https://doi.org/10.1242/dev.02559>
- Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. (1989). *Epilepsia*, 30(4), 389-399. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1989.tb05316.x>

- Raftery, T. D., Isales, G. M., Yozzo, K. L., & Volz, D. C. (2014). High-content screening assay for identification of chemicals impacting spontaneous activity in zebrafish embryos. *Environmental Science & Technology*, 48(1), 804-810. <https://doi.org/10.1021/es404322p>
- Rim, J. H., Kim, S. H., Hwang, I. S., Kwon, S. S., Kim, J., Kim, H. W., Cho, M. J., Ko, A., Youn, S. E., Kim, J., Lee, Y. M., Chung, H. J., Lee, J. S., Kim, H. D., Choi, J. R., Lee, S.-T., & Kang, H.-C. (2018). Efficient strategy for the molecular diagnosis of intractable early-onset epilepsy using targeted gene sequencing. *BMC Medical Genomics*, 11. <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0320-7>
- Rochtus, A., Olson, H. E., Smith, L., Keith, L. G., El Achkar, C., Taylor, A., Mahida, S., Park, M., Kelly, M., Shain, C., Rockowitz, S., Rosen Sheidley, B., & Poduri, A. (2020). Genetic diagnoses in epilepsy : The impact of dynamic exome analysis in a pediatric cohort. *Epilepsia*, 61(2), 249-258. <https://doi.org/10.1111/epi.16427>
- Romer, S. H., Deardorff, A. S., & Fyffe, R. E. W. (2019). A molecular rheostat : Kv2.1 currents maintain or suppress repetitive firing in motoneurons. *The Journal of Physiology*, 597(14), 3769-3786. <https://doi.org/10.1113/JP277833>
- Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Hölper, S., Krüger, M., & Stainier, D. Y. R. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*, 524(7564), 230-233. <https://doi.org/10.1038/nature14580>
- Saint-Amant, L., & Drapeau, P. (1998). Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *Journal of Neurobiology*, 37(4), 622-632. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199812\)37:4<622::AID-NEU10>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199812)37:4<622::AID-NEU10>3.0.CO;2-S)
- Saitsu, H., Akita, T., Tohyama, J., Goldberg-Stern, H., Kobayashi, Y., Cohen, R., Kato, M., Ohba, C., Miyatake, S., Tsurusaki, Y., Nakashima, M., Miyake, N., Fukuda, A., & Matsumoto, N. (2015). De novo KCNB1 mutations in infantile epilepsy inhibit repetitive neuronal firing. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep15199>
- Sakai, C., Ijaz, S., & Hoffman, E. J. (2018). Zebrafish Models of Neurodevelopmental Disorders : Past, Present, and Future. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00294>
- Samanta, D. (2018). Epileptic spasm and de novo KCNB1 mutation : If it is not one potassium channel, it is another! *Acta Neurologica Belgica*. <https://doi.org/10.1007/s13760-018-0950-8>
- Samarut, É. (2016). Zebrafish embryos as in vivo test tubes to unravel cell-specific mechanisms of neurogenesis during neurodevelopment and in diseases. *Neurogenesis*, 3(1). <https://doi.org/10.1080/23262133.2016.1232678>
- Sano, Y., Mochizuki, S., Miyake, A., Kitada, C., Inamura, K., Yokoi, H., Nozawa, K., Matsushime, H., & Furuichi, K. (2002). Molecular cloning and characterization of Kv6.3, a novel modulatory subunit for voltage-gated K(+) channel Kv2.1. *FEBS Letters*, 512(1-3), 230-234.
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y.-H., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies : Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512-521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
- Scheldeman, C., Mills, J. D., Siekierska, A., Serra, I., Copmans, D., Iyer, A. M., Whalley, B. J., Maes, J., Jansen, A. C., Lagae, L., Aronica, E., & de Witte, P. A. M. (2017). mTOR-related neuropathology in mutant tsc2 zebrafish : Phenotypic, transcriptomic and pharmacological analysis. *Neurobiology of Disease*, 108, 225-237. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.09.004>

- Schmid, B., & Haass, C. (2013). Genomic editing opens new avenues for zebrafish as a model for neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, 127(4), 461-470. <https://doi.org/10.1111/jnc.12460>
- Schmidt, R., Strähle, U., & Scholpp, S. (2013). Neurogenesis in zebrafish – from embryo to adult. *Neural Development*, 8, 3. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-3>
- Schoonheim, P. J., Arrenberg, A. B., Del Bene, F., & Baier, H. (2010). Optogenetic Localization and Genetic Perturbation of Saccade-Generating Neurons in Zebrafish. *The Journal of Neuroscience*, 30(20), 7111-7120. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5193-09.2010>
- Shah, N. H., & Aizenman, E. (2014). VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNELS AT THE CROSSROADS OF NEURONAL FUNCTION, ISCHEMIC TOLERANCE, AND NEURODEGENERATION. *Translational stroke research*, 5(1), 38-58. <https://doi.org/10.1007/s12975-013-0297-7>
- Shen, H., Bocksteins, E., Kondrychyn, I., Snyders, D., & Korzh, V. (2016). Functional antagonism of voltage-gated K<sup>+</sup> channel  $\alpha$ -subunits in the developing brain ventricular system. *Development*, 143(22), 4249-4260. <https://doi.org/10.1242/dev.140467>
- Shen, Q.-J., Zhao, Y.-M., Cao, D.-X., & Wang, X.-L. (2009). Contribution of Kv channel subunits to glutamate-induced apoptosis in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 87(14), 3153-3160. <https://doi.org/10.1002/jnr.22136>
- Siekierska, A., Stamberger, H., Deconinck, T., Oprescu, S. N., Partoens, M., Zhang, Y., Sourbron, J., Adriaenssens, E., Mullen, P., Wiencek, P., Hardies, K., Lee, J.-S., Giong, H.-K., Distelmaier, F., Elpeleg, O., Helbig, K. L., Hersh, J., Isikay, S., Jordan, E., ... De Jonghe, P. (2019). Biallelic VARS variants cause developmental encephalopathy with microcephaly that is recapitulated in vars knockout zebrafish. *Nature Communications*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07953-w>
- Singh, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B. R., Leach, R. J., Melis, R., Ronen, G. M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J. V., McHarg, M. L., Gagnon, D., Rosales, T. O., Peiffer, A., Anderson, V. E., & Leppert, M. (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature Genetics*, 18(1), 25-29. <https://doi.org/10.1038/ng0198-25>
- Soden, S. E., Saunders, C. J., Willig, L. K., Farrow, E. G., Smith, L. D., Petrikin, J. E., LePichon, J.-B., Miller, N. A., Thiffault, I., Dinwiddie, D. L., Twist, G., Noll, A., Heese, B. A., Zellmer, L., Atherton, A. M., Abdelmoity, A. T., Safina, N., Nyp, S. S., Zuccarelli, B., ... Kingsmore, S. F. (2014). Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Science translational medicine*, 6(265), 265ra168. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010076>
- Specca, D. J., Ogata, G., Mandikian, D., Bishop, H. I., Wiler, S. W., Eum, K., Wenzel, H. J., Doisy, E. T., Matt, L., Campi, K. L., Golub, M. S., Nerbonne, J. M., Hell, J. W., Trainor, B. C., Sack, J. T., Schwartzkroin, P. A., & Trimmer, J. S. (2014). Deletion of the Kv2.1 delayed rectifier potassium channel leads to neuronal and behavioral hyperexcitability. *Genes, brain, and behavior*, 13(4), 394-408. <https://doi.org/10.1111/gbb.12120>
- Srivastava, S., Cohen, J. S., Vernon, H., Barañano, K., McClellan, R., Jamal, L., Naidu, S., & Fatemi, A. (2014). Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Annals of Neurology*, 76(4), 473-483. <https://doi.org/10.1002/ana.24251>
- Stainier, D. Y. R., Raz, E., Lawson, N. D., Ekker, S. C., Burdine, R. D., Eisen, J. S., Ingham, P. W., Schulte-Merker, S., Yelon, D., Weinstein, B. M., Mullins, M. C., Wilson, S. W., Ramakrishnan, L., Amacher, S. L., Neuhauss, S. C. F., Meng, A., Mochizuki, N.,

- Panula, P., & Moens, C. B. (2017). Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS Genetics*, *13*(10), e1007000. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007000>
- Stefanski, A., Calle-López, Y., Leu, C., Pérez-Palma, E., Pestana-Knight, E., & Lal, D. (2021). Clinical sequencing yield in epilepsy, autism spectrum disorder, and intellectual disability: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsia*, *62*(1), 143-151. <https://doi.org/10.1111/epi.16755>
- Stewart, A. M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., & Kalueff, A. V. (2014). Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. *Trends in Neurosciences*, *37*(5), 264-278. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>
- Stewart, A. M., Nguyen, M., Wong, K., Poudel, M. K., & Kalueff, A. V. (2014). Developing zebrafish models of autism spectrum disorder (ASD). *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *50*, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.11.014>
- Stöðberg, T., Tomson, T., Barbaro, M., Stranneheim, H., Anderlid, B.-M., Carlsson, S., Åmark, P., & Wedell, A. (2020). Epilepsy syndromes, etiologies, and the use of next-generation sequencing in epilepsy presenting in the first 2 years of life: A population-based study. *Epilepsia*, *61*(11), 2486-2499. <https://doi.org/10.1111/epi.16701>
- Sukardi, H., Chng, H. T., Chan, E. C. Y., Gong, Z., & Lam, S. H. (2011). Zebrafish for drug toxicity screening: Bridging the in vitro cell-based models and in vivo mammalian models. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *7*(5), 579-589. <https://doi.org/10.1517/17425255.2011.562197>
- Suls, A., Jaehn, J. A., Kecskés, A., Weber, Y., Weckhuysen, S., Craiu, D. C., Siekierska, A., Djémié, T., Afrikanova, T., Gormley, P., von Spiczak, S., Kluger, G., Iliescu, C. M., Talvik, T., Talvik, I., Meral, C., Caglayan, H. S., Giraldez, B. G., Serratos, J., ... Helbig, I. (2013). De Novo Loss-of-Function Mutations in CHD2 Cause a Fever-Sensitive Myoclonic Epileptic Encephalopathy Sharing Features with Dravet Syndrome. *American Journal of Human Genetics*, *93*(5), 967-975. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.09.017>
- Swaminathan, A., Hassan-Abdi, R., Renault, S., Siekierska, A., Riché, R., Liao, M., de Witte, P. A. M., Yanicostas, C., Soussi-Yanicostas, N., Drapeau, P., & Samarut, É. (2018). Non-canonical mTOR-Independent Role of DEPDC5 in Regulating GABAergic Network Development. *Current Biology: CB*, *28*(12), 1924-1937.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.061>
- Teng, Y., Xie, X., Walker, S., Saxena, M., Kozłowski, D. J., Mumm, J. S., & Cowell, J. K. (2011). Loss of Zebrafish *lgi1b* Leads to Hydrocephalus and Sensitization to Pentylentetrazol Induced Seizure-Like Behavior. *PLOS ONE*, *6*(9), e24596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024596>
- Thiffault, I., Speca, D. J., Austin, D. C., Cobb, M. M., Eum, K. S., Safina, N. P., Grote, L., Farrow, E. G., Miller, N., Soden, S., Kingsmore, S. F., Trimmer, J. S., Saunders, C. J., & Sack, J. T. (2015). A novel epileptic encephalopathy mutation in *KCNB1* disrupts Kv2.1 ion selectivity, expression, and localization. *The Journal of General Physiology*, *146*(5), 399-410. <https://doi.org/10.1085/jgp.201511444>
- Torkamani, A., Bersell, K., Jorge, B. S., Bjork, R. L., Friedman, J. R., Bloss, C. S., Cohen, J., Gupta, S., Naidu, S., Vanoye, C. G., George, A. L., & Kearney, J. A. (2014). De novo *KCNB1* mutations in epileptic encephalopathy. *Annals of Neurology*, *76*(4), 529-540. <https://doi.org/10.1002/ana.24263>
- Trimmer, J. S. (1991). Immunological identification and characterization of a delayed rectifier K<sup>+</sup> channel polypeptide in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(23), 10764-10768.

- Trimmer, J. S. (1998). Regulation of ion channel expression by cytoplasmic subunits. *Current Opinion in Neurobiology*, 8(3), 370-374. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(98\)80063-9](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(98)80063-9)
- Trimmer, J. S. (2015). Subcellular Localization of K<sup>+</sup> Channels in Mammalian Brain Neurons : Remarkable Precision in the Midst of Extraordinary Complexity. *Neuron*, 85(2), 238-256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.042>
- Vliet, S. M., Ho, T. C., & Volz, D. C. (2017). Behavioral screening of the LOPAC1280 library in zebrafish embryos. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 329, 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.06.011>
- Wang, J., Lin, Z.-J., Liu, L., Xu, H.-Q., Shi, Y.-W., Yi, Y.-H., He, N., & Liao, W.-P. (2017). Epilepsy-associated genes. *Seizure*, 44, 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.11.030>
- Weckhuysen, S., Mandelstam, S., Suls, A., Audenaert, D., Deconinck, T., Claes, L. R. F., Deprez, L., Smets, K., Hristova, D., Yordanova, I., Jordanova, A., Ceulemans, B., Jansen, A., Hasaerts, D., Roelens, F., Lagae, L., Yendle, S., Stanley, T., Heron, S. E., ... de Jonghe, P. (2012). KCNQ2 encephalopathy : Emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Annals of Neurology*, 71(1), 15-25. <https://doi.org/10.1002/ana.22644>
- Wei, F., Yan, L.-M., Su, T., He, N., Lin, Z.-J., Wang, J., Shi, Y.-W., Yi, Y.-H., & Liao, W.-P. (2017). Ion Channel Genes and Epilepsy : Functional Alteration, Pathogenic Potential, and Mechanism of Epilepsy. *Neuroscience Bulletin*, 33(4), 455-477. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0134-1>
- Wilson, S. W., Ross, L. S., Parrett, T., & Easter, S. S. (1990). The development of a simple scaffold of axon tracts in the brain of the embryonic zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Development (Cambridge, England)*, 108(1), 121-145.
- Wirrell, E., Nabbout, R., Scheffer, I., Alsaadi, T., Bogacz, A., French, J., Hirsch, E., & Jain, S. (2021). *Methodology for Classification and Definition of Epilepsy Syndromes : Report of the ILAE Task Force on Nosology and Definitions*. ILAE website. <https://www.ilae.org/files/dmfile/Syndrome-MethodologyFINALMARCH29.pdf>
- Wu, X., Hernandez-Enriquez, B., Banas, M., Xu, R., & Sesti, F. (2013). Molecular Mechanisms Underlying the Apoptotic Effect of KCNB1 K<sup>+</sup> Channel Oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(6), 4128-4134. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.440933>
- Xu, H., Barry, D. M., Li, H., Brunet, S., Guo, W., & Nerbonne, J. M. (1999). Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative Kv2 alpha subunit. *Circulation Research*, 85(7), 623-633. <https://doi.org/10.1161/01.res.85.7.623>
- Yao, H., Zhou, K., Yan, D., Li, M., & Wang, Y. (2009). The Kv2.1 channels mediate neuronal apoptosis induced by excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 108(4), 909-919. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05834.x>
- Yu, S. P., Yeh, C. H., Sensi, S. L., Gwag, B. J., Canzoniero, L. M., Farhangrazi, Z. S., Ying, H. S., Tian, M., Dugan, L. L., & Choi, D. W. (1997). Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5335), 114-117. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.114>
- Yu, W., Gowda, M., Sharad, Y., Singh, S. A., & Sesti, F. (2017). Oxidation of KCNB1 potassium channels triggers apoptotic integrin signaling in the brain. *Cell Death & Disease*, 8(4), e2737. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.160>
- Zabinyakov, N., Bullivant, G., Cao, F., Fernandez Ojeda, M., Jia, Z. P., Wen, X.-Y., Dowling, J. J., Salomons, G. S., & Mercimek-Andrews, S. (2017). Characterization of the first



- knock-out *aldh7a1* zebrafish model for pyridoxine-dependent epilepsy using CRISPR-Cas9 technology. *PLoS ONE*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186645>
- Zdebik, A. A., Mahmood, F., Stanescu, H. C., Kleta, R., Bockenbauer, D., & Russell, C. (2013). Epilepsy in *kcj10* Morphant Zebrafish Assessed with a Novel Method for Long-Term EEG Recordings. *PLOS ONE*, 8(11), e79765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079765>
- Zhang, Y., Kecskés, A., Copmans, D., Langlois, M., Crawford, A. D., Ceulemans, B., Lagae, L., Witte, P. A. M. de, & Esguerra, C. V. (2015). Pharmacological Characterization of an Antisense Knockdown Zebrafish Model of Dravet Syndrome: Inhibition of Epileptic Seizures by the Serotonin Agonist Fenfluramine. *PLOS ONE*, 10(5), e0125898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125898>
- Zon, L. I., & Peterson, R. T. (2005). In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(1), 35-44. <https://doi.org/10.1038/nrd1606>



## Abréviations

---

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMO	Antisense Morpholino Oligonucleotides, oligonucléotides morpholino antisens
ARNm	Acide Ribonucléique Messenger
CBCL	Childhood Behavioral Check-List
EE	Encéphalopathie Epileptique
EEG	Electroncéphalogramme
ED	Encéphalopathie Développementale
EDE	Encéphalopathie Développementale et Epileptique
Hpf	Heures Post-Fertilisation
ILAE	Ligue Internationale contre l'Epilepsie
Jpf	Jours Post-Fertilisation
KCNB1	Canal potassique dépendant du voltage, sous-famille B, membre 1
K <sub>v</sub> 2.1	Sous-unité 2.1 du canal potassique dépendant du voltage
MP	Membrane Plasmique
NGS	Next-Generation Sequencing, séquençage nouvelle génération
PTZ	Pentylènetétrazole
RE	Réticulum Endoplasmique
ROS	Reactive Oxygen Species Espèces réactives de l'oxygène
SCQ	Social Communication Questionnaire
TDAH	Trouble Déficitaire de l'Attention avec Hyperactivité
TEER	Touched Evoqued Escape Response, Comportement d'échappement provoqué par le toucher
TSA	Troubles du Spectre Autistique
VABS-II	Vineland Adaptive Behavior Scales, Second Edition
WT	Wild-Type, sauvage





## Table des figures

Figure 1. Cadre nosologique pour la classification des épilepsies proposé par la Ligue Internationale contre l'épilepsie (ILAE) .....	17
Figure 2. Classification ILAE 2017 des différents types de crise d'épilepsie .....	18
Figure 3. Syndromes appartenant au groupe des encéphalopathies développementales, classés en fonction de leur âge d'apparition.....	21
Figure 4. Historique de la découverte des gènes impliqués dans les épilepsies.....	22
Figure 5. Représentation schématique de l'expression neuronale des différents canaux ioniques impliqués dans les épilepsies génétiques. ....	25
Figure 6. Recherche translationnelle dans les canalopathies épileptiques .....	26
Figure 7. Structure d'un canal potassique voltage-dépendant.....	28
Figure 8. Localisation neuronale des sous-unités Kv2.1. ....	29
Figure 9. Représentation schématique des mécanismes de signalisation intracellulaire régulant la localisation et la fonction de Kv2.1.....	31
Figure 10. Nombre de publications scientifiques (en bleu) et de patients (en orange) rapportées entre 2014 et 2019. ....	33
Figure 11. Fréquence des différents types de crises rapportées chez les patients avec une encéphalopathie <i>KCNBI</i> dans la littérature.....	35
Figure 12. Etude à haut débit de variants <i>KCNBI</i> .....	37
Figure 13. Phénotype du modèle souris Kv2.1 <sup>-/-</sup> développé par Speca et al. ....	38
Figure 14. Phénotype locomoteur des souris <i>Kcnb1</i> <sup>G379R</sup> .....	39
Figure 15. Arbre phylogénétique des principaux modèles animaux utilisés en recherche biomédicale . ....	41
Figure 16. Cycle de vie du poisson-zèbre. ....	42
Figure 17. Développement embryonnaire du poisson-zèbre et apparition des premiers mouvements. ....	44
Figure 18. Représentation de l'activité locomotrice et électroencéphalographique épileptiforme dans le modèle PTZ (A,B) et <i>scn1Lab</i> (C,D). ....	46
Figure 19. Principes généraux d'utilisation du poisson-zèbre dans la recherche translationnelle en épilepsie.....	47
Figure 20. Expression développementale de <i>kcnbl</i> chez le poisson-zèbre étudiée par qRT-PCR. ....	48
Figure 21. Détection précoce de <i>Kcnb1</i> chez le poisson-zèbre et conséquence de sa surexpression sur le système ventriculaire. ....	49
Figure 22. Modèle <i>kcnbl</i> <sup>-/-</sup> généré par le système CRISPR/Cas.....	50
Figure 23. Genotyping process of <i>kcnbl</i> mutant line. ....	101
Figure 24. Morphological analysis of zebrafish larvae.....	102
Figure 25. Behavioral phenotyping protocol of <i>kcnbl</i> mutant and morphant zebrafish.....	105
Figure 26. <i>Kcnbl</i> loss of function was not associated with increased mortality nor gross malformations.....	107
Figure 27. <i>kcnbl</i> loss of function is associated with early behavioral deficiency in zebrafish embryos. ....	108
Figure 28. <i>Kcnbl</i> mutants exhibits rapid circular swimming behavior at 2 dpf. ....	110
Figure 29. Spontaneous locomotor activity was conserved in <i>kcnbl</i> mutants and morphants larvae under dark condition.....	111
Figure 30. <i>Kcnb1</i> <sup>-/-</sup> mutants displayed spontaneous locomotor hyperactivity induced by light-stimulus. ....	112
Figure 31. <i>Kcnbl</i> loss of function was associated with increased susceptibility to PTZ-induced seizures at 4 dpf. ....	113



## Résumé

---

### **Encéphalopathie *KCNBI* : Du phénotype humain aux modèles poissons-zèbres**

Des variants pathogènes de *KCNBI*, codant pour la sous-unité alpha d'un canal potassique voltage dépendant, ont été rapportés chez des patients avec un trouble précoce du neurodéveloppement. Ces variants ont été associés à des effets perte-de-fonction dans les études fonctionnelles *in vitro*. L'objectif de cette thèse était d'étudier une cohorte de patients présentant des variants pathogènes de *KCNBI* puis d'en rechercher les caractéristiques phénotypiques principales dans des modèles poissons-zèbres.

Nous avons pu préciser le spectre phénotypique et génotypique associé à l'encéphalopathie *KCNBI*, allant d'encéphalopathies développementales et épileptiques (EDE) sévères et précoces à des encéphalopathies développementales avec ou sans épilepsie.

Pour modéliser la perte de fonction de *kcnb1*, nous avons développé un modèle knock-down (KD) et utilisé un modèle knock-out (KO) existant. Nous avons montré que l'inhibition partielle ou total de *kcnb1* induisait un trouble précoce du développement, caractérisé par une diminution significative de l'activité prémotrice associée à une augmentation de la susceptibilité aux crises induites par le pentylènetétrazole. Une hyperactivité locomotrice avec modification du pattern de nage était également observée dans le modèle KO, suggérant l'existence d'un phénotype épileptique spontané.

Ce travail a permis de mieux comprendre l'encéphalopathie *KCNBI*, améliorant ainsi la prise en charge des patients et l'information aux familles. La validation des modèles poissons-zèbres se poursuit actuellement afin d'en étudier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents et d'ouvrir la voie au développement de thérapies ciblées.

Mots clés : [Encéphalopathie développementale et épileptique, encéphalopathie développementale, *KCNBI*, canal potassique, épilepsie, poisson-zèbre]

---

### ***KCNBI* encephalopathy : From human phenotype to zebrafish models**

Pathogenic variants in *KCNBI*, encoding  $\alpha$  subunit of the voltage-gated potassium channel Kv2.1, are associated with variable phenotype of neurodevelopmental disorders. These variants displayed loss-of-functions properties in functional *in vitro* studies. The objective of this thesis was to explore a cohort of patients with *KCNBI* pathogenic variants and to study the main phenotypic features of zebrafish models.

We delineated the mutational and clinical spectrum of *KCNBI* encephalopathy, which varies from early-onset developmental and epileptic encephalopathies (DEE) to developmental encephalopathies with or without epilepsy.

To modeled *kcnb1* loss-of-function, we developed a zebrafish *kcnb1* knock-down (KD) model generated using an antisense morpholino oligonucleotide and used a *kcnb1* knock-out (KO) model already available. We showed that either partial or total *kcnb1* inhibition induced early developmental impairment, characterized by decreased stereotyped premotor activity and increased susceptibility to pentylenetetrazole-induced seizures. *Kcnb1* KO larvae exhibited locomotor hyperactivity and aberrant swim trajectories, suggesting spontaneous epilepsy-like behavior.

This work promotes a better understanding of *KCNBI* encephalopathy, improving patient care and information delivered to the families. Validation of zebrafish models is currently undergoing to study the underlying pathophysiological mechanisms and pave the way for the development of targeted therapies.

Keywords : [developmental and epileptic encephalopathy, developmental encephalopathy, *KCNBI*, potassium channel, epilepsy, zebrafish]