

## SOMMAIRE

**«Etude clinique et moléculaire de patients porteurs de mutations dans des gènes  
codant pour des sous-unités du récepteur au GABA de type A.»**

<b>Introduction</b>	<b>Page 2</b>
<b>Matériels &amp; méthodes</b>	<b>Page 6</b>
<b>Résultats</b>	<b>Page 12</b>
<b>Discussion</b>	<b>Page 27</b>
<b>Annexes</b>	<b>Page 42</b>
<b>Références</b>	<b>Page 47</b>
<b>Abréviations</b>	<b>Page 55</b>

## Introduction

L'épilepsie est une maladie neurologique courante et grave qui survient en raison de déterminants génétiques primaires, ou en raison de troubles métaboliques et structuraux du cerveau dont la prévalence au cours de la vie est de 3 %, Elle se caractérise par des crises récurrentes résultant de décharges neuronales hyper-synchrones. Malgré un traitement optimal, environ un tiers des patients continuent à avoir des crises ou à souffrir d'effets secondaires des traitements.

L'amélioration des technologies de dépistage génétique, l'utilisation d'outils bio-informatiques plus puissants et la création de grands consortiums nationaux et internationaux ont entraîné une explosion du nombre de gènes identifiés dans l'épilepsie, ce qui a permis d'enrichir notre compréhension de la physiopathologie de l'épilepsie humaine.

L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique, abrégé en GABA, est le neurotransmetteur inhibiteur le plus abondant dans le cerveau des mammifères. Vingt à 30 % des neurones du système nerveux central sont GABAergiques (Rudolph et al., 2011). Le GABA est synthétisé dans les neurones et est stocké dans les vésicules synaptiques. Lors de l'activation neuronale, le GABA est libéré dans la synapse, il peut agir sur les récepteurs postsynaptiques (inhibition phasique localisée), ou diffuser dans l'espace extracellulaire (inhibition tonique, à distance) (Farrant et Nusser, 2005).

Il peut activer deux classes de récepteurs : les canaux d'ions chlorure ligand-dépendants, que sont en grande majorité les récepteurs au GABA de type A (ou les récepteurs de type C, beaucoup moins répandus (Bormann et al., 2000), et les récepteurs métabotropes de type B couplés aux protéines G (Couve et al., 2000).

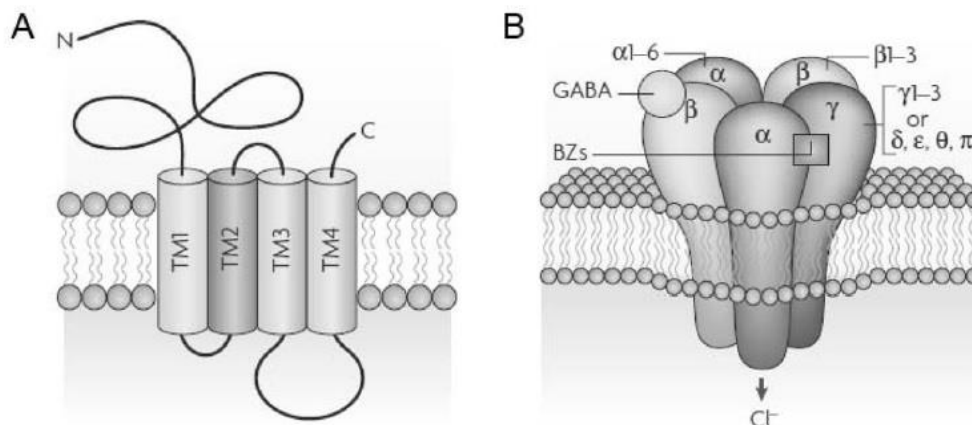
Le récepteur au GABA de type A (GABAA) joue un rôle central dans la régulation de l'excitabilité neuronale et dans la pathologie de l'épilepsie. Le GABA exerce une action inhibitrice rapide en activant les récepteurs GABAA postsynaptiques dans le cerveau, provoquant l'afflux d'ions chlorure chargés négativement et l'hyperpolarisation des neurones qui servent à réduire l'excitabilité neuronale (Baulac, 2001).

Les récepteurs GABAA sont membres de la famille des récepteurs Cys-loop, ce sont des protéines hétéro-pentamériques qui s'assemblent à partir de diverses combinaisons de protéines. Chaque récepteur est assemblé en utilisant 5 des 19 sous-unités potentielles ( $\alpha 1$  à  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  à  $\beta 3$ ,  $\gamma 1$  à  $\gamma 3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ , et  $\rho 1$  à  $\rho 3$ ). La diversité des combinaisons introduit une hétérogénéité considérable de récepteurs, et induit une variabilité dans leurs propriétés fonctionnelles. Les combinaisons habituelles comprennent deux sous-unités  $\alpha$ , deux sous-unités  $\beta$ , et une sous-unité  $\gamma$ . La sous-unité  $\gamma$  peut être remplacée par  $\delta$ ,  $\epsilon$  ou  $\pi$ . (Macdonald et Olsen, 1994 ; Fritschy et Panzanelli, 2014).

Environ 60 % des récepteurs GABAA sont composés par deux sous-unités  $\alpha 1$ , deux sous-unités  $\beta 2$  et une sous-unité  $\gamma 2$  codées par les gènes *GABRA1*, *GABRB2*, *GABRG2* et entre 15 et 20 % ont la combinaison  $\alpha 2\beta 3\gamma 2$  (Rudolph et al., 2011).

Les sous-unités ont toutes la même structure :

- Une longue extrémité N-terminale extracellulaire qui comprend le domaine de liaison au GABA (la liaison se produit à l'interface entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ ). L'interaction avec les agonistes, dont divers médicaments (benzodiazépines - BZD, barbituriques, neurostéroïdes), se fait aussi au niveau de ce domaine.
- Quatre domaines transmembranaires (TM1 à TM4). Le deuxième domaine transmembranaire de chaque sous-unité forme un pore de canal sélectif perméable au passage des ions chlorure.
- Une boucle intracellulaire courte qui relie TM1 et TM2, une boucle extracellulaire courte qui relie TM2 et TM3, une boucle intracellulaire longue qui relie TM3 et TM4 (elle est le site de diverses interactions protéiques et modifications post-traductionnelles qui modulent l'activité des récepteurs).
- Une petite extrémité C-terminale extracellulaire.



**Figure 1 tirée de l'article Jacob et al., 2008 : Schémas représentant le récepteur au GABAA.**

**A. Le récepteur est constitué de quatre domaines transmembranaires. Le GABA se fixe sur l'extrémité N-terminale, c'est aussi le site de liaison des BZD.**

**B. Canal hétéro-pentamérique perméable au chlorure : la majorité des récepteurs GABAA exprimés dans le cerveau se composent de 2 sous-unités  $\alpha$ , 2 $\beta$  et 1 $\gamma$ . La sous-unité  $\gamma$  peut être remplacée par  $\delta$ ,  $\epsilon$  ou  $\pi$ . La liaison du GABA se produit à l'interface entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  et déclenche l'ouverture du canal, ce qui permet l'afflux rapide d'ions chlorure. Le pore du canal est formé par les TM2 des 5 sous-unités.**

Les gènes des 19 sous-unités du récepteur GABAA présentent un schéma de base de neuf exons codants et de huit introns (à l'exception de deux gènes) (Olsen et al., 1990). Au sein d'une famille de sous-unités, il y a 70% d'identité de séquence, et entre membres de familles différentes, 20% d'identité de séquence ou 50% de similarité de séquence (Mamalaki et al., 1987).

Les gènes codant pour ces sous-unités sont répartis sur l'ensemble du génome, mais la majorité sont réunis en cluster sur quatre chromosomes : au niveau des régions 4p12 (*GABRA2*, *GABRA4*, *GABRB1*, *GABRG1*), 5q34 (*GABRA1*, *GABRA6*, *GABRB2*, *GABRG2*), 15q12 (*GABRA5*, *GABRB3*, *GABRG3*) et Xq28 (*GABRA3*, *GABRQ*) (Russek et al., 1999).

Des mutations dans plusieurs gènes codant pour les sous-unités du GABAA ont été identifiées chez des patients qui ont développé une épilepsie infantile et une déficience intellectuelle (DI) de sévérité variable. Ce sont les sous-unités  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  et  $\gamma 2$  codées respectivement par les gènes *GABRA1*, *GABRB2*, *GABRB3* et *GABRG2* qui ont le plus grand nombre de mutations rapportées.

Nous avons souhaité enrichir les connaissances actuelles en rapportant près de 30 nouveaux cas de patients. Par l'étude de ces cas, et en nous appuyant sur les données de la littérature, nous avons cherché s'il pouvait exister des corrélations entre les phénotypes plus ou moins sévères et certaines caractéristiques des mutations identifiées dans ces gènes.

## **Matériels & méthodes**

Les patients ont été inclus dans le cadre d'une collaboration de plusieurs hôpitaux et laboratoires de diagnostic et de recherche français, en grande partie par l'intermédiaire du réseau EPIgene. Ce réseau rassemble des neuro-pédiatres, des généticiens et des chercheurs en neuro-génétique de toute la France qui étudient les épilepsies d'origine génétique. Il s'agit plus particulièrement des formes d'épilepsie les plus sévères entraînant des encéphalopathies épileptiques ou des syndromes épileptiques graves. Ce travail a permis de rassembler des cas de patients suivis dans plusieurs centres hospitalo-universitaires comprenant les villes de Marseille, Paris, Lyon, Montpellier, Strasbourg, Bordeaux, Nice, Caen et Toulouse.

Le recueil des données a été effectué à l'aide d'un questionnaire complété par le médecin clinicien qui assure le suivi du patient et/ou par l'examen approfondi des dossiers médicaux des patients. Le questionnaire comprenait plusieurs parties permettant de recueillir des informations cliniques précises concernant le patient, ses antécédents personnels et familiaux. Il mettait l'accent sur la description des premières crises, des premiers électroencéphalogrammes (EEG), le développement psychomoteur et l'examen neurologique lors de la première consultation, au cours du suivi et enfin, l'effet des antiépileptiques prescrits. Les comptes rendus des analyses de biologie moléculaire et des différents examens complémentaires réalisés (en particulier les IRM cérébrales et les EEG) étaient recueillis précisément.

## **L'épilepsie**

Dans ce travail, tous les patients sauf un ont développé une épilepsie. Une crise d'épilepsie est définie comme l'ensemble de manifestations cliniques brutales, imprévisibles, transitoires qui résultent de l'hyperactivité paroxystique d'un réseau de neurones corticaux ou cortico-sous-corticaux hyperexcitables et de son éventuelle propagation (Livre du Collège des Enseignants de Neurologie, 2016). Elle peut se caractériser par une modification rapide de l'état de conscience et/ou des phénomènes moteurs et/ou sensitifs, sensoriels, psychiques, végétatifs, et/ou cognitifs.

Les crises épileptiques sont classées en deux grandes catégories : généralisées ou focales :

- Les signes cliniques des crises généralisées résultent de l'hyperactivité d'un réseau de neurones d'emblée étendu et bilatéral. Deux manifestations cliniques, associées ou non, sont au premier plan : les signes moteurs et les troubles de la conscience.

- La décharge épileptique des crises focales intéresse initialement un réseau de neurones localisé au niveau cortical et peut éventuellement se propager secondairement. Les crises focales comportent une séquence de signes ou symptômes cliniques corrélés avec les régions corticales impliquées par la décharge épileptique.

Nous avons classé les crises d'épilepsie en fonction des critères établis par la Ligue internationale contre l'épilepsie (Berg et al., 2010) et les syndromes épileptiques ont été précisés dans la mesure du possible.

Concernant les tracés EEG, certains termes utilisés par la suite sont à préciser :

- Un tracé hypsarythmique est constitué d'une activité continue d'ondes cérébrales lentes, de pointes et d'ondes aiguës asynchrones et irrégulières changeant à chaque instant de durée et de topographie sans jamais prendre un aspect répétitif rythmique. Ce genre de tracé se rencontre principalement dans le syndrome de West.

- Un tracé « suppression-burst » est caractérisé par des périodes d'activité électrique importante alternant avec des périodes d'inactivité dans le cerveau. Ce type de tracé est évocateur de maladies épileptiques sévères telles que le syndrome d'Ohtahara.

On parle d'encéphalopathie épileptique précoce (EEP) quand l'activité épileptique elle-même peut contribuer à des déficiences cognitives et comportementales graves au-delà de ce que l'on peut attendre, et que ces déficiences peuvent empirer avec le temps. Bien que certains syndromes soient souvent appelés encéphalopathies épileptiques (syndrome d'Ohtahara, syndrome de West, syndrome de Dravet, etc...) les effets encéphalopathiques des crises et de l'épilepsie peuvent se produire en association avec toute forme d'épilepsie. Ces épilepsies sont classiquement pharmaco-résistantes, associées à des tracés EEG perturbés et à une DI sévère.

Différents syndromes épileptiques ont été caractérisés et vont être évoqués dans ce travail :

- le syndrome de Dravet ou épilepsie myoclonique sévère du nourrisson, est caractérisé par des crises convulsives qui débutent dans la première année de vie alors que le nourrisson se développe normalement. Les premières crises se manifestent en contexte fébrile et il existe une répétition de crises longues avec ou sans fièvre. Ce syndrome entraîne une détérioration cognitive et motrice. Il s'agit d'un syndrome épileptique de cause génétique : 80 % des cas sont dus à une mutation du gène *SCN1A* (mais d'autres gènes sont décrits tels que *STXBP1* ou nos gènes d'intérêt).
- le syndrome de West est caractérisé par la triade clinique : spasmes en salves chez un nourrisson, détérioration psychomotrice et tracé EEG intercritique hypsarythmique. C'est le type d'encéphalopathie épileptique le plus fréquent.
- l'épilepsie généralisée avec crises fébriles plus (GEFS+) : le tableau clinique comprend des crises fébriles typiques observées dans la petite enfance qui vont se poursuivre au-delà de l'âge de 6 ans et des crises tonico-cloniques généralisées peuvent apparaître en l'absence de fièvre.
- l'épilepsie avec crises myoclonono-atoniques (MAE) commence dès la petite enfance. Plus de la moitié des cas commencent par une crise tonico-clonique généralisée fébrile ou non, et il peut y avoir plusieurs types de crises par la suite. Un tiers des enfants peuvent avoir des épisodes d'épilepsie non convulsive atonique ou à type d'absence. Cette entité est considérée par certains neuro-pédiatres comme faisant partie des GEFS+.

Traitements anti-épileptiques : était considéré efficace un traitement qui permettait d'arrêter la survenue de crises d'épilepsie (même transitoirement) ou d'en diminuer la fréquence de plus de 75%.

Une épilepsie était pharmaco-résistante, si aucun traitement n'a permis de diminuer la fréquence des crises, même de façon transitoire.



## **La déficience intellectuelle (DI)**

Une DI était présente chez tous les patients que l'on rapporte. Elle est définie par le coexistence de 3 critères selon le DSM IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders élaboré par l'Association Américaine de Psychiatrie) :

A : Un déficit intellectuel ( $QI \leq 70$  soit  $\leq 2$  écarts types de la moyenne de la population)

B : Un déficit dans au moins deux domaines du fonctionnement adaptatif : communication, soins personnels, compétences domestiques, aptitudes sociales/interpersonnelles, utilisation des ressources communautaires, autonomie, aptitudes scolaires fonctionnelles, travail, loisirs, santé et sécurité.

C : Un âge d'apparition avant 18 ans

Le DSM IV classe la DI en quatre groupes : légère, modérée, grave et profonde:

Légère (QI 50-55 à 70) - 85% des personnes atteintes de DI

- Niveau conceptuel : basse affectation de la pensée abstraite, habiletés fonctionnelles, flexibilité cognitive et mémoire à court terme.
- Niveau social: interactions sociales immatures
- Niveau pratique : il est nécessaire qu'elles soient supervisées, orientées et assistées au moment de réaliser des tâches de leur vie quotidienne.
- Très souvent, on ne les différencie pas des autres enfants avant leur majorité.

Modérée (QI 35-40 à 50-55) - 10%

- Niveau conceptuel : elles requièrent une assistance continue pour terminer des activités quotidiennes.
- Niveau social : au moment de communiquer verbalement, leur langage est moins riche et complexe que celui de personnes sans déficience.
- Niveau pratique : avec un soutien et une instruction continue, elles peuvent développer certaines habiletés et capacités.

### Sévère (QI 20-25 à 35-40) - 3 à 4%

- Niveau conceptuel : très limité, le soutien doit être important, constant, et toucher beaucoup de domaines.
- Niveau social : le langage oral est très élémentaire, les phrases très simples au niveau grammatical et le vocabulaire limité.
- Niveau pratique : la supervision doit être constante pour toutes les tâches que la personne doit réaliser dans la vie quotidienne.

### Profonde (QI 20-25) - 1 à 2%

- Niveau conceptuel : leur déficit est manifeste. Elles ne considèrent que le monde physique. Les difficultés motrices et sensorielles associées empêchent l'utilisation fonctionnelle des objets.
- Niveau social : compréhension précaire de la communication verbale et gestuelle. Leur manière de s'exprimer est majoritairement non-verbale.
- Niveau pratique : le patient est totalement dépendant dans tous les domaines.

Dans notre travail la distinction entre la DI sévère et profonde n'a pas été faite et l'évaluation était réalisée par le clinicien qui remplissait le questionnaire.

## **Biologie moléculaire**

L'ADN génomique a été extrait à partir des leucocytes d'un prélèvement sanguin à l'aide de méthodes standards. Les mutations ont toutes été identifiées à l'aide du séquençage ciblé de nouvelle génération de panels de gènes. Il s'agissait de panel comprenant des gènes connus pour être impliqués dans la DI ou l'épilepsie. Le nombre de gènes sur chaque panel était variable en fonction du laboratoire ayant fait l'analyse, mais ils comprenaient tous les gènes *GABRA1* (NM\_000806.5), *GABRB2* (NM\_021911.2), *GABRB3* (NM\_000814.4) et *GABRG2* (NM\_000816.3) codant pour des sous-unités du récepteur au GABA<sub>A</sub>.

Les critères suivants étaient pris en compte pour considérer un variant comme pathogène :

- variant non présent dans les bases de données de polymorphismes : par exemple, gnomAD

(genome Aggregation Database) constitué de données de 123 136 exomes et de 15 496 génomes, ou ExAC (Exome Aggregation Consortium) constitué de données d'exomes de 60 706 individus,

- variant non-sens, faux-sens, non synonyme,
- variant qui entraînait un décalage du cadre de lecture,
- variant qui modifiait le site d'épissage,
- variants prédits pathogènes par plusieurs logiciels de prédiction *in silico* (par exemple UMDpredictor, SIFT, PolyPhen, Mutation Taster)
- variant déjà décrit pathogène dans la littérature,
- variant observé *de novo* chez un patient ou transmis par un parent affecté (si variant hétérozygote).

Le séquençage Sanger traditionnel a ensuite été utilisé pour confirmer toutes les mutations, pour préciser le caractère *de novo* ou hérité du variant en analysant l'ADN des parents, et pour effectuer des analyses de ségrégation familiale.

Les figures montrant les variants dans les différentes sous-unités ont été produites à l'aide du logiciel Protter (Omasits et al., 2014).

La localisation des mutations récurrentes a été faite à partir des données issues de la littérature (recensées par la base de données HGMD-Pro) (Stenson et al., 2003) auxquelles nous avons ajouté les nôtres, en fixant le seuil de récurrence pour un acide aminé donné à une fréquence d'au moins 3 descriptions.

Les études statistiques étaient réalisées par l'intermédiaire du test exact de Fisher à partir de tableaux de contingence pour rechercher des éventuelles corrélations entre plusieurs variables qualitatives.

## Résultats

Dans ce travail, 27 patients sont rapportés. Il a été mis en évidence chez chacun d'entre eux une mutation dans un gène qui code pour une sous unité du récepteur au GABAA. Nous rapportons 23 mutations différentes. Les résultats sont présentés en détail dans le *tableau 2*.

### Les mutations génétiques

Vingt-deux des 23 mutations sont à l'état hétérozygote, parmi celles-ci, 20 sont survenues *de novo* et 3 ont été héritées. Une mutation a été identifiée à l'état homozygote dans une fratrie de 3 patients dont les parents (hétérozygotes) sont cousins germains.

Les mutations ont été identifiées dans 4 gènes : 4 dans le gène *GABRA1*, 5 dans le gène *GABRB2*, 12 dans le gène *GABRB3*, et 6 dans le gène *GABRG2*. Parmi ces mutations, 6 ont déjà été rapportées et 17 sont rapportées pour la première fois par ce travail.

Vingt et un des 23 mutations sont faux-sens causées par une substitution d'un nucléotide. Pour les deux autres il s'agit d'une délétion de 4 nucléotides et d'une duplication de 25 nucléotides entraînant un décalage du cadre de lecture et une protéine tronquée prématurément.

Le récepteur au GABAA est un hétéro-pentamère dont chacune des sous-unités est une protéine transmembranaire composée d'une longue extrémité N-terminale extracellulaire et de quatre domaines transmembranaires. Les variants identifiés se situent en majorité au niveau de trois régions (*Figures 2a, 2b, 2c et 2d*): l'extrémité N-terminale (n=8), le deuxième domaine transmembranaire (n=7) et la boucle extracellulaire entre le deuxième et le troisième domaine transmembranaire (n=5). Seulement quatre variants sont retrouvés sur les autres domaines protéiques (au niveau des premier et troisième domaines transmembranaires, et de la boucle intracellulaire entre TM2 et 3).

	Nombre De patients	Nombre de variants	Région protéique	Age median De debut des crises	Diagnos ts	DI sévère
<b>GABRA1</b>	4	4 faux sens <i>de novo</i>	2x N-term	1 mois (min : 15 jours max : 26 mois)	2x EEP 1x GEFS+ 1x Epilepsie généralisée photo-sensible	2
<b>GABRB2</b>	5	5 faux sens <i>de novo</i>	2x TM2 2x boucle TM2-3	3 mois (min : 3 jours Max : 4 ans et demi)	2x EEP 1x GEFS+ 1x MAE 1x Epilepsie focale	2
<b>GABRB3</b>	12	8 faux sens <i>de novo</i> 1 non sens homozygote hérité	5x N-term 2x TM2 1x boucle TM2-3 1x TM3 1x boucle TM3-4	6 mois (min : premier jour Max : 13 mois)	5x EEP 2x GEFS+ 2x MAE 1x Syndrome de West 1x Syndrome de Dravet atypique 1x Epilepsie focale migrante	7
<b>GABRG2</b>	6	3 faux sens <i>de novo</i> 1 faux sens hérité 1 non sens hérité	1x N-term 1x TM1 2x TM2 1x boucle TM2-3	9 mois (min : premier jour max : 12 mois)	2x GEFS+ 1x EEP 2x Syndrome de Dravet 1x DI avec TSA sans épilepsie	3
<b>Total</b>	27	23 mutations : 20 faux sens <i>de novo</i> 1 faux sens hérité 1 non sens hérité 1 non sens homozygote hérité	1x TM1 8x N-term 7x TM2 5x boucle TM2-3 1x TM3 1x boucle TM3-4	6,5 mois (min : premier jour Max : 4 ans et demi)	10x EEP 6x GEFS+ 2x Syndrome de Dravet et x1 atypique 3x MAE 1x syndrome de West 1x Epilepsie focale et 1x focale migrante 1x Epilepsie généralisée photo-sensible 1x DI avec TSA sans épilepsie	14

**Tableau 1 : Principales caractéristiques cliniques et moléculaires des patients et des variants en fonction du gène en cause.**

Patient (sex)	Mutation inheritance	Channel region	Age at onset	Diagnosis	Seizure types ( <u>at onset</u> , or not)	Febrile sens.	Development	Neurological features	EEG	Brain MRI	Effective drugs	Additional features
<b>GABRA1</b>												
<b>Patient 1 (F)</b>	c.274T>C p.F92L <i>De novo</i>	N term	Months; NP	GEFS+	<u>FS</u> ; <u>tonic clonic</u>	Yes	Walking at 18 m.; language delay	Trembling of the limbs	Fast rhythmic activity; GSW (age NP)	Normal	LEV, LTG, PMP	
<b>Patient 2 (F)</b>	c.335G>A p.R112Q <i>De novo</i>	N term	26 m.	Photo sens. GE	<u>FS</u> ; atypic absence; tonic clonic	No	Walking at 20 m.; language delay	ASD; stereotypies; compartment disorder; regression	Photo sens., normal trace (34 m.) then GSW (8 y.)	Ventriculomegaly; thin CC	VPA, TPM, LTG	Dysmorphism
<b>Patient 3 (M)</b>	c.787A>G p.M263V <i>De novo</i>	TM1	1 m.	Prec. Myocl. Enc.	Myoclonic, tonic, atonic, tonic clonic	NP	No sitting alone, no language at 5 y.	Postnatal microcephaly hypotonia, choreoathetotic movement, nystagmus	PSW and suppression burst (5 m.); hypersyrrhythmia (7 m.)	Normal	CBZ, PMP	
<b>Patient 4 (F)</b>	c.851T>C p.V284A <i>De novo</i>	TM2	15 d.	EOEE	<u>Hypertonic</u> , clonic	NP	Died at 8 m.	Postnatal microcephaly; axial hypotonia	Hypersyrrhythmia, PSW (age NP)	Cortical and CC atrophy	VGB	Post-natal growth retardation
<b>GABRB2</b>												
<b>Patient 5 (M)</b>	c.815C>G p.A272G <i>De novo</i>	TM2	4 y. 1/2	Focal E.	<u>Night partial tonic-clonic</u> (frequency = x 1 /6 m.)	NP	Walking at 18 m.	Normal	Brief flashes of ample bilateral spikes during sleep (4 y. 1/2)	NP	CBZ, OXC	
<b>Patient 6 (M)</b>	c.847C>A p.L283I <i>De novo</i>	TM2	3 d.	EOEE	<u>Clonic generalized</u> ; automatism (chewing); migrating	NP	No ocular interaction; died at 2 m.	Axial hypotonia, peripheral hypertonia	Left or right temporal S., suppression burst (out of seizure; age NP)	Diffuse hypersignal of the WM	Pharmaco R.	
<b>Patient 7 (F)</b>	c.892A>G p.K298E <i>De novo</i>	Loop TM2-3	3 m.	GEFS+	<u>Atonic</u> , tonic clonic generalized, absence, alternating hemiplegia	Yes	Walking at 21 m., language delay	Ataxia	Focal SW; non clinical frontal SW sleeping	Normal	CLZ, VPA, ZNS	
<b>Patient 8 (F)</b>	c.902A>G p.Y301C <i>De novo</i>	Loop TM2-3	9 m.	MAE	<u>Myoclonic</u> , atonic, tonic clonic, atypical absence, photo and sono sens.	No	Walking at 24 m., language delay	Ataxia, hypotonia	Ample PSW	Normal	LEV	Weight and height at +3 SD
<b>Patient 9 (M)</b>	c.908A>G p.K303R <i>De novo</i>	Loop TM2-3	3 d.	EOEE	Tonic clonic, hypertonic, myoclonic	No	No sitting alone and no language at 2 y.	Postnatal microcephaly, axial hypotonia, pyramidal syndrome, strabismus	Suppression burst (J3); hypersyrrhythmia, slow SW (11 m.)	WM hypersignal, cortical and CC atrophy	Vit. B6, PNB, TPM, ZNS, VPA	break in HC, weight and height growth at 7 m. (-2 SD)

GABRB3													
Patient (sex)	Mutation inheritance	Channel region	Age at onset	Diagnosis	Seizure types ( <u>at onset</u> , or not)	Febrile sens.	Severe ID	Development	Neurological features	EEG	Brain MRI	Effective drugs	Additional features
Patient 10 (M)	c.238A>G p.M80V <i>De novo</i>	N Term	8 m.	MAE	<u>Focal</u> , myoclonic	NP	No	NP	Ataxia, stereotypies	Angelman like trace (age NP); perturbed rhythm (4 y.)	Normal	TPM, LTG, PIR	Dysmorphism with ogival palate
Patient 11 (F)	c.358G>A p.D120N <i>De novo</i>	N Term	11 m.	GEFS+	<u>FS</u> ; atypical absence; clonic, tonic and atonic	Yes	No	Walking at 20 m. ; language delay	Congenital macrocephaly	Slow bilateral SW (15 m.)	Normal	LTG, LEV	
Patient 12 (F)	c.674T>C, p.F225S <i>De novo</i>	N Term	13 m.	GEFS+	<u>Nighttime focal FS</u> secondarily generalized	Yes	No	Walking at 23 m.; language delay	Stereotypies, strabism	Normal (< 2 y.)	Arachnoid cyst	TPM	Severe GOR
Patient 13 (F)	c.674T>G p.F225C <i>De novo</i>	N Term	2 m.	West S.	<u>Spasms</u> ; tonic clonic	Yes	No	NP	Congenital microcephaly; ataxia; trembling; nystagmus; visual impairment	Hypsarrhythmia (2,5 m.); GSW	NP	LTG; CBZ	EEG disorder predominant in frontal region and sleeping
Patient 14 (M)	c.695G>A p.R232Q <i>De novo</i>	N Term	9 m.	Atypical Dravet	<u>Tonic clonic</u> ; <u>FS</u> ; myoclonic atonic (5 y.)	Yes	No	Walking at 15 m.; language delay	ADHD; strabism	First unknown; GSW (5 y.)	Normal	VPA; TPM; ZNS	
Patient 15 (F)	c.851T>C p.L284P <i>De novo</i>	TM2	7 m.	MAE	<u>Arm twitching</u> ; myoclonic; absence	Yes	Yes	Walking at 3 y. ; language delay; regression (9 y.)	Microcephaly (NP); Hypotonia; spasticity; pyramidal syndrome	GSW (NP)	Normal	Pharmaco R.	
Patient 16 (F)			6 m.	EO Abs. E	<u>Absence</u> ; tonic clonic	Yes	Yes	Language delay	Normal	GSW (6 m.)	Normal	ETX then pharmacoR	Prognatism
Patient 17 (F)	c.911A>G p.K304R <i>De novo</i>	Loop TM2-3	21 d.	EOEE	<u>Spasm</u> ; clonic; , choreo athetotic movement	NP	Yes	Died a 2 m.	Congenital macrocephaly; axial hypotonia	Hypsarrhythmia (21 d.)	Normal	Pharmaco R.	Dysmorphism micro retrognatism
Patient 18 (F)	c.913G>A p.A305T <i>De novo</i>	TM3 (first AA)	NP	NP	<u>Atypical focal</u> ; migrating; tonic clonic	NP	Yes	Regression after 3 m. ; no sitting alone ; no word	Congenital microcephaly; hypotonia	Migrating PSW (3 m.)	Normal then atrophía	TPM; VPA; LEV	
Patient 19 (F)	c.1347_1350 delCAGA p.R450Gfs* 15	Loop TM3-4 (last AA before TM4)	6 d.	EOEE	<u>Tonic clonic arms</u> ; spasms	NP	Yes	Sitting alone at 18 m.; walking (age NP)	Axial hypotonia; agressivity; stereotypies	Suppression bust (6 d.); hysarrhythmia	Hypersignal WM	CBZ; PNB; VPA	
Patient 20 (F)			First d.	EOEE	<u>Tonic clonic</u> ; absence	Yes	Yes	No walking	Axial hypotonia; Postnatal microcephaly	Suppression bust (2 d.); PSW	NP	VGB; PNB	Velo-palatal cleft; hypotrophy

Patient 21 (M)	homozygous Herited	Second d.	EOEE	Myoclonic; tonic clonic	Yes	Yes	Sitting (age NP) ; language delay	Postnatal microcephaly	Normal (2 d.) ; disorganized trace (6 m.)	Hypersignal WM	PNB	Micro retrognatism	
GABRG2													
Patient (sex)	Mutation inheritance	Channel region	Age at onset	Diagnosis	Seizure types (at onset, or not)	Febrile sens.	Severe ID	Development	Neurological features	EEG	Brain MRI	Effective drugs	Additional features
Patient 22 (F)	c.282_306dup, p. P103Rfs*6 Herited	N Term	12 m.	GEFS+	Febrile generalized E., Generalized E. without fever	Yes	NP	NP	NP	Normal (age NP)	Normal	LTG	
Patient 23 (M)	c.844C>G p.P282A De novo	TM1	Birth	EOEE	Trembling; partial E. ; myoclonic	NP	Yes	No sitting alone, eye tracking. Died at 18 y.	Hypotonia, dystonia, strabismus, nystagmus	Normal (birth) , suppression burst (2 m.), slow GSW	Atrophia, WM abnormality	Pharmaco R.	Dysmorphism
Patient 24 (M)	c.926T>C p.I 309T De novo	TM2	No epilepsy	ID and ASD	No epilepsy (until 4 y.)	NP	No	Walking at 26 m. ; no language at 3 y.	ASD; compartment disorder; strabism; amblyopia	NP	Compressive arachnoid cyst	/	Sleep disorder; obesity
Patient 25 (M)	c.968G>A p.R323Q Herited	TM2	9 m.	Dravet Syndrome	Partial hemicorporeal complex S., tonic clonic generalized S.	Yes	Yes	Walking at 3 y. ; language delay	No social interaction, stereotypies, ASD	Normal (9 m.) then slow trace	Normal	CBZ, VPA	
Patient 26 (F)			8 m.	Dravet Syndrome	Atonic; absence; myoclonic; focal	Yes	Yes	Walking at 13 m. ; language delay; regression	Postnatal macrocephaly, stereotypies, ASD	Normal (8 m.) ; then isolated spikes with normal trace	Hydrocephaly	CBZ; LTG	Dysmorphism; sleep disorder
Patient 27 (F)	c.992A>G p.Y331C De novo	Loop TM2-3	12 m.	GEFS+	Complex FS; tonic clonic generalized	Yes	No	Walking at 14 m. ; language delay	Postnatal macrocephaly; ataxia; visuomotor apraxia; , choreo athetotic movement	Normal (1 and 5 y.)	Normal	VPA	Obesity

**Tableau 2 : Caractéristiques cliniques et moléculaires des patients et des variants identifiés.**

**Variants surlignés en jaune : variants décrits pour la première fois. Abreviations:** NP : no precised ou precision ; AA: amino acid; sens. = sensitive

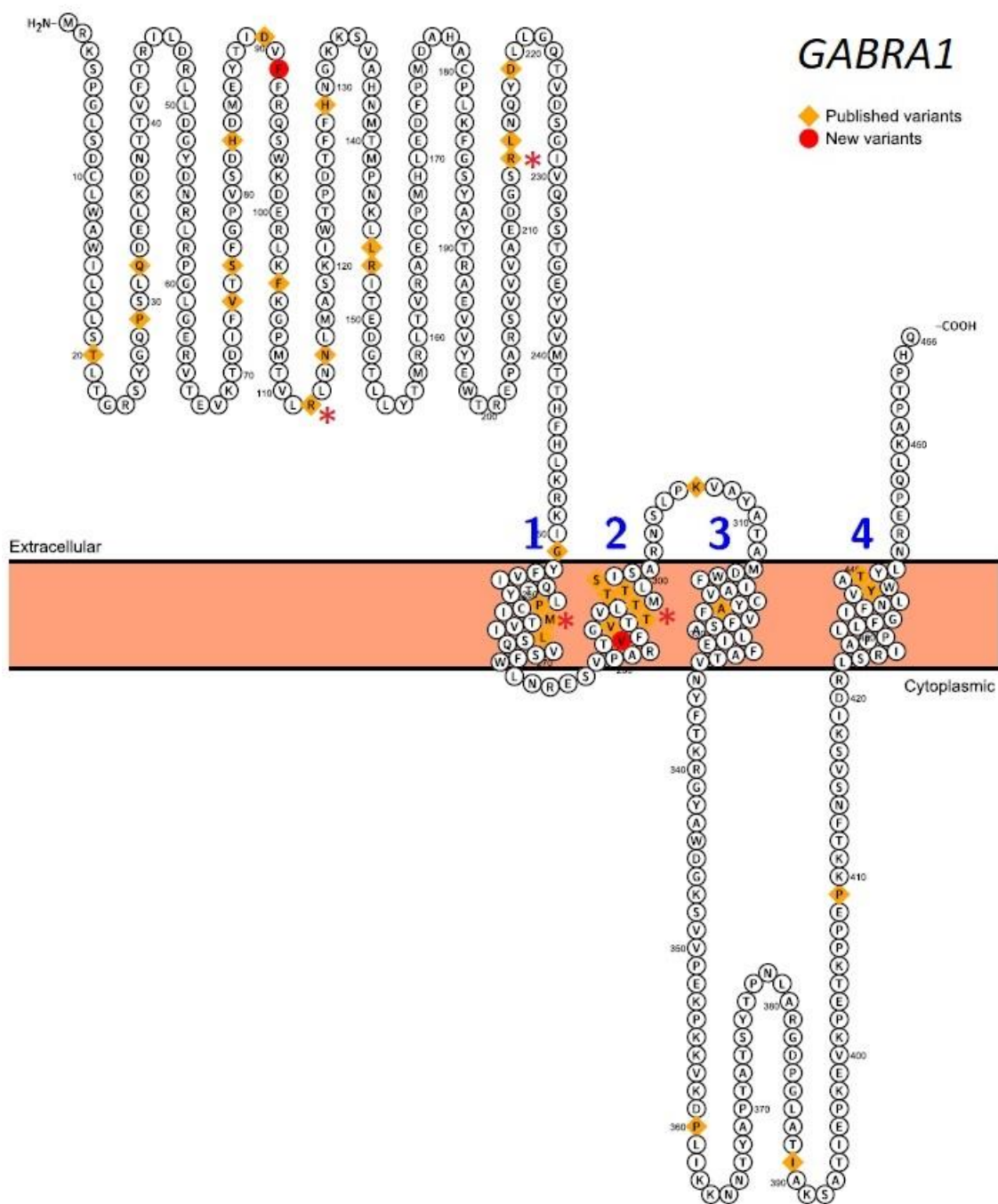
**Diagnosis and clinical features :** ADHD, attention deficit hyperactivity disorder , ASD = autistic spectrum disorder, E. = epilepsy; EOEE : early-onset epileptic encephalopathy ; FS = febril seizure; GE : generalized epilepsy ; GEFS+ : generalized epilepsy with febrile seizure plus ; GOR: gastro oesophageal reflux; HC = head circumference, ID: Intellectual disability; MAE: myoclonic atonic epilepsy; Photosens. GE (photosensitive generalized epilepsy); Prec. Myocl. Enc. (precoce myoclonic encephalopathy); S. = Seizure ; SD = standard deviation

**EEG:** SW = spike wave; GSW = generalized SW ; PSW = Poly SW ; **IRM:** CC = corpus callosum; WM = white matter

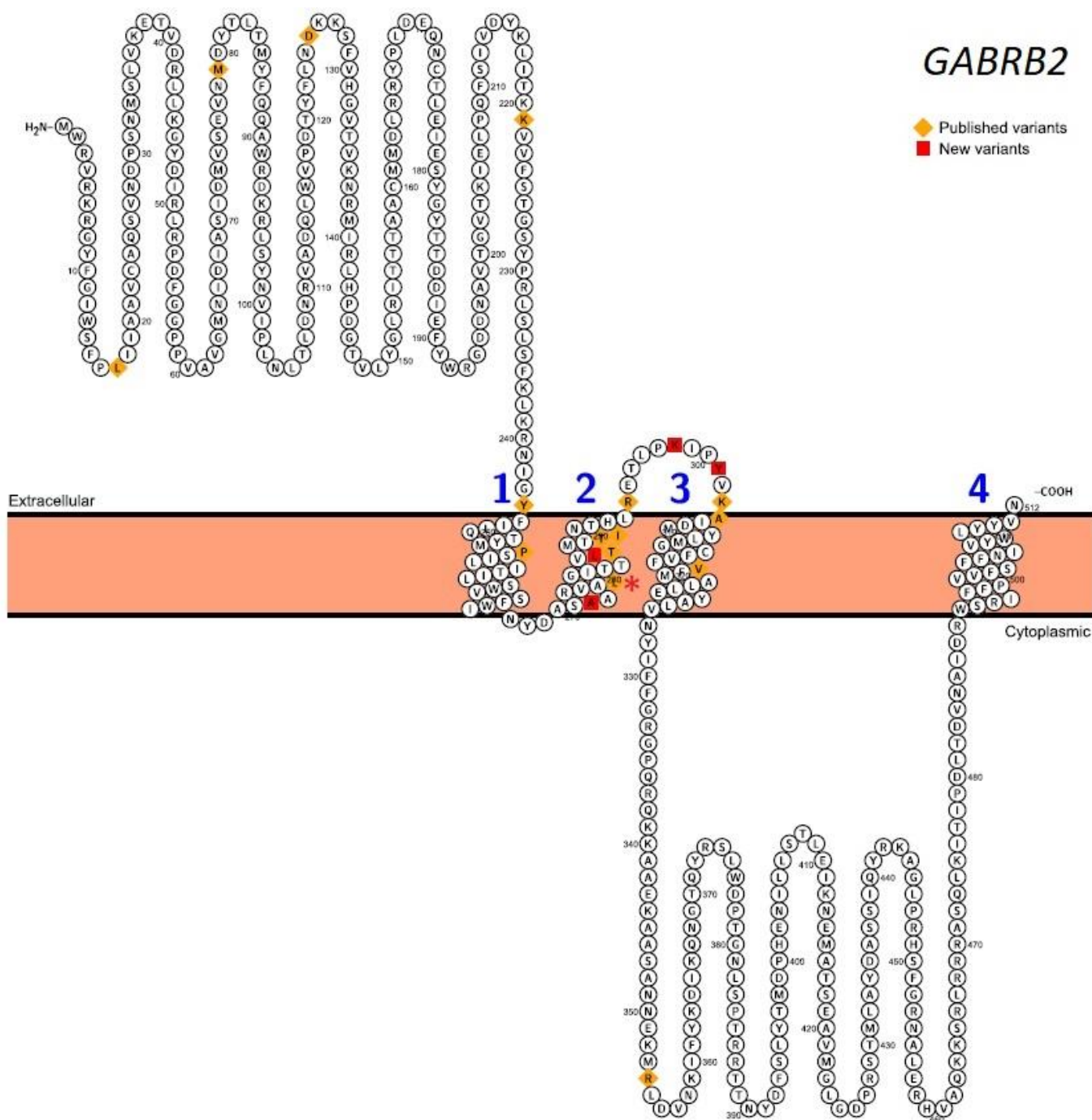
**Treatment :** CBZ = Carbamazepine; ETX = Ethosuximide ; LEV = Levetiracetam; LTG = Lamotrigine; PNB = Phenobarbital ; PMP = Perampanel ;

Pharmaco R= pharmaco-resistant; TPM = Topiramate; VGB = Vigabatrin; VPA= valproate; ZNS = Zonisamide; Vit. B6 = Vitamine B6

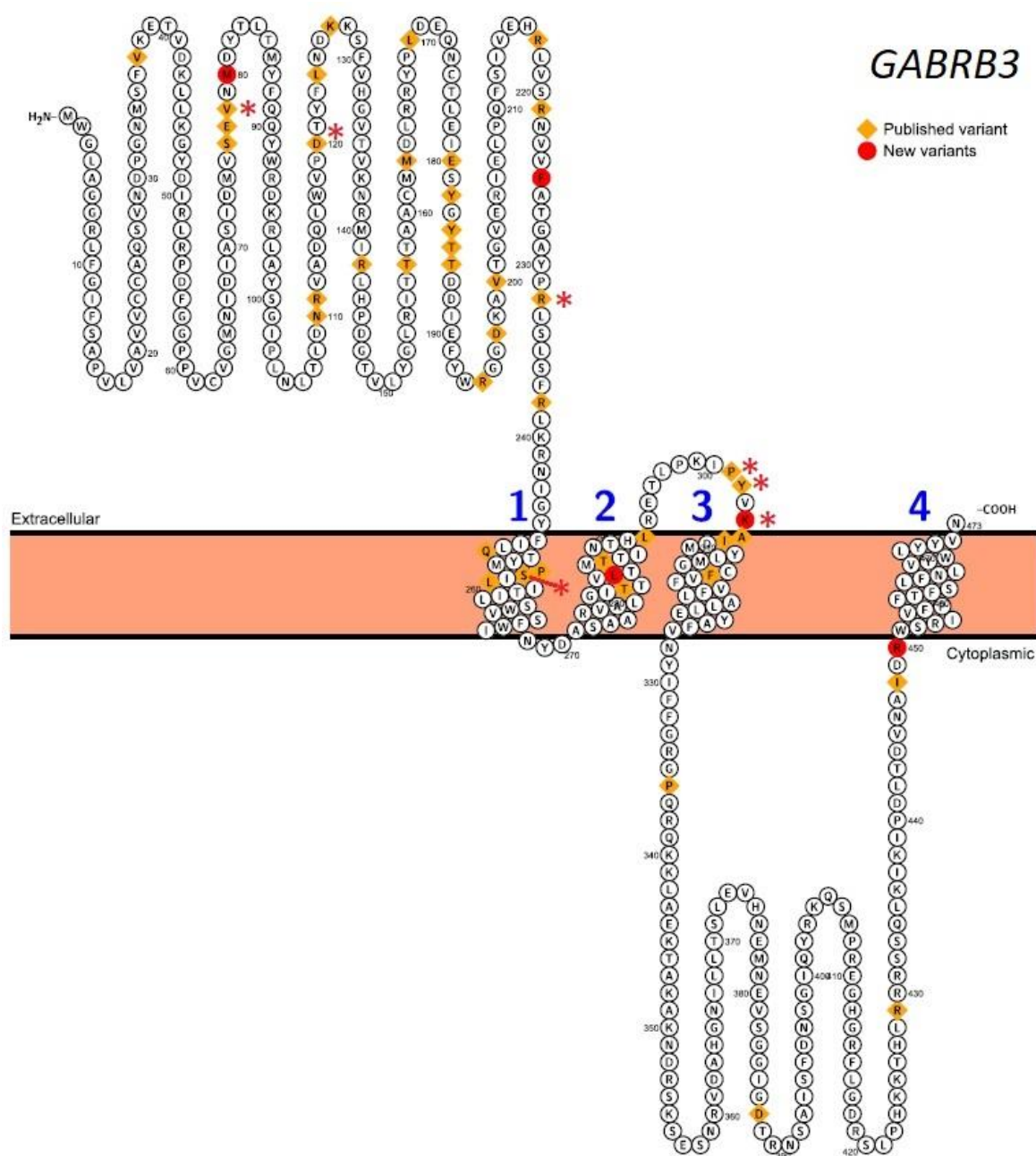




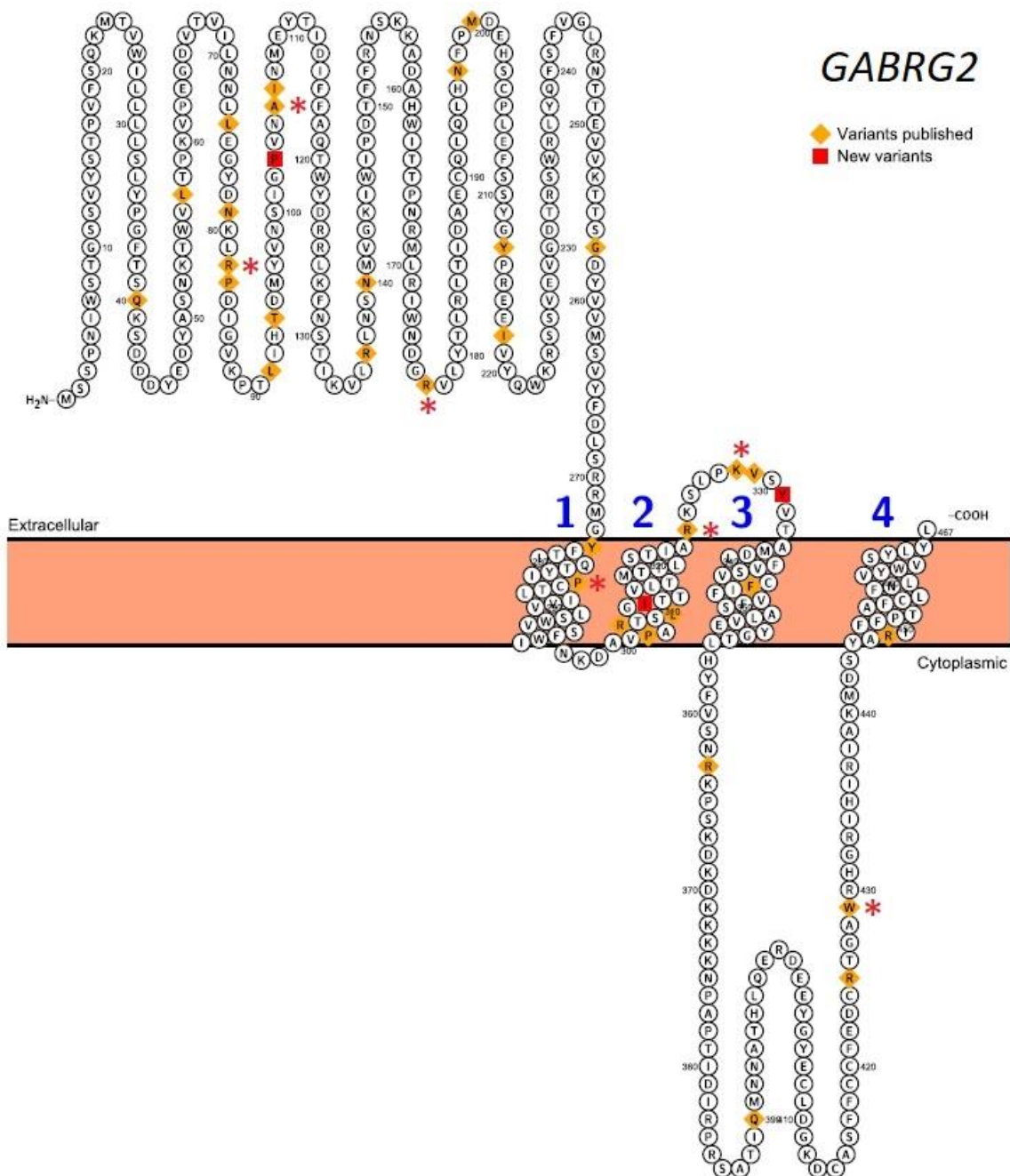
**Figure 2 a : Sous-unité  $\alpha 1$  codée par le gène GABRA1 : nouveaux variants rapportés (ronds rouges) et variants déjà publiés (carrés jaunes). Les variants récurrents sont annotés par une astérisque rouge.**



**Figure 2 b : Sous-unité  $\beta 2$  codée par le gène GABRB2 : nouveaux variants rapportés (ronds rouges) et variants déjà publiés (carrés jaunes). Les variants récurrents sont annotés par des astérisques rouges.**



**Figure 2 c : Sous-unité 63 codée par le gène GABRB3 : nouveaux variants rapportés (ronds rouges) et variants déjà publiés (carrés jaunes). Les variants récurrents sont annotés par des astérisques rouges.**



**Figure 2 d : Sous-unité  $\gamma 2$  codée par le gène GABRG2 : nouveaux variants rapportés (ronds rouges) et variants déjà publiés (carrés jaunes). Les variants récurrents sont annotés par des astérisques rouges.**

## Résultats cliniques

Tous les patients rapportés dans ce travail ont présenté une déficience intellectuelle et tous sauf un ont présenté une épilepsie.

### L'épilepsie

Les premières crises sont apparues à l'âge médian de 6,5 mois avec une grande variabilité, allant de dès le premier jour de vie à l'âge de 4 ans et demi.

En ce qui concerne le type de crises d'épilepsie : chez 22 des 26 patients présentant une épilepsie, les crises sont généralisées, elles sont majoritairement de types tonico-cloniques, avec absences atypiques et myoclonies chez 17 d'entre eux, ou plutôt de type atoniques avec spasmes chez 5 d'entre eux. Chez les 4 autres patients, les crises sont focales, avec une composante migrante chez 1 patient et exclusivement nocturnes chez 1 autre patient. Les crises étaient clairement favorisées par la fièvre chez 15 patients.

Concernant les premières crises inaugurales rapportées, pour les cas où nous avons pu recueillir l'information, elles étaient le plus fréquemment tonico-cloniques (n=5), myocloniques (n=3) ou à type de spasmes (n=2). La présence de fièvre lors de la première crise était clairement rapportée chez 5 patients.

Concernant les syndromes épileptiques diagnostiqués, ils étaient de type EEP (n=10), GEFS+ (n=6), syndrome de Dravet (n=3), MAE (n=3), épilepsie focale (n=2), syndrome de West (n=1), épilepsie généralisée photo-sensible (n=1).

Parmi les patients présentant une EEP : deux étaient de type encéphalopathie avec absences précoces et une de type encéphalopathie myoclonique précoce. L'épilepsie a débuté chez tous ces patients dès le premier mois de vie excepté ceux présentant une encéphalopathie avec absences et dès la première semaine chez 6 des 9 patients.

Les différents types de crises et syndromes épileptiques sont répartis de façon équivalente en fonction des différents gènes impliqués. Nous ne notons pas d'association entre les types de crises et le gène en cause, ni entre le type de crise et la localisation du variant dans la protéine.

Les tracés d'électro-encéphalogrammes (EEG) ont été classés en 3 grands types :

- aspect avec pointes ondes (PO) généralisées, retrouvé chez 6 patients,
- tracé désorganisé multi-focal (poly PO ; PO lentes ; suppression burst ; hypersarythmie), retrouvé chez 15 patients. A noter, tracé avec suppression burst retrouvés chez 4 patients et hypersarythmique chez 2 patients.
- tracé avec pointes focales, retrouvé chez 2 patients

Trois patients épileptiques présentaient des tracés EEG normaux.

### **Traitements anti-épileptiques**

Pour tous les patients, plusieurs traitements ont été introduits successivement ou en association.

Les traitements les plus souvent retrouvés efficaces sont l'acide valproïque (VPA - n=8), la Lamotrigine (LTG - n=7), le Topiramate (TPM - n=6), la Carbamazepine (CBZ – n=5), le Phenobarbital (PNB - n=4) et le Levetiracetam (LEV – n=4) auquel on peut rattacher le Piracetam (n=1), forme lévogyre du LEV.

Quatre patients présentaient une épilepsie pharmaco-résistante. Le tableau clinique était sévère chez tous ces patients.

D'autres traitements peuvent aggraver des épilepsies comme le Vigabatrin (VGB) chez un patient porteur d'une mutation dans le gène *GABRB3* (patient 13), ou l'Ethosuximide (ETX) chez un patient avec une mutation dans *GABRA1* (patient 2) alors qu'ils sont efficaces chacun chez un patient.

### **La déficience intellectuelle (DI)**

Tous les patients de notre cohorte présentaient une déficience intellectuelle de sévérité variable (hormis un patient pour qui nous n'avons pas de précision). Elle était sévère ou profonde chez 14 patients, parmi lesquels 10 d'entre eux étaient non marchant et n'avaient acquis aucun langage. Trois de ces patients sont décédés dans l'enfance du fait de la sévérité du handicap. La DI était modérée chez 10 patients ; ces patients avaient présenté un retard de développement

psychomoteur avec une marche et un langage acquis avec du retard. La DI était légère chez 2 patients qui s'exprimaient en faisant des phrases, bien que le langage ait été acquis avec du retard. La scolarisation était en milieu ordinaire avec une auxiliaire de vie scolaire pour un patient (patient 7), et en classe adaptée pour l'autre (patient 13).

### **Examen neurologique**

Parmi toutes les données cliniques relevées, on note certains points de l'examen neurologique retrouvés en proportion équivalente entre les différents gènes, ils ne sont pas liés à la sévérité de l'atteinte :

- Des mouvements anormaux chez 11 patients comprenant des stéréotypies (n=6), des mouvements choréo-athétosiques (n=3) et des tremblements (n=2).
- Une ataxie (n=5)
- Une microcéphalie chez 8 patients : congénitale (n=2), acquise (n=5) ou non précisée (n=1) et une macrocéphalie chez 4 patients : congénitale (n=2) ou acquise (n=2).
- Des symptômes évocateurs de troubles du spectre autistique (TSA - n=4).

Au niveau neuro-visuel : 5 patients présentaient un strabisme (avec une amblyopie associée chez l'un d'entre eux), un patient présentait un nystagmus et un patient présentait une apraxie oculo-motrice. Les patients étaient porteurs d'une mutation dans les gènes *GABRG2* (n=4), et *GABRB3* (n=2).

Enfin, une hypotonie axiale est notée chez 11 patients, elle est clairement associée à la sévérité de l'atteinte neurologique.

### **Imagerie cérébrale**

L'IRM cérébrale était normale pour 13 patients. Il existait des anomalies aspécifiques chez 11 patients; en particulier à type d'atrophie corticale et/ou du corps calleux (n=5), d'hypersignaux de la substance blanche (n=5), ou des kystes arachnoïdiens (n=2). Nous n'avions pas d'information pour 3 patients.

## Malformations et traits dysmorphiques

Parmi les données cliniques supplémentaires relevées, huit patients présentaient des traits du visage dysmorphiques et/ou des malformations.

Chez des patients porteurs d'une mutation dans le gène *GABRB3* (n=4), il existait des anomalies au niveau de l'étage inférieur du visage : deux patients présentaient un micro-rétrognathisme (patients 17 et 21), un patient présentait un prognathisme (patient 16) et deux patients avaient un palais ogival (patients 10 et 17). De plus, un patient avec une mutation homozygote de *GABRB3* avait une fente vélo-palatine (patient 20).

Ces patients présentaient d'autres traits dysmorphiques en plus de l'étage inférieur : le patient 10 présentait un épicanthus avec des fentes palpébrales orientées en bas et en dehors et une plagiocéphalie. Le patient 17 présentait une plagiocéphalie, des doigts longs et une asymétrie faciale avec chute de la commissure labiale à droite, l'oreille droite était grande et mal ourlée, et l'oreille gauche était basse en rotation postérieure.

Concernant les autres gènes : le patient 2 (*GABRA1*) présentait une macrostomie, un hypertélorisme et des fentes palpébrales obliques en bas et en dehors. Le patient 23 (*GABRG2*) avait un visage allongé avec une enophtalmie. Le patient 26 (*GABRG2*) avait des oreilles basses, un philtrum court et élargi et une syndactylie bilatérale des deuxièmes et troisièmes orteils.

## Différence de sévérité en fonction de la localisation des variants

En analysant ces résultats il existe des différences en termes de sévérité des tableaux cliniques chez les patients ayant des variants au niveau de l'extrémité N-terminale par rapport aux patients ayant des variants dans les autres régions des sous-unités. Leur tableau clinique était significativement moins sévère. Les différences n'étaient pas retrouvées en s'intéressant spécifiquement à chacune des autres régions.

La médiane de l'âge d'apparition des crises chez les patients ayant un variant au niveau de l'extrémité N-terminale était de 11 mois (minimum : 2 mois, à maximum : 26 mois), alors qu'elle était de 1 mois chez les autres patients (minimum : 1 jours, à maximum : 4 ans et demi).



De même, 9 patients ont présenté une épilepsie débutée avant l'âge de 1 mois, aucun de ces patients n'avait de variant situé au niveau de l'extrémité N-terminale.

Concernant les syndromes diagnostiqués, pour les patients présentant une EEP, aucun des variants n'était situé au niveau de l'extrémité N-terminale, alors qu'il s'agit du domaine protéique porteur du plus grand nombre de variants dans notre cohorte de patients. Pour ces patients, les variants sont situés au niveau des domaines transmembranaires (n=2 pour TM1 et n=2 pour TM2) ou des boucles entre TM2 et TM3 pour 2 patients, et entre TM3 et TM4 pour le variant retrouvé chez 3 patients de la même fratrie (correspondant à la mutation homozygote).

A l'inverse, pour les patients présentant une GEFS+, les variants sont situés en majorité au niveau de l'extrémité N-terminale (n=4) et de la boucle entre TM2 et TM3 (n=2).

Les localisations sont plus variables concernant les autres entités cliniques.

Parmi les 15 tracés EEG désorganisés, multi-focaux, évocateurs d'encéphalopathies, 12 sont retrouvés chez des patients dont les variants responsables du tableau clinique ne sont pas situés sur la partie N-terminale de la protéine.

Concernant la DI, aucun des variants des patients présentant une DI sévère n'est situé au niveau de l'extrémité N-terminale. Par contre, les variants des 2 patients présentant une DI légère sont localisés dans cette région.

Nous avons réalisé une analyse statistique (de type test exact de Fisher avec tableau de contingence) pour comparer ces paramètres en fonction de la localisation des variants dans l'extrémité N-terminale ou non (*Tableau 3*). Nous avons trouvé des résultats significatifs pour chacun des critères suivants : apparition précoce des crises d'épilepsie (< 1 mois), existence d'une DI sévère, existence d'une EEP, tracés EEG désorganisés et multi-focaux.

	localisation de la mutation		
	Région N-terminale (n=8)	Autres régions (global) (n=19)	
DI sévère (n=14/26)	0	14	p=0,00032
DI non sévère (n=12/26)	8	4	
EEP (n=10/27)	0	10	p=0,0054
Absence d'EEP (n=17/27)	8	9	
Première crise < 1 mois (n=9/25)	0	9	p=0,0217
Première crise > 1 mois (n=16/25)	8	8	
EEG désorganisé et multifocal (n=15/26)	3	12	p=0,218
Autre tracé EEG (n=11/26)	5	6	

**Tableau 3 : Comparaison de certains critères cliniques retrouvés chez un nombre de patients n, en fonction de la localisation du variant dans l'extrémité N-terminale ou non. Etude statistique réalisée par l'intermédiaire du test exact de Fisher avec un tableau de contingence pour rechercher une différence statistique entre plusieurs variables qualitatives.**

## Discussion

Cette étude est la plus importante en termes de nombre de patients décrits porteurs de mutations dans des sous-unités du récepteur au GABAA. Elle permet de rapporter 17 nouvelles mutations et 6 autres qui ont déjà été décrites dans la littérature.

Ce travail a l'originalité de décrire des patients ayant des mutations dans quatre sous-unités différentes. Cela permet de comparer les sous-unités entre elles, alors que la majorité des études ne s'intéressaient qu'à l'une d'entre elles.

Nous mettons en évidence une corrélation génotype phénotype jamais décrite jusqu'alors qui est liée à la localisation de la mutation dans le gène. Les patients porteurs d'une mutation dans l'extrémité N-terminale du gène ont une épilepsie et une DI significativement moins sévères que les patients porteurs de mutations dans d'autres régions du gène.

Les 27 patients rapportés dans ce travail étaient porteurs d'une mutation dans les gènes codant pour l'une des 4 sous-unités des récepteurs au GABAA les plus répandues chez l'homme : *GABRA1*, *GABRB2*, *GABRB3* et *GABRG2*.

Tous les patients étaient atteints d'une DI, et tous sauf un ont développé une épilepsie de sévérité variable.

Le patient 24 est le seul qui n'a pas présenté d'épilepsie. Le variant c.926T>C (p.I309T) du gène *GABRG2* a été identifié chez ce patient, il est situé au niveau du 2<sup>e</sup> domaine transmembranaire de la protéine. C'est un variant rare, non retrouvé dans les bases de données de polymorphismes, il n'a jamais été rapporté dans la littérature et est prédit pathogène par les logiciels de prédiction *in silico*. Il a été classé variant de signification inconnu du fait de l'absence d'épilepsie rapportée chez le patient (âgé de 4 ans actuellement). Il présente une DI modérée associée à un TSA et à des troubles neuro-visuels avec strabisme et amblyopie, ce sont des symptômes rapportés dans les mutations des gènes GABRAA. Ce patient est à priori, à risque de développer une épilepsie.

## Les différentes sous-unités

Les différentes sous unités et les différents gènes ont souvent été étudiés et décrits indépendamment les uns des autres.

**Le gène *GABRA1*** code pour la sous-unité  $\alpha 1$  du récepteur GABAA, il s'agit de l'une des sous-unités les plus abondantes exprimées dans le cerveau (Pirker et al., 2000).

Les patients décrits dans la littérature présentent une épilepsie de gravité variable et de spectre phénotypique très large. Les crises sont souvent précoces, très variables et de tous types. La plupart des patients ont développé une EEP, y compris des syndromes de Dravet, Ohtahara ou West (Carvill et al., 2014 ; Johannesen et al., 2016 ; Koder et al., 2016, Farnaes et al., 2017). Plus rarement, les patients développent d'autres syndromes épileptiques de meilleur pronostic : épilepsie myoclonique juvénile, GEFS+, MAE, épilepsie absence ou épilepsie généralisée photosensible (Cossette et al., 2002 ; Maljevic et al, 2006 ; Lachance-Touchette et al, 2011 ; Johannesen et al. 2016).

Parmi les 4 patients que nous rapportons, deux ont développé une EEP (patients 3 et 4): l'un avec une composante myoclonique prédominante (patient 3) et l'autre est décédé à l'âge de 8 mois du fait de la sévérité de la maladie (patient 4). Les deux autres patients ont développé une GEFS+ (patient 1) et une épilepsie généralisée photosensible (patient 2).

**Le gène *GABRB2*** code pour la sous-unité  $\beta 2$  qui compose le récepteur GABAA le plus commun dans le cerveau : le complexe  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  (Farrant and Nusser, 2005). Il s'agit de la sous unité la moins fréquemment rapportée des quatre que l'on présente dans ce travail. La première description clinique concernait un patient présentant une GEFS+ (Srivastava et al., 2014). Les patients rapportés par la suite présentaient des EEP avec myoclonies et absences prédominantes. Les crises pouvaient être focales ou généralisées, toniques, atoniques ou tonico-cloniques (Hamdan et al., 2017 ; May et al., 2018 ; Maljevic et al., 2019).

Les cinq patient que nous rapportons présentaient des crises de natures très variables débutées dans la première année de vie, mis à part pour le patient 5 qui a seulement développé une

épilepsie focale nocturne à partir de 4 ans et demi. Deux patients ont présenté une EEP (patients 6 et 9), et les deux autres patientes, une GEFS+ (patiente 7) et une MAE (patiente 8).

**Le gène *GABRB3*** code pour la sous-unité  $\beta 3$  qui est exprimée à des niveaux élevés dans le cerveau embryonnaire, mais son expression diminue chez l'adulte, excepté dans l'hippocampe. C'est la sous-unité présente le plus tôt lors du développement embryonnaire (Tanaka et al., 2012).

Le Consortium Epi4K a été le premier à mettre en évidence des mutations de *GABRB3* dans l'EEP (Allen et al., 2013), cela a été confirmé par d'autres études (Papandreou et al., 2016 ; Møller et al., 2017). Les patients présentent en général un large spectre de crises d'épilepsie de types toniques, myocloniques, tonico-cloniques généralisées et absence. Les syndromes épileptiques rapportés (parfois inclus dans les EEP) comprennent le syndrome de Lennox-Gastaut, le syndrome de West, le syndrome de Dravet, et des formes moins sévères telles que la GEFS+, l'épilepsie-absence, la MAE (Allen et al., 2013 ; Møller et al., 2017). Certains auteurs notent un spectre phénotypique similaire en termes d'épilepsie chez les patients avec mutations dans les gènes *GABRB2* et *GABRB3*.

Dans ce travail, nous présentons onze patients porteurs de mutations dans le gène *GABRB3*. Trois d'entre eux (patients 19, 20 et 21) ont une mutation à l'état homozygote héritée de leurs parents cousins germains : c.1347\_1350delCAGA (p.R450Gfs\*15). Il s'agit d'une délétion de 4 nucléotides, entraînant un décalage du cadre de lecture et une protéine tronquée prématurément. La mère a présenté une épilepsie dans l'enfance qui a régressé dans l'adolescence (sans autres précisions) et le père était à priori asymptomatique. Les trois patients (2 sœurs et un frère) ont développé une EEP dès la première semaine de vie avec des crises à prédominance tonico-cloniques. Chez deux d'entre eux, le premier EEG était de type suppression-burst, et était très perturbé par la suite chez les 3 patients. Il existe une certaine corrélation des tableaux cliniques entre ces 3 frères et sœurs.

Concernant les autres patients, les crises étaient variables et ont débuté dans la première année de vie également. Les diagnostics comprenaient deux EEP (patientes 16 et 17) dont l'une avec des absences prédominantes (patient 16), un syndrome de West (patient 13), un syndrome de Dravet like (patient 14), deux épilepsies myoclonono-atoniques (patients 10 et 15), deux GEFS+ (patientes 11 et 12) et une épilepsie focale migrante (patiente 18).

A noter, le gène *GABRB3* est situé dans la région 15q11.2-q13 en cause dans le syndrome d'Angelman (SA) et le syndrome de Prader-Willi (SPW). Il est montré qu'il joue un rôle significatif dans la neuro-physiologie de ces deux syndromes notamment en ce qui concerne la DI, l'épilepsie (quand elle est présente), ou des caractéristiques de l'examen neurologique telles que une microcéphalie et des stéréotypies, très présentes dans le syndrome d'Angelman. Ces éléments sont détaillés dans l'*annexe 1*.

**Le gène *GABRG2*** code pour la sous-unité  $\gamma 2$  qui fait également partie du récepteur le plus fréquent :  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  (Farrant and Nusser, 2005). Cette sous-unité joue un rôle clé pour le transport et la localisation du récepteur GABAA en post-synaptique (Alldred et al., 2005).

Les crises d'épilepsie sont très variables, des mutations dans *GABRG2* ont été rapportées chez des patients porteurs de simples crises fébriles, GEFS+, épilepsie absence de l'enfant, d'épilepsies myocloniques et EEP comprenant des syndromes de Dravet (Baulac, 2001 ; Harkin et al., 2002 ; Kang and Macdonald, 2016 ; Shen et al., 2016 ; Hernandez et al., 2017 ; Zou et al., 2017).

Parmi les 6 patients que nous rapportons, un frère et une sœur présentaient un tableau clinique sévère avec un syndrome de Dravet causé par la mutation c.968G>A (p.R323Q) héritée de la mère (patients 25 et 26). Les deux patients présentaient une DI sévère avec des troubles du comportement, des TSA, et des stéréotypies. La sœur avait plus d'interactions sociales que son frère mais avait un contact singulier, des phrases stéréotypées, des rires immotivés et une trop grande familiarité. Elle a présenté plusieurs épisodes de régression à 6 ans et 12 ans qui lui ont fait perdre la propreté et la communication. La maman a présenté une épilepsie généralisée avec des convulsions fébriles (sans autres précisions), associée à une DI légère avec un retard de langage et des difficultés scolaires. Elle n'a plus eu besoin de traitement anti-épileptique à partir de l'âge de 17 ans. Le frère et la sœur présentaient tous les deux un syndrome de Dravet avec une DI sévère et un TSA : les deux tableaux cliniques étaient proches bien que de sévérité différente. L'hypothèse principale pour expliquer l'atteinte beaucoup moins importante chez la mère était la possibilité d'une mutation en mosaïque chez elle. Mais les pics en séquençage Sanger étaient identiques entre la mère et ses enfants. Cela n'a pas été vérifié sur un autre tissu.

Cette mutation a été rapportée par plusieurs auteurs, il s'agit d'un « hot spot mutationnel » : il est décrit 2 cas de patientes porteuses de cette mutation qui présentaient des tableaux cliniques sévères (Shen et al., 2016). La première patiente a débuté une épilepsie à 10 mois avec des crises

tonico-cloniques et myocloniques généralisées sensibles à la fièvre. L'épilepsie était pharmaco-résistante et associée à une DI sévère. La seconde patiente a également présenté une DI sévère avec une épilepsie pharmaco-résistante apparue à 1 an avec des crises myocloniques sensibles à la fièvre puis devenues polymorphes. Il est aussi rapporté le cas d'un patient porteur de la même mutation qui présentait une GEFS+ à partir de l'âge de 8 mois, puis qui a présenté des crises de natures variables. Il avait un développement et un tracé EEG normal (Carvill et al., 2014).

Ainsi, il existe une grande variabilité clinique pour cette mutation au niveau de la DI et de l'épilepsie. Les tableaux cliniques du frère et de la sœur sont proches du premier article cité (Shen et al., 2016) mais plus sévère que celui du second article (Carvill et al., 2014) qui est comparable à celui de la mère.

D'autre part, le patient 22 était porteur d'une mutation héritée de son père : c.282\_306dup (p. P103Rfs\*6). Il s'agit d'une duplication de 25 nucléotides entraînant le décalage du cadre de lecture et une protéine tronquée prématurément. Le patient ainsi que son père ont présenté un tableau de GEFS+. Le père a eu une épilepsie active jusqu'à l'âge de 13 ans. Il existerait ce même antécédent chez la grand-mère paternelle et un oncle paternel. Nous n'avons pas réussi à récupérer les informations cliniques des apparentés.

Les autres patients ont présenté une EEP dès le premier jour de vie (patient 23), une GEFS+ avec crises tonico-cloniques (patient 27), et le dernier (patient 24) est celui ayant présenté une DI modérée avec TSA et déficit neuro-visuel sans épilepsie.

Nous notons que trois patients ont présenté des signes évocateurs de TSA. Ces symptômes sont régulièrement rapportés chez des patients porteurs de mutations dans les gènes GABRAA, sans que cela soit spécifique à *GABRG2*.

### **Un tableau clinique commun aux 4 sous-unités**

En analysant les cas des patients que l'on rapporte et les données issues de la littérature nous avons essayé d'avoir une vue d'ensemble des 4 sous-unités.

Le diagnostic majoritairement retenu parmi les patients que l'on présente est l'EEP (n=10). Cette entité n'est pas clairement délimitée et peut inclure également des syndromes définis plus précisément tels que des syndromes de Dravet, de West ou d'Ohtahara. Il existe un risque de

diagnostiquer en excès une EEP au détriment d'un diagnostic électro-clinique plus fin. Cette part majoritaire est également retrouvée dans la littérature. Cela n'est probablement pas représentatif des proportions réelles dans la population générale. Dans notre travail, il peut exister un biais de sélection car l'inclusion des patients a été principalement effectuée via le réseau EPIgene, qui étudie principalement des patients porteurs d'encéphalopathies épileptiques ou de syndromes épileptiques sévères. De façon plus générale, l'accès limité aux analyses génétiques fait que ce sont les patients atteints de formes de maladies les plus sévères qui bénéficient de telles investigations.

Concernant les tracés EEG, ils étaient le plus souvent désorganisés et multi-focaux (n=15 - poly PO ; PO lentes ; suppression burst ; hypersarythmie). Cette plus grande proportion est corrélée à la sévérité des présentations cliniques des patients. Il existait des tracés suppression burst chez quatre patients et hypersarythmiques chez deux patients, porteurs de mutations dans plusieurs gènes différents. Ces tracés sont rapportés par exemple chez deux patients avec mutations dans *GABRA1* (Kodera et al., 2016).

Nous remarquons que pour cinq patients, le premier tracé EEG était interprété normal, et ces cinq patients étaient porteurs d'une mutation dans le gène *GABRG2*. Les tracés EEG sont restés normaux par la suite dans le suivi pour trois d'entre eux. Cette particularité n'est pas retrouvée dans la littérature.

Une sensibilité à la fièvre était clairement relevée chez 15 des 27 patients : cette particularité n'est pas dépendante de la localisation du variant et n'est pas associée à la sévérité clinique. Une proportion semble être moins importante pour le gène *GABRB2* parmi nos patients (1/5 patients). Cette faible proportion est également retrouvée dans la publication qui rapporte le plus de mutations dans ce gène (2/11 patients) (Hamdan et al., 2017). Mais cette particularité n'est pas retrouvée dans les autres études ce qui nous empêche de retenir cette spécificité. La sensibilité à la fièvre semble donc être partagée entre les quatre sous-unités étudiées ici.

Concernant l'examen neurologique : des mouvements anormaux (stéréotypies, mouvements choréo-athétosiques et tremblements) sont retrouvés chez 12 patients indifféremment de la sous-unités impliquée, et sont par exemple rapportés associés à des mutations dans *GABRA1* (Kodera et al., 2016) ou *GABRB2* (Hamdan et al., 2017). Ces deux publications relèvent la microcéphalie comme signe clinique commun, que l'on retrouve aussi (n=8). On retrouve aussi une macrocéphalie (n=4) sans qu'elle ne soit clairement relevée dans d'autres publications.



Nous rapportons sept patients avec une atteinte neuro-visuelle à type de strabisme, nystagmus, déficit visuel ou amblyopie (gène *GABRB3* et *GABRG2*). Dans la littérature est rapporté un déficit visuel (sans précision) chez 4 patients porteurs de mutations dans *GABRB2* (Hamdam et al., 2017 ; Bosch et al., 2016).

Les anomalies aspécifiques retrouvées à l'imagerie cérébrale chez la moitié des patients (atrophie corticale et/ou du corps calleux, hypersignaux de la substance blanche) sont comparables à ce qui est retrouvé dans la littérature et dans les mêmes proportions : pour *GABRB3* (Møller et al., 2017), pour *GABRB2* (Hamdan et al., 2017) et pour *GABRA1* (Kodera et al., 2016). La présence de telles anomalies est corrélée à un tableau sévère (n=9/9) mais une grande partie des patients avec IRM normale ont aussi une DI sévère (n=6/13). Un biais peut résider dans le moment à laquelle l'imagerie a été effectuée, souvent seulement en phase précoce, au moment du diagnostic. Nous n'aurions peut-être pas les mêmes résultats si l'imagerie était contrôlée à distance. A noter, il est retrouvé chez 2 patients un kyste arachnoïdien qui n'est pas corrélé à un tableau sévère.

En analysant les cas des patients que l'on rapporte et les données issues de la littérature nous avons essayé d'avoir une vue d'ensemble entre les 4 sous-unités : il existe un véritable chevauchement phénotypique entre les sous-unités sans qu'il y ait de spécificité concernant l'épilepsie (les types et la précocité des crises, les syndromes épileptiques, les tracés EEG), la DI, les caractéristiques de l'examen neurologique ou de l'imagerie cérébrale.

### **Les traitements anti épileptiques**

Pour tous les patients épileptiques, plusieurs traitements ont été introduits successivement ou en association. Pour certains, plusieurs traitements sont notés efficaces du fait de la nécessité de l'association de plusieurs traitements pour obtenir un effet synergique. De plus, un traitement était souvent efficace pendant une durée donnée avant la survenue d'un échappement progressif.

Quatre patients présentaient une épilepsie pharmaco-résistante ; nous retrouvons cette proportion dans la littérature.

Les traitements les plus souvent retrouvés efficaces dans notre étude étaient le VPA, la LTG, le TPM, la CBZ, le PNB et le LEV, sans qu'il n'y ait de spécificité en fonction du gène en cause.

Ces molécules sont également retrouvées efficaces dans la littérature : VGB et VPA chez des patients porteurs de mutations dans le gène *GABRA1* (Kodera et al., 2016), LTG, VPA et LEV (*GABRB2*) (Hamdan et al., 2017), concernant les mutations dans *GABRG2* : VPA et ETX sont efficaces chez la souris (Tan et al., 2007 ; Kim et al. 2015) et VPA, TPM et LEV efficaces chez des patients (Shen et al., 2016). Enfin, la LTG est rapportée efficace (Dan and Boyd, 2003) chez des patients porteurs de mutations dans *GABRB3*. Il a été clairement démontré que la LTG augmentait l'expression du gène *GABRB3* (Wang et al., 2002), bien que ce médicament n'ait aucun effet direct sur les récepteurs au GABAA (Gibbs et al., 2002). Parmi les patients que l'on rapporte la LTG est efficace chez des patients avec mutations dans *GABRA1*, *GABRB3* et *GABRG2*.

La VGB est plus controversée car elle peut aggraver des épilepsies : c'est le cas pour le patient 13 de notre étude avec une mutation dans le gène *GABRB3*, ou chez deux patients rapportés (Hamdan et al., 2017) ayant des mutations dans *GABRB2*, ou chez des patients porteurs d'un syndrome d'Angelman (Pelc et al., 2008) détaillés en *Annexe 1*.

Il n'y a donc pas de spécificité d'un traitement pour une sous-unité particulière.

Le cours de Macdonald RL et Rogawski, 2008, résume les différents mécanismes impliqués dans l'action du GABA et relève les différentes molécules qui favorisent son action :

- Inhibition de sa dégradation par la GABA-transaminase (VGB, VPA)
- Activation (ou renforcement) du récepteur GABAA (TPM, Barbituriques dont le PNB, Benzodiazépines (BZD), Felbamate)
- Inhibition de la recapture du GABA (Tiagabine)
- Le VPA : augmenterait le turn over du GABA par la diminution de sa dégradation et l'augmentation de sa synthèse (mécanismes mal caractérisés).

L'effet de la CBZ est plus discutable car il n'a pas d'action sur les récepteurs au GABAA, mais elle est connue pour inhiber les canaux sodiques et calciques excitateurs. Ainsi l'efficacité de la CBZ chez les patients que l'on décrit est indirecte en inhibant les principaux canaux excitateurs des neurones.

Les patients porteurs de mutations dans ces gènes pourraient davantage bénéficier de traitements GABAergiques tels que le VPA, la LTG, le TPM, le PHB ou le LEV. C'est le principe la médecine

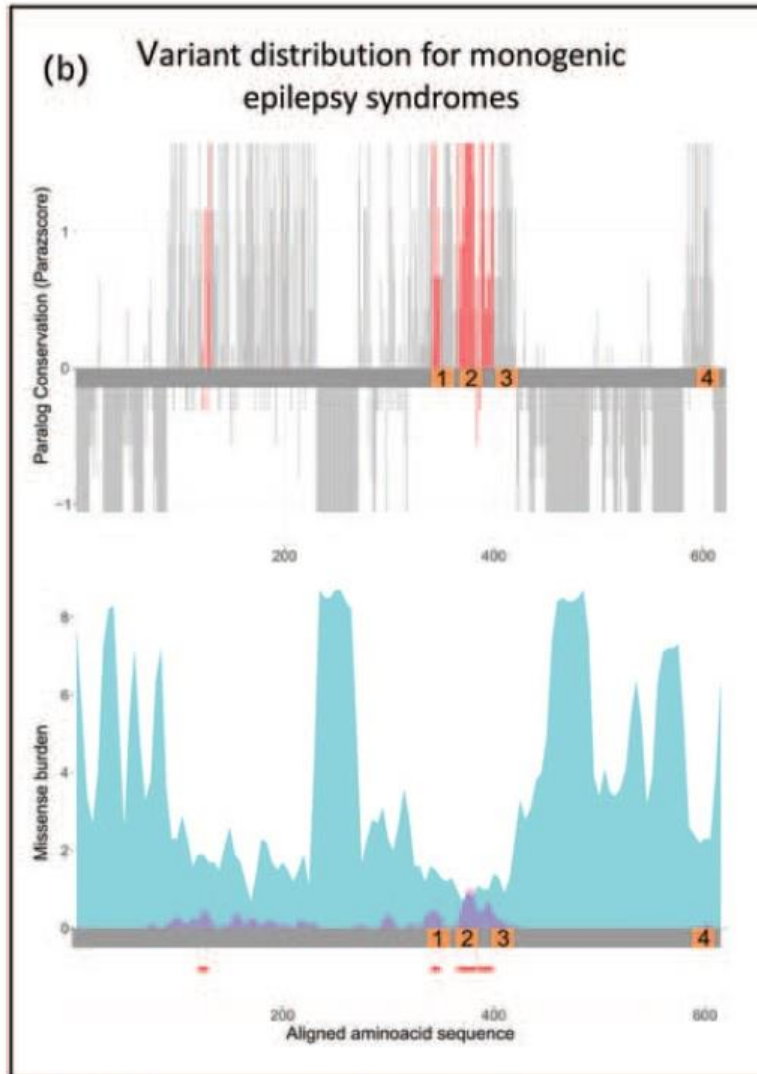
personnalisée : permettre à des patients porteurs de mutations dans certains gènes de bénéficier de traitements spécifiques qui ciblent les voies endommagées par l'altération génétique. Ces molécules pourraient être prescrites en priorité en cas de diagnostic moléculaire confirmé.

### **Localisations des variants**

Chaque sous-unité du récepteur GABAA possède une longue extrémité N-terminale permettant l'assemblage des sous-unités entre elles et la liaison des ligands, quatre segments transmembranaires (TM1-4), une longue boucle intracellulaire entre TM3 et TM4 et une courte terminaison C-terminale extracellulaire. Les cinq domaines TM2 des sous-unités assemblées, forment le pore où passent les ions chlorure.

Dans notre étude, les variants identifiés se situent en majorité au niveau de trois régions : l'extrémité N-terminale (n=8), TM2 (n=7) et la boucle extracellulaire entre TM2 et TM3 (n=5). On retrouve seulement quatre variants au niveau des autres domaines protéiques.

Ces mêmes localisations principales ont été relevées à plus grande échelle en prenant en compte la majorité des mutations publiées des gènes *GABRA1*, *GABRA2*, *GABRA3*, *GABRA5*, *GABRB1*, *GABRB2*, *GABRB3*, *GABRD* et *GABRG2* (Maljevic et al., 2019). Les auteurs ont obtenu ces résultats en alignant les paralogues (c'est à dire les acides aminés conservés entre les différentes sous-unités). Ils ont cartographié sur cet alignement les polymorphismes de la population générale et les variants pathogènes. Ils ont enfin mis en évidence les régions ayant significativement plus de variants pathogènes que de polymorphismes (barres rouges en haut et zones violettes en bas) à l'aide de tests de Fisher (*Figure 3*).



**Figure 3 : tirée de l'article Maljevic *et al.* : Positions des variants dans les gènes codant pour les sous-unités du récepteur au GABA<sub>A</sub> associés à des syndromes épileptiques monogéniques. Les variants associés à l'épilepsie sont significativement regroupés dans l'extrémité N-terminale, dans le deuxième domaine transmembranaire TM2 et dans la boucle extra-cellulaire qui relie TM2 et TM3.**

D'autre part, nous avons repris toutes les mutations récurrentes décrites dans la littérature auxquelles nous avons ajouté nos données (annotées avec une astérisque rouge sur les Figures 2a, b, c, d). Le seuil de récurrence d'un variant pour un acide aminé donné était fixé à 3. Les variants récurrents sont répartis principalement entre l'extrémité N-terminale et les deux premiers domaines transmembranaires (et pour *GABRB3*, au niveau de la boucle qui relie TM2 et TM3). Le

détail des localisations de ces mutations récurrentes dans chaque gène est décrit dans l'*annexe 2*.

### **Corrélation génotype-phénotype**

Pour évaluer la variabilité d'expression d'une mutation ou éventuellement mettre en évidence une corrélation entre le génotype et le phénotype, nous nous sommes intéressés aux tableaux cliniques de patients porteurs de mêmes mutations dans le cas des fratries, des mutations héritées ou des mutations récurrentes chez des patients n'ayant aucun lien de parenté.

Parmi les patients que nous rapportons, 3 mutations sont portées par plusieurs membres d'une même famille (déjà détaillés), et 2 autres mutations sont portées par des patients sans lien de parenté mais ayant la même mutation.

Nous avons identifié la même mutation c.851T>C (p.L284P) dans le gène *GABRB3* chez deux patientes de notre étude (patientes 15 et 16, non apparentées). Elles ont présenté toutes les deux, à partir de 6 et 7 mois, une épilepsie sévère sensible à la fièvre, avec des absences précoces, pharmaco-résistantes, et des tracés EEG retrouvant des PO généralisées.

Dans le gène *GABRB3* également, nous avons identifié chez deux autres patientes une mutation au niveau du même nucléotide qui entraîne une substitution au niveau du même acide aminé : c.674T>C/G (p.F225S/C). Les patientes ont développé respectivement une GEFS+ à partir de 13 mois et un syndrome de West à partir de 2 mois. Chez les 2 patientes l'épilepsie était sensible à la fièvre, il existait des mouvements anormaux (stéréotypies ou tremblements), des troubles neuro-visuels (strabisme, nystagmus, déficit visuel) et la DI n'étaient pas sévère. L'EEG était normal dans un cas alors qu'il était hypersyrmique avec des PO généralisées dans l'autre.

Ces deux exemples mettent en évidence un degré élevé de corrélation génotype-phénotype.

Cinq autres mutations identifiées chez des patients de notre étude ont déjà été rapportés dans la littérature, elles sont détaillées en *annexe 3*.

Il existe un degré important de corrélation génotype-phénotypique entre plusieurs patients porteurs du même variant, particulièrement en ce qui concerne la sévérité de la DI ou des syndromes épileptiques.

## **Corrélation entre la sévérité des tableaux cliniques et la localisation des mutations**

Du fait du nombre important de patients que nous rapportons, nous proposons l'hypothèse que les variants situés sur l'extrémité N-terminale causent des phénotypes cliniques significativement moins sévères que les variants situés sur d'autres domaines protéiques.

Les résultats sont significativement différents entre les patients ayant un variant dans l'extrémité N-terminale et les autres patients, pour chacun des critères suivants : existence d'une DI sévère, d'une EEP et apparition précoces des crises d'épilepsie (< 1 mois). Il existe donc une différence significative pour ces paramètres entre les patients avec variants dans l'extrémité N-terminale et les autres patients.

Cette corrélation n'a jamais été clairement formulée jusqu'à présent, bien qu'elle soit retrouvée dans beaucoup des cas rapportés dans la littérature. La principale limite de ce résultat et le nombre limité de patients que l'on a étudié. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait inclure un plus grand nombre de patients.

## **Mécanisme fonctionnel**

Pour la majorité d'entre elles, les mutations ont un effet perte de fonction en rapport avec une haplo-insuffisance. Cela est détaillé pour *GABRA1* (Lachance-Touchette et al., 2011), pour *GABRB2* (et *GABRA5*) (May et al. 2018), pour *GABRB3* (Janve et al., 2016; Møller et al. 2017) et pour *GABRG2* (Kang et Macdonald, 2016).

Pour *GABRG2*, il est aussi décrit un mécanisme de gain de fonction par effet dominant négatif dans le cas de mutations non-sens le plus souvent. Ces mutations induisent des phénotypes cliniques sévères (Kang et Macdonald, 2016).

Les anomalies fonctionnelles entraînées par ces mutations altèrent la fabrication du canal, son ouverture ou sa sensibilité au GABA. Les mutations peuvent aussi entraîner des défauts dans le trafic intracellulaire du GABA ou dans sa dégradation (Hirose et al., 2014).

### ***GABRB3* et dysmorphie faciale**

Cinq des 11 patients ayant une mutation dans le gène *GABRB3*, présentaient des traits dysmorphiques au niveau de l'étage inférieur du visage : une patiente de la fratrie avec la mutation homozygote de *GABRB3* avait une fente velo-palatine postérieure (patiente 20) et son frère présentait un micro-rétrognatisme (patient 21). Un autre patient présentait un micro-rétrognatisme (patients 17), un patient présentait un prognatisme (patient 16) et deux patients avaient un palais ogival (patients 10 et 17).

Dès 1997, il était rapporté que 57 % des souris avec KO du gène *gabrb3* présentaient une fente palatine (Homanics et al., 1997). Chez l'homme, il est rapporté deux jumeaux porteurs d'une EEP avec une mutation dans le gène *GABRB3* qui présentent des traits dysmorphiques avec entre autre un micro-gnatisme et un palais ogival (Štěrbová et al., 2018).

Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence une association entre des fentes labiales et/ou palatines (FLP) non syndromiques et des variants dans le gène *GABRB3*. Deux ont obtenu des résultats statistiquement significatifs : la première réalisée chez 268 patients d'origine italienne dont 78 avaient une FLP familiale retrouvait un déséquilibre de liaison significatif entre certains polymorphismes du gène *GABRB3* et des FLP non syndromiques (Scapoli et al., 2002). La seconde réalisée dans une population japonaise, mettait en évidence un haplotype de 6 loci du gène *GABRB3* significativement plus important chez des patients atteints de FLP comparativement à des témoins non atteints (Inoue et al, 2008). Deux autres études ont montré une association mais non statistiquement significative dans des populations de l'Iowa et des Philippines (Vieira et al., 2008) et brésilienne (Filézio et al., 2013).

Pour expliquer cela, il a été montré que l'expression non neuronale de *gabrb3* chez la souris est nécessaire pour le développement normal du palais. Le GABA, synthétisé par l'épithélium du palais, agit comme molécule de signalisation lors de l'orientation et de la fusion des tablettes du

palais (Hagiwara et al., 2003). Des recherches supplémentaires sont à réaliser pour expliquer les micro-rétrognatismes décrits chez les patients.

Une malformation labio-palatine peut être un signe clinique associé à une mutation dans le gène *GABRB3* : cette corrélation clinique a été récemment relevée en juillet 2019 (Bamborschke et al., 2019). Un cas similaire a également été rapporté chez un patient porteur d'une mutation dans le gène *GABRA3* (beaucoup plus rare), présentant des traits dysmorphiques avec micrognathie, fente palatine et petite taille (Niturad et al., 2017). Il ne semble pas y avoir de localisation précise des variants sur la protéine pour obtenir ce type de malformation. Nous ne retrouvons pas d'autres malformations ou traits dysmorphiques récurrents chez d'autres patients.

### **Les autres sous-unités**

Les mutations que l'on rapporte concernent les sous-unités les plus répandues dans le cerveau humain : environ 60 % des tous les récepteurs GABAA ont la combinaison  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ , et entre 15 et 20 % ont la combinaison  $\alpha 2\beta 3\gamma 2$  (Rudolph et al., 2011) . Mais il existe d'autres gènes qui codent pour d'autres sous-unités des récepteurs au GABAA, 19 au total, plus rares. Des mutations dans certains de ces gènes ont été identifiées chez des patients présentant des phénotypes similaires à ceux que l'on a décrit. Cela concerne par exemple les gènes *GABRA2* et *GABRA5* (Butler et al., 2018), *GABRA3* (Niturad et al., 2017), *GABRA6* (Hernandez et al., 2011), *GABRB1* (Lien et al., 2016) ou *GABRD* (Dibbens et al., 2004) rapportés chez des patients ayant présenté différentes formes d'épilepsies (notamment des EEP), une DI, une hypotonie, une microcéphalie ou des mouvements anormaux.

Le gène *GABRD* (Dibbens et al., 2004) est dans la région 1p36 et son déficit entraîne, en interaction avec d'autres gènes de la région, une épilepsie, des troubles neuro-développementaux, des TSA aussi retrouvés chez les patients porteurs du syndrome de délétion 1p36 (Windpassinger et al., 2002).

Les tableaux cliniques décrits chez ces patients semblent être comparables à ceux des patients que l'on rapporte. De plus, il existe entre toutes les sous-unités une grande homologie de structure. Elles sont toutes constituées de 4 domaines transmembranaires avec une longue extrémité N-terminale et une courte C-terminale extracellulaires. Au sein d'une famille de sous-unités, il y a



70% d'identité de séquence, et entre membres de familles différentes, 20% d'identité de séquence ou 50% de similarité de séquence (Mamalaki, et al., 1987).

Cependant, les conclusions que l'on tire ne peuvent pas encore être généralisées à toutes les sous unités des récepteurs au GABAA. Des travaux ultérieurs et une étude approfondie des articles rapportant ces patients sont encore nécessaires.

## Conclusion

Cette étude est la plus importante en termes de nombre de patients décrits avec des variants dans 4 sous-unités différentes du récepteur au GABAA. Les 27 patients rapportés dans ce travail étaient porteurs d'une mutation dans les gènes codant pour l'une des 4 sous-unités les plus répandues chez l'homme : *GABRA1*, *GABRB2*, *GABRB3* et *GABRG2*. Cela nous a permis de comparer les tableaux cliniques en fonction des sous-unités impliquées.

Nous n'avons pas trouvé de différence clinique particulière entre les sous-unités, en particulier concernant l'épilepsie (les types et la précocité des crises, les syndromes épileptiques, les tracés EEG, les traitements efficaces), ou l'importance de la déficience intellectuelle, ou les paramètres de l'examen neurologique, ou encore concernant l'imagerie cérébrale.

Nous avons seulement mis en évidence l'implication de la sous-unité  $\beta 3$  (comme probablement ce qui est rapporté pour  $\alpha 3$ ) dans le développement du palais et de l'étage inférieur du visage.

En termes de traitements anti-épileptiques, nous soulignons l'efficacité de certaines molécules qui favorisent l'action du GABA : elles pourraient être prescrites en priorité en cas de diagnostic moléculaire confirmé.

Enfin, nous mettons en évidence une corrélation génotype phénotype jamais décrite jusqu'alors liée à la localisation des variants dans les sous-unités : les patients porteurs d'un variant dans l'extrémité N-terminale ont une épilepsie et une DI significativement moins sévères que les patients porteurs de variants dans d'autres régions de la sous-unité.

Ces résultats mériteraient d'être confirmés en analysant un plus grand nombre de patients, notamment ceux déjà rapportés dans la littérature dont certains sont décrits précisément. Il est aussi important de vérifier que cette corrélation est retrouvée chez des patients porteurs de mutations dans les gènes codant pour les autres sous-unités du récepteur au GABAA non présentées dans ce travail.

## Annexes

### ***Annexe 1 - Le gène *GABRB3* est impliqué dans la neuro-physiologie du syndrome d'Angelman et du syndrome de Prader-Willi :***

Le gène *GABRB3* est situé dans la région 15q11.2-q13 en cause dans le syndrome d'Angelman (SA) et le syndrome de Prader-Willi (SPW). C'est une région connue pour être soumise à l'empreinte parentale.

Le SA est une maladie neuro-génétique rare liée à la perte de fonction d'un ou plusieurs gènes de la région 15q11-q12 d'origine maternelle, impliquant au moins le gène *UBE3A*. Les patients porteurs d'un SA présentent une DI sévère avec absence de langage, une microcéphalie, des troubles neurologiques avec ataxie et épilepsie (dans 80 % des cas), des traits morphologiques particuliers avec macrostomie, hypoplasie maxillaire, prognathisme, et des troubles du comportement avec hyperexcitabilité, éclats de rires et stéréotypies à type de battements des mains (Williams et al., 2006 ; Thibert et al., 2013).

Les formes de SA les plus sévères et les plus fréquentes (60 à 75%) sont associées à une délétion de la région 15q11.2-q13 de l'allèle maternel et emporte les gènes *UBE3A* et *GABRB3*.

Trois caractéristiques électro-encéphalographiques sont observées chez presque tous les patients porteurs d'un SA, indépendamment de l'anomalie génétique causale, de la gravité clinique ou de la présence et de la sévérité d'une épilepsie. (Dan and Boyd, 2003) ; elles comprennent :

- une activité rythmique de 2 à 3/s de grande amplitude prédominant sur les régions frontales,
- des séries d'activités rythmique delta plus diffuses,
- des décharges de pointes ondes de grande amplitude, facilitées par la fermeture des yeux, maximales en occipital.

Les auteurs ont montré que ces caractéristiques résultent d'une dysrégulation de la neurotransmission synaptique GABAergique par :

- un recrutement déficient des récepteurs GABA de type A liés à une expression réduite du gène *UBE3A* chez tous les patients,
- associé le plus souvent dans le cas des délétions, à une quantité réduite des sous-unités beta3 liés à une expression réduite du gène *GABRB3*.

L'expression du gène *GABRB3* a donc une importance majeure et complémentaire de celle de *UBE3A* dans la neuro-physiologie de ce syndrome (même en l'absence d'épilepsie).

C'est en 1997, que pour la première fois, il a été fait un lien entre le SA et *GABRB3*. Des souris ayant un KO homozygote de *gabrb3*, présentaient des symptômes en terme de cognition, de coordination motrice ou de convulsion, évocateurs du SA. (Homanics et al., 1997 ; DeLorey et al. 1998 ; DeLorey et al., 1999).

Bien qu'aspécifiques, plusieurs des signes cliniques présentés par les patients porteurs d'un SA (DI sévère, épilepsie, microcéphalie, ataxie, stéréotypies) sont retrouvés chez les patients de notre étude porteurs de variants dans le gène *GABRB3* (ou plus largement dans les autres gènes *GABRAA*).

Parmi les patients que l'on rapporte, certains tracés EEG présentaient des éléments typiques de patients porteurs de SA (patients 10 et 13). Il a clairement été évoqué un diagnostic de SA, à la lecture du premier EEG du patient 10.

Les crises d'épilepsie les plus fréquentes dans le SA sont les crises myocloniques, les absences atypiques et les crises tonico-cloniques et atoniques (Thibert et al., 2013). Elles sont toutes souvent retrouvées chez les patients porteurs de mutations dans *GABRB3* (notamment les crises d'épilepsie myoclonono-atoniques, majoritaires Møller et al., 2017) et dans les autres sous unités *GABRAA*.

Au niveau thérapeutique, il existe aussi des parallèles à souligner. Les traitements les plus souvent efficaces pour traiter l'épilepsie dans le SA sont le LEV, le TPM, l'ETX et la LTG. Le VPA est aussi très souvent prescrit dans ce syndrome (Pelc et al., 2008). Ces molécules sont en grande partie celles retrouvées efficaces parmi les patients de l'étude ou parmi les cas rapportés dans la littérature.

Nous tirons la conclusion de ces données qu'il existe des chevauchements cliniques concernant l'épilepsie, la DI ou les particularités de l'examen neurologique entre les patients porteurs d'un SA et ceux porteurs d'une mutation dans *GABRB3*. Cela permet de souligner le rôle du gène *GABRB3* (bien que secondaire à *UBE3A*) dans la neuro-physiologie de ce syndrome.

A noter, le SPW résulte le plus souvent de la délétion paternelle de la même région 15q11-q13 (70 % -75 % des cas). Il s'agit d'un phénotype très différent de celui de l'AS, qui associe une DI, une

hypotonie à la naissance et l'apparition de troubles du comportement alimentaire avec hyperphagie conduisant souvent à une obésité. Il existe une probabilité moindre de développer une épilepsie mais elle est liée à la délétion du gène *GABRB3* : 8/38 patients (21 %) atteints de SPW présentant des délétions larges de la région 15q11-q13 paternels, emportant le gène *GABRB3*, avaient eu des crises convulsives. Par contre, les 12 patients atteints de SPW sans délétion de *GABRB3* n'ont présenté aucune crise (Wang et al., 2005). Ces différences confirment l'implication de *GABRB3* dans l'épilepsie des patients atteints d'un SPW

## ***Annexe 2 - Mutations récurrentes dans les gènes GABRA1, GABRB2, GABRB3 et GABRG2***

Nous avons relevé les mutations récurrentes rapportées dans la littérature auxquelles nous avons associé les données apportées par ce travail pour les quatre gènes d'intérêt (un variant récurrent pour un acide aminé donné était défini par au moins trois descriptions de ce variant) :

- Pour *GABRA1*, il existe quatre localisations récurrentes : p.R112Q, p.R214C/H/S, p.M263I/T, p.T289A/P.
- Pour *GABRB2* : il n'y a qu'une localisation récurrente : p.L277S
- Pour *GABRB3* : p.V78I, p.D120N, p.R232Q/\*, p.Y302C, p.S254F, p.A305V/T. La région entre la Proline en position p.301 et l'Isoleucine en position p.306 est une région "hot spot" dans laquelle de nombreux variants ont été décrits.
- Pour *GABRG2* : il existe beaucoup de localisations récurrentes : p.Q40\*, p.R82Q (est un hot spot décrits dans de nombreux articles), p.A106T, p.R136\*, p.P282S/T, p.R323Q/W, p.K328M, p.W429\*.

Ces variants récurrents sont répartis principalement entre l'extrémité N-terminale et les deux premiers domaines transmembranaires (et pour *GABRB3*, au niveau de la boucle qui relie TM2 et TM3).

### ***Annexe 3 : Comparaison de tableaux cliniques entre des patients porteurs des mêmes mutations:***

Cinq variants identifiés chez des patients de notre étude ont déjà été rapportés dans la littérature :

- Gène *GABRA1* : le patient 2 est porteur d'un variant de novo, p.R112Q, déjà décrit chez trois patients atteints d'un syndrome de Dravet (Carvill et al., 2014 ; Koder et al, 2016). La patiente 2 a développé des crises fébriles à partir de 26 mois, elle avait une déficience intellectuelle légère mais a développé des troubles du comportement avec désinhibition et traits autistiques. Ce tableau est comparable à un cas rapporté (Koder et al, 2016) , et plus léger que deux autres cas rapportés (Carvill et al., 2014)

En ce qui concerne le variant p.M263V . Trois patients ont été décrits avec une substitution de cet acide aminé : p.M263T (Koder et al, 2016), p.M263I (Koder et al, 2016) et p.M263I (Farnaes et al, 2016). Ces trois patients ont développé un syndrome de West avant l'âge de 9 mois. Un patient était décédé à l'âge de un an, deux autres présentaient un retard de développement sévère. L'un d'entre eux présentait une microcéphalie et des mouvements athétosiques. Le patient que nous rapportons (patient 3) présentait également un phénotype sévère, une microcéphalie, et une EEP à partir de 1 mois de vie avec des crises polymorphes et des mouvements choréo-athéthosiques. Il n'a pas présenté de spasmes mais a présenté un tracé EEG hysparythmique au cours du suivi.

- Gène *GABRB2* : le variant p.K303R identifié chez le patient 9 est situé à la fin de la boucle entre TM2 et TM3 où de nombreuses mutations sont rapportées (Hamdan et al., 2017). Présente le tableau clinique d'un patient qui a présenté une EEP à partir du 1<sup>er</sup> jour de vie, avec des crises polymorphes, une microcéphalie et une DI sévère. L'imagerie cérébrale mettait en évidence des hypersignaux de la substance blanche et le VPA, le TPM et le LTG étaient efficaces. Tous ces points sont également retrouvés chez notre patient qui a présenté des crises dès le 3<sup>e</sup> jour de vie. Il existe une vraie corrélation génotype phénotype entre ces deux patients.

- Gène *GABRB3* : la mutation récurrente p.D120N a été identifiée chez l'une des patientes de notre étude (patiente 11) et a été décrite chez deux patients via le consortium Epi4K (Epi4K Consortium, 2013 ; Epi4K Consortium, 2016) : les 2 patients ont présentés une épilepsie à partir de 10 mois et 1 an avec des crises polymorphes sensibles à la fièvre, tout comme notre patiente. Un diagnostic de MAE a été posé pour l'un, un syndrome de Lennox-Gastaut pour l'autre et une GEFS+ pour notre patiente. Aucun des 3 patients n'avaient de DI sévère, leurs imageries cérébrales étaient

interprétées normales, les EEG présentaient un tracé de fond lent et la LTG était efficace pour les 3 patients.

La mutation p.A305T a également été décrite via le consortium Epi4K (Epi4K Consortium, 2016) chez un patient qui a présenté un syndrome de Lennox-Gastaut, avec des crises polymorphes qui ont débuté à 5 mois. Il a présenté une DI sévère, une microcéphalie, une surdité, une cécité et à l'IRM une atrophie corticale avec hypomyélinisation. Le patient que nous rapportons avec ce variant (patient 18) a présenté une épilepsie focale migrante avec une DI sévère, une microcéphalie et une atrophie corticale (mais il n'y a pas de notion de déficit neuro-sensoriel). Le TPM était efficace chez les deux patients.

- Gène *GABRG2* : chez plusieurs patients, dont un que l'on rapporte, a été identifiée une substitution de la Proline en p.282. Le patient 23 (p.P282A) a présenté dès la naissance une EEP pharmaco-résistante avec une DI sévère, un tracé EEG initialement normal mais rapidement très perturbé avec suppression burst et des PO généralisées. Ce patient est décédé à 18 ans des suites de son encéphalopathie épileptique. Il est rapporté le cas d'une patiente (p.P282S) qui a présenté une épilepsie sévère pharmaco-résistante également apparue à un an de vie associée à une DI sévère, à un tracé EEG perturbé avec PO généralisées (Shen et al., 2016). Les deux patients ont présenté des troubles neuro-visuels comprenant un strabisme et un nystagmus ou une absence de fixation du regard. La mutation p.P282T a également été rapportée mais sans information clinique (Lindy et al., 2018). Il s'agit d'une localisation de mutation récurrente pour le gène *GABRG2*.

## Abréviations

ADN :	acide désoxyribonucléique
BZD :	Benzodiazépines
CBZ:	Carbamazépine
DI:	déficiences intellectuelle
EEG:	électro-encéphalogramme
EEP :	encéphalopathie épileptique précoce
ETX:	Ethosuximide
FLP :	fentes labiales et/ou palatines
GABA :	acide $\gamma$ -aminobutyrique
(Récepteur) GABAA :	(récepteur au) GABA de type A
GEFS+ :	épilepsie généralisée avec crises fébriles
IRM :	imagerie par résonance magnétique
LEV:	Levetiracetam
LTG:	Lamotrigine
MAE :	épilepsie myoclonico-tonique
PNB:	Phénobarbital
TPM:	Topiramate
TSA :	trouble du spectre autistique
VGB:	Vigabatrin
VPA :	acide valproïque



## Bibliographie

Allred MJ, Mulder-Rosi J, Lingenfelter SE, Chen G, Lüscher B. Distinct gamma2 subunit domains mediate clustering and synaptic function of postsynaptic GABAA receptors and gephyrin. *J Neurosci*. 19 janv 2005;25(3):594-603.

Bamborschke D, Pergande M, Daimagüler HS, Mangold E, Dötsch J, Herkenrath P, et al. Cleft Palate as Distinguishing Feature in a Patient with *GABRB3* Epileptic Encephalopathy. *Neuropediatrics* [Internet]. 18 juill 2019.

Baulac S. Canalopathies épileptiques. *Epilepsies*. juill 2010;(3):226–229.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. avr 2010;51(4):676-85.

Bormann J. The ‘ABC’ of GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1 janv 2000;21(1):16-9.

Bosch DG, Boonstra FN, de Leeuw N, Pfundt R, Nillesen WM, de Ligt J, et al. Novel genetic causes for cerebral visual impairment. *European Journal of Human Genetics*. mai 2016;24(5):660-5.

Butler KM, Moody OA, Schuler E, Coryell J, Alexander JJ, Jenkins A, et al. De novo variants in *GABRA2* and *GABRA5* alter receptor function and contribute to early-onset epilepsy. *Brain*. 01 2018;141(8):2392-405.

Carvill GL, Weckhuysen S, McMahon JM, Hartmann C, Møller RS, Hjalgrim H, et al. *GABRA1* and *STXBP1*: Novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology*. 8 avr 2014;82(14):1245-53.

Cossette P, Lachance-Touchette P, Rouleau GA. Mutated GABAA receptor subunits in idiopathic generalized epilepsy. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, éditeurs. *Jasper’s Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th éd. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012

Couve A, Moss SJ, Pangalos MN. GABAB Receptors: A New Paradigm in G Protein Signaling. Molecular and Cellular Neuroscience. 1 oct 2000;16(4):296-312.

Dan B, Boyd SG. Angelman Syndrome Reviewed from a Neurophysiological Perspective. The *UBE3A-GABRB3* Hypothesis. Neuropediatrics. août 2003;34(04):169-76.

DeLorey TM, Handforth A, Anagnostaras SG, Homanics GE, Minassian BA, Asatourian A, et al. Mice Lacking the  $\beta 3$  Subunit of the GABAA Receptor Have the Epilepsy Phenotype and Many of the Behavioral Characteristics of Angelman Syndrome. J Neurosci. 15 oct 1998;18(20):8505-14.

DeLorey TM, Olsen RW. GABA and epileptogenesis: comparing *gabrb3* gene-deficient mice with Angelman syndrome in man. Epilepsy Research. 1 sept 1999;36(2):123-32.

Dibbens LM, Feng H-J, Richards MC, Harkin LA, Hodgson BL, Scott D, et al. *GABRD* encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. Hum Mol Genet. 1 juill 2004;13(13):1315-9.

Epi4K Consortium. De Novo Mutations in *SLC1A2* and *CACNA1A* Are Important Causes of Epileptic Encephalopathies. Am J Hum Genet. 04 2016;99(2):287-98.

Epi4K Consortium, Epilepsy Phenome/Genome Project, Allen AS, Berkovic SF, Cossette P, Delanty N, et al. De novo mutations in epileptic encephalopathies. Nature. 12 sept 2013;501(7466):217-21.

Farnaes L, Nahas SA, Chowdhury S, Nelson J, Batalov S, Dimmock DM, et al. Rapid whole-genome sequencing identifies a novel *GABRA1* variant associated with West syndrome. Cold Spring Harb Mol Case Stud [Internet]. sept 2017

Farrant M, Nusser Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA A receptors. Nat Rev Neurosci. mars 2005;6(3):215-29.

Filézio MR, Bagordakis E, de Aquino SN, Pereira Messetti AC, Martelli-Júnior H, Swerts MSO, et al. Polymorphisms in *GABRB3* and Oral Clefting in the Brazilian Population. *DNA and Cell Biology*. 25 févr 2013;32(3):125-9.

Fritschy J-M, Panzanelli P. GABAA receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system. *European Journal of Neuroscience*. 2014;39(11):1845-65.

Gibbs JW, Zhang Y-F, Ahmed HS, Coulter DA. Anticonvulsant actions of lamotrigine on spontaneous thalamocortical rhythms. *Epilepsia*. Avr 2002;43(4):342-9.

Hagiwara N, Katarova Z, Siracusa LD, Brilliant MH. Nonneuronal expression of the GABAA  $\beta$ 3 subunit gene is required for normal palate development in mice. *Developmental Biology*. 1 févr 2003;254(1):93-101.

Hamdan FF, Myers CT, Cossette P, Lemay P, Spiegelman D, Laporte AD, et al. High Rate of Recurrent De Novo Mutations in Developmental and Epileptic Encephalopathies. *The American Journal of Human Genetics*. 2 nov 2017;101(5):664-85.

Harkin LA, Bowser DN, Dibbens LM, Singh R, Phillips F, Wallace RH, et al. Truncation of the GABAA-Receptor  $\gamma$ 2 Subunit in a Family with Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus. *The American Journal of Human Genetics*. 1 févr 2002;70(2):530-6.

Hernandez CC, Gurba KN, Hu N, Macdonald RL. The *GABRA6* mutation, R46W, associated with childhood absence epilepsy, alters  $\beta$ 22 and  $\beta$ 2 GABA(A) receptor channel gating and expression. *J Physiol (Lond)*. 1 déc 2011;589(Pt 23):5857-78.

Hirose S. Mutant GABAA receptor subunits in genetic (idiopathic) epilepsy. In: *Progress in Brain Research* [Internet]. Elsevier; 2014 [cité 5 mai 2019]. p. 55-85.

Homanics GE, DeLorey TM, Firestone LL, Quinlan JJ, Handforth A, Harrison NL, et al. Mice devoid of  $\gamma$ -aminobutyrate type A receptor 3 subunit have epilepsy, cleft palate, and hypersensitive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 15 avr 1997;94(8):4143-8.

Inoue H, Kayano S, Aoki Y, Kure S, Yamada A, Hata A, et al. Association of the *GABRB3* gene with nonsyndromic oral clefts. *Cleft Palate Craniofac J*. mai 2008;45(3):261-6.

Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. GABAA receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci*. Mai 2008;9(5):331-43.

Janve VS, Hernandez CC, Verdier KM, Hu N, Macdonald RL. Epileptic encephalopathy de novo *GABRB* mutations impair  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor function: EE De Novo *GABRB* Mutations. *Ann Neurol*. mai 2016;79(5):806-25.

Johannesen K, Marini C, Pfeffer S, Møller RS, Dorn T, Niturad CE, et al. Phenotypic spectrum of *GABRA1*: From generalized epilepsies to severe epileptic encephalopathies. *Neurology*. 13 2016;87(11):1140-51.

Kang J-Q, Macdonald RL. Molecular Pathogenic Basis for *GABRG2* Mutations Associated With a Spectrum of Epilepsy Syndromes, From Generalized Absence Epilepsy to Dravet Syndrome. *JAMA Neurol*. 1 août 2016;73(8):1009-16.

Kim TH, Reid CA, Petrou S. Oxcarbazepine and its active metabolite, (S)-licarbazepine, exacerbate seizures in a mouse model of genetic generalized epilepsy. *Epilepsia*. janv 2015;56(1):e6-9.

Kodera H, Ohba C, Kato M, Maeda T, Araki K, Tajima D, et al. De novo *GABRA1* mutations in Ohtahara and West syndromes. *Epilepsia*. Avr 2016;57(4):566-73.

Lachance-Touchette P, Brown P, Meloche C, Kinirons P, Lapointe L, Lacasse H, et al. Novel  $\alpha 1$  and  $\gamma 2$  GABAA receptor subunit mutations in families with idiopathic generalized epilepsy. *Eur J Neurosci*. juill 2011;34(2):237-49.

Lien E, Våtevik AK, Østern R, Haukanes BI, Houge G. A second patient with a De Novo *GABRB1* mutation and epileptic encephalopathy. *Ann Neurol*. 2016;80(2):311-2.

Lindy AS, Stosser MB, Butler E, Downtain-Pickersgill C, Shanmugham A, Retterer K, et al. Diagnostic outcomes for genetic testing of 70 genes in 8565 patients with epilepsy and neurodevelopmental disorders. *Epilepsia*. 2018;59(5):1062-71.

Livre du Collège des Enseignants de Neurologie, éditeurs. Elsevier-Masson. 4th éd. ; 2016.

Macdonald RL, Olsen RW. GABAA Receptor Channels. *Annual Review of Neuroscience*. 1994;17(1):569-602.

Macdonald RL, Rogawski MA. Cellular effects of antiepileptic drugs. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. 2008;2:1383–1391.

Maljevic S, Møller RS, Reid CA, Pérez-Palma E, Lal D, May P, et al. Spectrum of GABAA receptor variants in epilepsy. *Curr Opin Neurol*. avr 2019;32(2):183-90.

Mamalaki C, Stephenson FA, Barnard EA. The GABAA/benzodiazepine receptor is a heterotetramer of homologous alpha and beta subunits. *EMBO J*. mars 1987;6(3):561-5.

May P, Girard S, Harrer M, Bobbili DR, Schubert J, Wolking S, et al. Rare coding variants in genes encoding GABAA receptors in genetic generalised epilepsies: an exome-based case-control study. *Lancet Neurol*. 2018;17(8):699-708.

Møller RS, Wuttke TV, Helbig I, Marini C, Johannesen KM, Brilstra EH, et al. Mutations in *GABRB3*. *Neurology*. 31 janv 2017;88(5):483-92.

Niturad CE, Lev D, Kalscheuer VM, Charzewska A, Schubert J, Lerman-Sagie T, et al. Rare *GABRA3* variants are associated with epileptic seizures, encephalopathy and dysmorphic features. *Brain*. 1 nov 2017;140(11):2879-94.

Olsen RW, Tobin AJ. Molecular biology of GABAA receptors. *The FASEB Journal*. 1 mars 1990;4(5):1469-80.

Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*. 15 mars 2014;30(6):884-6.

Site accessible en ligne : <http://wlab.ethz.ch/protter/>

Oyrer J, Maljevic S, Scheffer IE, Berkovic SF, Petrou S, Reid CA. Ion Channels in Genetic Epilepsy: From Genes and Mechanisms to Disease-Targeted Therapies. *Pharmacol Rev*. 1 janv 2018;70(1):142-73.

Papandreou A, McTague A, Trump N, Ambegaonkar G, Ngoh A, Meyer E, et al. *GABRB3* mutations: a new and emerging cause of early infantile epileptic encephalopathy. *Dev Med Child Neurol*. Avr 2016;58(4):416-20.

Pelc K, Boyd SG, Cheron G, Dan B. Epilepsy in Angelman syndrome. *Seizure*. 1 avr 2008;17(3):211-7.

Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. GABAA receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*. 30 nov 2000;101(4):815-50.

Rudolph U, Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: Novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov*. 29 juill 2011;10(9):685-97.

Russek SJ. Evolution of GABAA receptor diversity in the human genome. *Gene*. 18 févr 1999;227(2):213-22.

Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F, Bodo M, Tognon M, et al. Linkage disequilibrium between *GABRB3* gene and nonsyndromic familial cleft lip with or without cleft palate. *Hum Genet*. 1 janv 2002;110(1):15-20.

Shen D, Hernandez CC, Shen W, Hu N, Poduri A, Shiedley B, et al. De novo *GABRG2* mutations associated with epileptic encephalopathies. *Brain*. janv 2017;140(1):49-67.

Srivastava S, Cohen J, Pevsner J, Aradhya S, McKnight D, Butler E, et al. A Novel Variant in *GABRB2* Associated with Intellectual Disability and Epilepsy. *Am J Med Genet A*. nov 2014;164(11):2914-21.

Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NST, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD®): 2003 update. Human Mutation. 2003;21(6):577-81.

Štěrbová K, Vlčková M, Klement P, Neupauerová J, Staněk D, Zůnová H, et al. Neonatal Onset of Epilepsy of Infancy with Migrating Focal Seizures Associated with a Novel *GABRB3* Variant in Monozygotic Twins. Neuropediatrics. juin 2018;49(3):204-8.

Tan HO, Reid CA, Single FN, Davies PJ, Chiu C, Murphy S, et al. Reduced cortical inhibition in a mouse model of familial childhood absence epilepsy. Proc Natl Acad Sci USA. 30 oct 2007;104(44):17536-41.

Tanaka M, Olsen RW, Medina MT, Schwartz E, Alonso ME, Duron RM, et al. Hyperglycosylation and Reduced GABA Currents of Mutated *GABRB3* Polypeptide in Remitting Childhood Absence Epilepsy. Am J Hum Genet. 6 juin 2008;82(6):1249-61.

Thibert RL, Larson AM, Hsieh DT, Raby AR, Thiele EA. Neurologic Manifestations of Angelman Syndrome. Pediatric Neurology. 1 avr 2013;48(4):271-9.

Vieira AR, Howe A, Murray JC. Studies of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Type A Receptor  $\beta 3$  (*GABRB3*) and Glutamic Acid Decarboxylase 67 (*GAD67*) with Oral Clefts. Am J Med Genet A. 1 nov 2008;146A(21):2828-30.

Wang JF, Sun X, Chen B, Young LT. Lamotrigine increases gene expression of GABA-A receptor beta3 subunit in primary cultured rat hippocampus cells. Neuropsychopharmacology. avr 2002;26(4):415-21.

Wang P-J, Hou J-W, Sue W-C, Lee W-T. Electroclinical characteristics of seizures—comparing Prader-Willi syndrome with Angelman syndrome. Brain and Development. 1 mars 2005;27(2):101-7.

Williams CA, Beaudet AL, Clayton-Smith J, Knoll JH, Kyllerman M, Laan LA, et al. Angelman syndrome 2005: Updated consensus for diagnostic criteria. American Journal of Medical Genetics Part A. 2006;140A(5):413-8.

Windpassinger C, Kroisel PM, Wagner K, Petek E. The human gamma-aminobutyric acid A receptor delta (*GABRD*) gene: molecular characterisation and tissue-specific expression. *Gene*. 12 juin 2002;292(1-2):25-31.

Zou F, McWalter K, Schmidt L, Decker A, Picker JD, Lincoln S, et al. Expanding the phenotypic spectrum of *GABRG2* variants: A recurrent *GABRG2* missense variant associated with a severe phenotype. *J Neurogenet*. 2017;31(1-2):30-6.



# SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans **aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions**. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas **usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité**.

**J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.**

Je ne tromperai **jamais leur confiance** et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

**Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.** Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

**Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.**

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

**Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.** Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

**J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.**

**Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.**



**Résumé : «Etude clinique et moléculaire de patients porteurs de mutations  
dans des gènes codant pour des sous-unités du récepteur au GABA de type A.»**

Le GABA, est le neurotransmetteur inhibiteur le plus abondant dans le cerveau des mammifères. Le récepteur au GABA de type A (GABAA) est un canal d'ions chlorure ligand dépendant qui joue un rôle central dans la régulation de l'excitabilité neuronale. Il est formé par l'association de 5 sous-unités transmembranaires.

Nous rapportons 27 patients chez qui nous avons identifié 23 mutations dans les gènes *GABRA1*, *GABRB2*, *GABRB3* et *GABRG2*. Ces gènes codent pour les sous-unités  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  et  $\gamma 2$  du récepteur au GABAA, ce sont les sous-unités les plus répandues dans le cerveau humain. Les mutations sont pour la plupart faux-sens (n=21), trois sont héritées, et une est à l'état homozygote dans une fratrie de 3 patients. Les sous-unités sont composées d'une longue extrémité N-terminale extracellulaire et de quatre domaines transmembranaires. Les variants se situent en majorité au niveau de trois régions : l'extrémité N-terminale, le deuxième domaine transmembranaire et la boucle extracellulaire entre le deuxième et le troisième domaine transmembranaire. Tous les patients ont présenté une déficience intellectuelle (DI) de sévérité variable. Tous sauf un ont développé une épilepsie infantile : les premières crises d'épilepsie sont apparues à l'âge médian de 6,5 mois (entre un jour de vie et 4 ans et demi), les crises étaient de types variés et souvent thermo-sensibles. Les syndromes épileptiques diagnostiqués étaient principalement des encéphalopathies épileptiques précoces et des épilepsies généralisées avec crises fébriles. Les tracés EEG étaient majoritairement désorganisés. Certains traitements anti-épileptiques étaient retrouvés efficaces de façon récurrente. D'autre part, les patients présentaient des mouvements anormaux, une ataxie, une hypotonie, une microcéphalie ou une macrocéphalie, des symptômes évocateurs de troubles du spectre autistique et des troubles neuro-visuels. Quatre patients avec mutation dans le gène *GABRB3* présentaient des traits dysmorphiques et/ou des malformations au niveau de l'étage inférieur du visage et une patiente avait une fente vélo-palatine.

Cette étude est la plus importante en termes de nombre de patients décrits avec des mutations dans 4 sous-unités différentes. Elle a l'originalité de pouvoir comparer les tableaux cliniques en fonction des sous-unités impliquées : nous ne trouvons pas de différence clinique particulière, hormis l'implication de la sous-unité  $\beta 3$  (et probablement  $\alpha 3$ ) dans le développement du palais et de l'étage inférieur du visage. En termes de traitements anti-épileptiques, certaines molécules efficaces favorisent l'action du GABA, elles pourraient être prescrites en priorité en cas de diagnostic moléculaire confirmé. Enfin, nous mettons en évidence une corrélation génotype phénotype jamais décrite jusqu'alors liée à la localisation des variants dans les sous-unités : les patients porteurs d'un variant dans l'extrémité N-terminale ont une épilepsie et une DI significativement moins sévères que les autres. Ces résultats mériteraient d'être confirmés en analysant un plus grand nombre de patients.

**Mots clés :** GABA ; Récepteur GABA type A ; corrélation génotype phénotype ; déficience intellectuelle ; épilepsie ; dysmorphie; médecine personnalisée.