

Université de Montréal

**Utilisation du séquençage à haut débit dans l'identification
des gènes prédisposant à l'épilepsie et aux syndromes
neurocutanés**

par

Maxime Cadieux-Dion

Département de physiologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de PhD
en sciences neurologiques

avril, 2016

© Maxime Cadieux-Dion, 2016

Résumé

L'épilepsie est une maladie neurologique fréquente qui touche 1-3 % de la population. Elle est caractérisée par l'apparition de symptômes neurologiques transitoires causés par l'activité neuronale anormale excessive et synchronisée dans le cerveau – la crise épileptique. La maladie peut être causée par des anomalies morphologiques, des altérations des niveaux de certaines molécules biochimiques, une réponse immunitaire excessive au niveau du cerveau ou par une infection. Celles-ci ne sont pas mutuellement exclusives et elles peuvent être causées par des anomalies génétiques. Ainsi, l'épilepsie causée par des mutations génétiques peut faire partie d'une symptomatologie plus complexe incluant plusieurs maladies monogéniques comme les épilepsies progressives myocloniques et les syndromes neurocutanés.

Le premier objectif de cette thèse est d'utiliser les méthodes modernes de séquençage afin d'identifier les causes génétiques des formes rares d'épilepsies et des syndromes neurocutanés. Dans un premier temps, nous avons étudié le syndrome de Kufs, une forme adulte de céréoïde-lipofuscinose neuronale, appartenant au groupe des épilepsies myocloniques progressives. L'étude de deux familles américaines et d'un cas sporadique nous a permis d'identifier deux mutations causatives (p.L116del, p.L115R) dans le gène *DNAJC5*. Le gène *DNAJC5* code pour la CSP α («cystein string protein»), une protéine présynaptique impliquée dans la neurodégénérescence. Dans un deuxième temps, en utilisant la même méthodologie, nous avons trouvé la mutation causative du syndrome de Giroux-Barbeau, un syndrome neurocutané caractérisé par une ataxie spinocérébelleuse et une érythrokratodermie *variabilis*. Ainsi, suite à l'étude d'une grande famille canadienne-française, nous avons découvert la mutation p.L168F dans le gène *ELOVLA*. Ce gène code pour une enzyme impliquée dans le métabolisme des acides gras à très longue chaîne. Ceux-ci participent à plusieurs processus biochimiques importants comme la bêta-oxydation dans le peroxyosome et le maintien de la barrière épidermique.

Le deuxième objectif de cette thèse est d'utiliser le séquençage de l'exome dans un contexte de diagnostic génétique. À cette fin, nous avons étudié une grande famille avec des lésions cutanées au niveau des extrémités suite à l'exposition au froid. Initialement diagnostiqués comme une

forme primaire de cryofibrinogénémie, nos travaux ont montré que les patients de cette famille présentaient plutôt une forme atypique du lupus érythémateux avec engelure. En effet, la ressemblance phénotypique ainsi que la présence de la mutation p.D18N dans le gène *TREX1* ont mené à l'établissement de ce diagnostic. Cette étude montre le rôle du séquençage de l'exome dans le diagnostic des maladies rares en plus d'élargir le spectre des pathologies associées au gène *TREX1*.

Le dernier objectif de cet ouvrage consiste à utiliser le séquençage à haut débit dans la découverte des mécanismes prédisposant aux épilepsies génétiques généralisées (GGE). Ainsi, pour cette étude, nous avons recruté 7 grandes familles atteintes de GGE. Notre étude a montré que les variations identifiées dans les gènes *GLI2*, *MBD5*, *CELSR2*, *CELSR3*, *TNIK* et *CACNA1G* semblent participer à l'étiologie génétique de nos familles. Toutefois, en raison du nombre de variations identifiées, d'autres facteurs pourraient contribuer au phénotype épileptique. D'autres études de séquençage à grande échelle seront nécessaires afin de valider l'implication de ces gènes dans l'épilepsie.

Mots-clés : Épilepsie, génétique, étude de famille, séquençage à haut débit, syndrome de Kufs, céréoïde-lipofuscinoïse neuronale (NCL), syndrome de Giroux-Barbeau, ataxie spinocérébelleuse (SCA), érythrokratodermie variabilis (EKV), analyses de liaison, diagnostic génétique.

Abstract

Epilepsy is a common neurological disorder affecting 1-3 % of the population. It is characterized by transitory neurological symptoms caused by excessive or synchronized abnormal neuronal activity—a seizure. Many factors can contribute to the etiology of epilepsy. It can be caused by genetic factors, morphological abnormalities, altered levels of biochemical molecules, excessive immune response in the brain, or by infections. Importantly, these factors are not mutually exclusive and can be caused by genetic aberrations. Thus, epilepsy associated with genetic mutations can be part of a complex symptomatology including several monogenic disorders such as progressive myoclonus epilepsies and neurocutaneous syndromes.

The first objective of this thesis is to use modern sequencing methods in order to identify genetic causes of rare forms of epilepsies and neurocutaneous syndrome. Firstly, we studied Kufs disease, an adult form of neuronal ceroid lipofuscinosis, part of the progressive myoclonus epilepsies. The study of two American families and one sporadic case led us to identify two causative mutations (p.L116del, p.L115R) in the gene *DNAJC5*. Other families with this rare but fatal syndrome were reported with mutations in that gene, corroborating our findings. The gene *DNAJC5* encodes for the cysteine string protein alpha (CSP α), a presynaptic protein involved in neurodegeneration. Secondly, using the same methods, we discovered the causative mutation for the Giroux-Barbeau syndrome, a neurocutaneous syndrome characterized by spinocerebellar ataxia and erythrokeratoderma *variabilis*. Thus, following the study of a large French Canadian family, we found the p.L168F mutation in the gene *ELOVL4*. This gene encodes an enzyme involved in the metabolism of very long chain fatty acid. These fatty acids participate in a wide variety of physiological functions, including skin barrier formation and peroxisome β -oxidation.

The second objective of this work is to use whole exome sequencing in the context of molecular diagnostics. To achieve that, we studied a large family presenting skin lesions at the extremities following exposure to cold. Initially diagnosed as a primary form of cryofibrinogenemia, our work showed that these patients were affected with an atypical form of chilblain lupus. In turn, the phenotypical resemblance as well as the presence of the p.D18N mutation in the gene *TREX1*

led to that new diagnosis. This study shows the role of whole exome sequencing in the diagnosis of rare disease and widen the phenotypic spectrum associated with *TREX1* mutations.

The last objective of this research is to apply whole exome sequencing in the discovery of genetic mechanisms predisposing to genetic generalized epilepsy (GGE). For this study, we recruited 7 large families with GGE. We showed that variants found in the genes *GLI2*, *MBD5*, *CELSR2*, *CELSR3*, *TNIK* and *CACNA1G* could participate in the genetic etiology in our families. However, because of the numbers of variants identified, other factors could contribute to the epileptic phenotype in our families. Other large scale studies are necessary in order to validate the implication of those genes in epilepsy.

Keywords : Epilepsy, genetic, family study, high throughput sequencing, Kufs disease, Giroux-Barbeau syndrome, neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL), spinocerebellar ataxia (SCA), erythrokeratoderma variabilis (EKV), linkage analysis, genetic diagnosis.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles et abréviations	xi
Remerciements	iii
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 L'épilepsie : Présentation clinique.....	1
1.1.1 Définition	1
1.1.2 Manifestations cliniques des crises épileptiques.....	2
1.1.3 Diagnostic	5
1.1.4 Syndromes électro-cliniques.....	5
1.1.5 Étiologie.....	7
1.1.6 Traitements	8
1.2 Maladies monogéniques associées à l'épilepsie	8
1.2.1 Les épilepsies génétiques.....	9
1.2.2 Les épilepsies myocloniques progressives.....	11
1.2.3 Les syndromes neurocutanés	15
1.3 Étiologie génétique des épilepsies monogéniques.....	17
1.3.1 Les études de liaison	18
1.3.2 Mosaïsme cellulaire et mutation <i>de novo</i>	29
1.3.3 Autres mécanismes génétiques	29
1.4 Séquençage à haut débit et étude génétique.....	31
1.4.1 Le séquençage à haut débit	31
1.4.2 L'étude des maladies monogéniques	32

1.4.3 Diagnostic génétique.....	32
1.5 Problématiques.....	33
Chapitre 2 : Des mutations récurrentes dans le gène <i>DNAJC5</i> causent le syndrome de Kufs à transmission autosomique dominante.....	34
2.1 Présentation de l'article.....	34
2.1.1 Contribution des auteurs	35
2.2 Recurrent mutations in <i>DNAJC5</i> cause autosomal dominant Kufs disease	35
2.2.1 Abstract.....	36
2.2.2 Introduction.....	36
2.2.3 Materials and Methods.....	37
2.2.4 Results.....	38
2.2.5 Discussion	40
2.2.6 Acknowledgments.....	42
2.2.7 Figures.....	43
2.2.8 Tables.....	47
Chapitre 3 : Une mutation dans le gène <i>ELOVL4</i> cause un syndrome neurocutané: le syndrome de Giroux-Barbeau	48
3.1 Présentation de l'article.....	48
3.1.1 Contributions des auteurs.....	48
3.2 Expanding the clinical phenotype associated with <i>ELOVL4</i> mutation: study of a large French-Canadian family with autosomal dominant spinocerebellar ataxia and erythrokeratoderma (SCA34).	49
3.2.1 Abstract.....	49
3.2.2 Introduction.....	50
3.2.3 Materials and Methods.....	51
3.2.4 Results.....	53
3.2.5 Discussion	55
3.2.6 Conclusions.....	57
3.2.7 Acknowledgments.....	57
3.2.8 Figures.....	59

3.2.9 Tables.....	62
Chapitre 4 : Utilisation du WES dans le diagnostic génétique des maladies rares :	
L'étude d'une famille avec une mutation dans le gène <i>TREX1</i>	64
4.1 Présentation de l'article.....	64
4.1.1 Contribution des auteurs	64
4.2 Clinical use of exome sequencing for diagnosis of Mendelian disorders : study of a large family with <i>TREX1</i> mutation.	65
4.2.1 Abstract.....	65
4.2.2 Introduction.....	66
4.2.3 Index cases	67
4.2.4 Methods.....	68
4.2.5 Results.....	69
4.2.6 Discussion.....	70
4.2.7 Conclusions.....	73
4.2.8 Figures.....	74
4.2.9 Tables.....	76
Chapitre 5 : Séquençage à haut débit de 7 familles avec épilepsie génétique généralisée	77
5.1 Présentation de l'article.....	77
5.1.1 Contribution des auteurs	77
5.2 Exome sequencing in large multiplex families with genetic generalized epilepsy	78
5.2.1 Abstract.....	78
5.2.2 Introduction.....	78
5.2.3 Material and methods.....	80
5.2.4 Results.....	81
5.2.5 Discussion.....	84
5.2.6 Conclusions.....	86
3.2.7 Acknowledgments.....	86
5.2.8 Figures.....	87
5.2.9 Tables.....	89
Chapitre 6 : Discussion et perspectives.....	92

6.1 Succès du WES: l'étude des maladies rares	92
6.1.1 Retour sur les travaux	92
6.1.2 Validation des découvertes génétiques	95
6.1.3 Impact des découvertes sur les maladies neurodégénératives	96
6.1.4 Impact des découvertes sur le diagnostic génétique	99
6.1.5 L'étude des maladies rares : la suite	100
6.2 Limites du WES : Étude génétique des épilepsies génétiques généralisées	101
6.2.1 Retour sur les travaux	102
6.2.2 Les études de familles d'épilepsie génétique.....	103
6.2.3 Limitations du WES.....	104
6.2.4 Perspectives : modèle oligogénique.....	107
Chapitre 7 : Conclusions	107
Références.....	109
Annexe 1 : Curriculum vitae.....	i
Annexe 2 : SYN2 is an autism predisposing gene: loss-of-function mutations alter synaptic vesicle cycling and axon outgrowth.....	iii
Annexe 3 : Endo-MitoEGFP mice: a novel transgenic mouse with fluorescently marked mitochondria in microvascular endothelial cells	iv
Annexe 4 : Diagnosis and misdiagnosis of adult neuronal ceroid lipofuscinosis (Kufs disease)	v

Liste des tableaux

Tableau 1.1.2.1 : Classification des crises épileptiques	4
Tableau 1.1.4.1 : Classification des syndromes épileptiques par l'âge du début des symptômes	6
Tableau 1.2.2.1 : Manifestations cliniques des épilepsies myocloniques progressives	13
Tableau 1.3.1.1.1 : Tableau des principaux gènes codant les canaux ioniques associés à l'épilepsie.....	21
Tableau 1.3.1.1.2 : Tableau des autres principaux gènes associés à l'épilepsie.....	22
Tableau 1.3.1.2.1 : Causes génétiques des épilepsies progressives myocloniques	24
Tableau 1.3.1.2.2 : Causes génétiques des NCLs.....	25
Tableau 1.3.1.2.3 : Corrélation génotype-phénotype dans les NCLs	26
Tableau 1.3.1.2.4 : Autres gènes associés aux NCLs	27
Tableau 2.2.8.1 : Statistiques détaillées du séquençage de nouvelle génération.....	47
Tableau 3.2.9.1 : Statistiques détaillées du séquençage de nouvelle generation.....	62
Tableau 3.2.9.2 : Tableau des manifestations cliniques des patients de la famille	63
Tableau 4.2.9.1 : Tableau des manifestations cliniques de 19 individus porteurs de la mutation p.D18N dans le gène <i>TREX1</i>	76
Tableau 5.2.9.1 : Variants retrouvés dans les familles d'épilepsie génétique généralisée avec un bon profil de ségrégation	89
Tableau 5.2.9.2 : Variants retrouvés dans les familles d'épilepsie génétique généralisée avec une coségrégation partielle	90
Tableau 5.2.9.3 : Liste des gènes codant pour les canaux ioniques	91

Liste des figures

Figure 2.2.7.1 : Pedigree des familles américaines.....	43
Figure 2.2.7.2 : La mutation p.L116del dans le gène <i>DNAJC5</i> retrouvée dans deux familles américaines.	44
Figure 2.2.7.3 : Graphique montrant les scores LOD multipoint.	45
Figure 2.2.7.4 : Haplotype de la maladie dans les familles Kufs1 et Kufs2.....	46
Figure 3.2.8.1 : Identification et caractérisation d'une mutation faux-sens dans le gène <i>ELOVL4</i>	59
Figure 3.2.8.2 : Phénotype clinique de la famille Canadienne-française	60
Figure 3.2.8.3 : Intervalle contenant la variation causative associée au syndrome de Giroux-Barbeau	61
Figure 4.2.8.1 : La mutation p.D18N dans le gène <i>TREX1</i> retrouvée dans une famille canadienne-française.....	74
Figure 4.2.8.2 : Chromatogramme de la mutation p.D18N retrouvée dans le gène <i>TREX1</i>	75
Figure 5.2.8.1 : Profil de ségrégation des variations trouvées dans les familles d'épilepsie génétique généralisée	87

Liste des sigles et abréviations

ACMG : Collège Américain des Médecins Généticiens

ADLTE : Épilepsie du lobe temporal latérale à transmission autosomique dominante

ADNLFE : Épilepsie nocturne du lobe frontal à transmission autosomique dominante

ADPEAD : Épilepsie partielle autosomique dominante avec composante auditive

AED : Médicament anti-épileptique

AE : Absence épileptique

AGS : Syndrome d'Aicardi-Goutières

BIFS : Épilepsie familiale bénigne du nourrisson

BNFS : Épilepsie familiale bénigne néonatale

BNIFS : Épilepsie familiale bénigne néonatale/nourrisson

CAE : Épilepsie avec absence de l'enfant

CGH : Hybridation génomique comparative

CHLE : Lupus érythémateux avec engelure

CNV : Variation du nombre de copie d'ADN

CT : Tomodensitométrie

EEG : Électroencéphalogramme

EG : Épilepsie génétique

FALD : Fatty aldehyde dehydrogenase

FFEVF : Épilepsie partielle familiale à foyer variable

FS : Crise fébrile

GEFS+ : Épilepsie généralisée avec crises fébriles

GGE : Épilepsie génétique généralisée

GTCS : Crise généralisée tonique clonique

GWAS : Étude d'association du génome entier

HTS : Séquençage à haut débit

ICEGTC : Épilepsie réfractaire de l'enfance avec crises généralisées toniques cloniques

ILAE : Ligue internationale contre l'épilepsie

JAE : Épilepsie avec absence juvénile

JME : Épilepsie myoclonique juvénile

MRI : Imagerie par résonance magnétique

NCL : Céroïde-lipofuscine neuronale

NF1 : Neurofibromatose de type 1

PCR : Réaction de polymérase en chaîne

PET : Tomographie par émission de positron

PME : Épilepsie progressive myoclonique

RVCL : Vasculopathie rétinienne avec leucodystrophie cérébrale

SE : Syndrome électroclinique

SLE : Lupus érythémateux systémique

SMEI : Épilepsie myoclonique sévère du nourrisson

SNC : Syndrome neurocutané

SNP : Polymorphisme nucléotidique simple

SNV : Variation nucléotidique simple

SWS : Syndrome de Sturge-Weber

TC : Tonique clonique

TS : Sclérose tubéreuse

WES : Séquençage de l'exome

WGS : Séquençage du génome entier

À moi...

Parce qu'un doctorat c'est, avant tout, pour soi-même

Remerciements

La rédaction d'une thèse de doctorat est le point culminant de plusieurs années de travail acharné. C'est aussi une expérience enrichissante qui permet de mettre en perspective toutes ces années. Bien sûr, je n'aurais pu y arriver tout seul.

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, Patrick Cossette, qui m'a toujours donné les moyens de mes ambitions. Merci d'avoir cru en moi. Merci de m'avoir confié des responsabilités qui, parfois, dépassaient mon statut d'étudiant au doctorat. Je garde de bons souvenirs de mon passage dans ton laboratoire.

Un gros merci aux femmes du laboratoire. J'ai pu côtoyer des personnes extraordinaires qui m'ont supporté durant toutes ces années. Que ce soit professionnellement ou personnellement, vous avez su être à mes côtés dans les joies et les pleurs. Je garde de bons souvenirs du temps passé avec vous. Au fil du temps, nous sommes devenus bien plus que des collègues, nous sommes devenus des amis. Je me considère chanceux de vous avoir dans ma vie. Caroline Meloche, Caroline Martin et Pam, Merci. Je vous aime.

Quelques mots pour celle que j'ai eu le malheur d'appeler « madame » à ma première journée dans le laboratoire. Travailler à tes côtés pendant ces années m'a permis de découvrir une femme généreuse, aimante et joviale. Sans ta présence, je n'écrirais peut-être pas ces lignes. Je suis chanceux de t'avoir comme amie. J'espère que notre amitié se poursuivra dans le futur. Merci!

Un merci tout spécial à Simon Girard. Sans ton aide, je n'aurais peut-être jamais quitté le « wet lab ». Tu as été pour moi un mentor et je ne serais pas ici sans ton savoir-faire! Merci pour tes conseils, ta patience et ton franc parlé. Nous avons développé une belle relation d'amitié et j'espère qu'elle survivra à la distance et au temps.

Évidemment, au fil des années, d'autres personnes se sont jointes au laboratoire. Je voudrais remercier Véronique, Marilyse, Maude, Sylvia, Brianna et Ana pour leur aide et leur appui.

Merci aussi aux membres du laboratoire de Guy Rouleau. J'ai été heureux de travailler avec vous et j'espère que nos chemins se croiseront dans le futur.

Pendant toutes ces années, j'ai côtoyé plusieurs autres étudiants avec qui j'ai passé de très bons moments en dehors du laboratoire, notamment sur les terrasses de Montréal. Merci à Martine, Anaïs, Marc-André, Raphaël, Vi, Alexandra, Arnaud, Loïc, Catherine-Alexandra et tous ceux que j'oublie. Votre présence a certainement agrémenté toutes ces années.

Un merci tout particulier à ma famille. Ils ont su me supporter dans les moments difficiles. Merci de m'avoir permis de fréquenter les meilleures écoles et d'avoir fait de mon éducation votre priorité. Merci de m'avoir encouragé à continuer, même dans les moments les plus durs. J'en serai toujours reconnaissant. Maman, Papa, et ma petite sœur Chanel, merci!

Finalement, je voudrais remercier la femme que j'aime, Brianna. Merci de ton soutien tout au long de l'écriture de cette thèse. Merci de m'avoir supporté dans les moments les plus difficiles. Merci de m'avoir *enduré* quand le stress prenait le dessus. Merci pour ta confiance. Merci de croire en moi. Merci d'être à mes côtés, chaque jour. Simplement, merci.

Maxime

Chapitre 1 : Introduction

L'épilepsie est une maladie neurologique fréquente qui touche 1-3 % de la population. Elle est caractérisée par l'apparition de symptômes neurologiques transitoires causés par l'activité neuronale anormale excessive et synchronisée dans le cerveau – la crise épileptique. Aujourd'hui, selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé, l'épilepsie touche plus de 50 millions de personnes ce qui en fait une des maladies neurologiques les plus fréquentes. Elle touche sans distinction les hommes et les femmes de tous âges, de toutes classes sociales ainsi que de toutes les nations du monde. La maladie peut être causée par des anomalies morphologiques, des altérations des niveaux de certaines molécules biochimiques, une réponse immunitaire excessive au niveau du cerveau ou par une infection. Celles-ci ne sont pas mutuellement exclusives et elles peuvent être causées par des anomalies génétiques. Ainsi, l'épilepsie causée par des mutations génétiques peut faire partie d'une symptomatologie plus complexe incluant plusieurs maladies monogéniques comme les épilepsies progressives myocloniques et les syndromes neurocutanés. Dans cette section, une description des principales manifestations cliniques ainsi que des causes génétiques de ces maladies seront présentées. Les différentes approches utilisées dans les études génétiques seront également brièvement décrites afin de faire le lien avec le sujet : l'utilisation du séquençage à haut débit dans l'identification des gènes prédisposant à l'épilepsie et aux syndromes neurocutanés.

1.1 L'épilepsie : Présentation clinique

1.1.1 Définition

La première définition de l'épilepsie a été publiée en 1932 par John Hughlings Jackson. À l'époque, elle était décrite comme « une condition où des décharges transitoires excessives surviennent soudainement dans une région du cortex »¹. Presque 100 ans plus tard, la Ligue Internationale contre l'Épilepsie (ILAE) définit la crise épileptique comme « l'apparition de symptômes transitoires causés par l'activité neuronale anormale excessive et synchronisée dans le cerveau »². Pour sa part, l'épilepsie est définie comme étant un « désordre du cerveau

caractérisé par une prédisposition à générer des crises épileptiques et par les conséquences neurobiologiques, cognitives, et psychosociales de cette condition ». La définition de l'épilepsie requiert la présence d'au moins une crise épileptique ². Cliniquement, l'ILAE définit l'épilepsie par l'une des trois conditions suivantes ³ :

- 1) « Au moins deux crises non provoquées ou réflexes dans un intervalle supérieur à 24h
- 2) Une crise non provoquée ou réflexe avec une probabilité similaire au risque général de récurrence (au moins 60%) après deux crises, survenant sur une période de 10 ans
- 3) Diagnostic d'un syndrome épileptique »

L'épilepsie est considérée comme résolue si l'une des 2 conditions suivantes est remplie ³ :

- 1) Pour les syndromes dépendant de l'âge : l'âge du patient rend le diagnostic de son syndrome inapplicable.
- 2) Les patients n'ayant eu aucune crise dans les 10 dernières années incluant 5 ans sans traitement au médicament antiépileptique (AED).

Bien que la définition de l'épilepsie ait évolué au fil du temps, et qu'elle évoluera très certainement dans les années à venir, celle décrite ci-dessus sera utilisée dans l'ensemble des travaux de cette thèse.

1.1.2 Manifestations cliniques des crises épileptiques

La caractérisation des crises épileptiques est un point important lors de l'établissement du diagnostic d'épilepsie (**section 1.1.3**). On retrouve deux types majeurs de crises : les crises généralisées et les crises partielles. La distinction se fait principalement au niveau des structures cérébrales impliquées au moment de la crise. En effet, les crises généralisées « prennent origine dans un réseau neuronal et engagent d'autres réseaux neuronaux distribués bilatéralement, comme les structures corticales et sous-corticales, sans nécessairement inclure tout le cortex. Même si l'apparition des crises peut sembler localisée, la latéralisation ainsi que la localisation n'est pas constante d'une crise à l'autre » ⁴. Il existe plusieurs types de crises généralisées, la

plus commune étant la crise tonique-clonique. On y fait généralement référence lorsqu'on décrit une crise convulsive.

Les crises partielles, pour leur part, « prennent origine des réseaux neuronaux situés dans un seul hémisphère, dans les structures sous-corticales. Contrairement aux crises généralisées, un mode de propagation vers les autres réseaux neuronaux est respecté d'une crise à l'autre. Celui-ci peut inclure, entre autres, les structures de l'hémisphère contralatéral »⁴. Les manifestations cliniques associées aux crises partielles sont liées à la localisation du foyer épileptique. Par exemple, une crise partielle peut débuter par des spasmes des muscles de la main droite, et progresser en mouvement clonique de tout le bras droit. Les crises partielles sont aussi généralement associées à des sensations anormales comme la peur, une lumière ou une odeur désagréable survenant tout juste avant la crise – les auras⁵. Bien qu'il n'existe plus de distinction dans les types de crises partielles, « il est important de reconnaître que les altérations de la conscience ou autres troubles cognitifs, la localisation et la progression de la crise peuvent être d'une grande importance dans l'évaluation d'un patient »⁴. Ainsi, il existe 4 types de crises épileptiques généralisées (**tableau 1.1.2.1**) :

1) La crise *tonique-clonique* (TC)(ou convulsive) survient en deux temps. Tout d'abord, pendant la phase *tonique*, les patients présentent une augmentation du tonus musculaire dans les membres inférieurs et supérieurs. Cette phase dure généralement de quelques secondes à une minute. Par la suite, des contractions musculaires rythmiques brèves surviennent – la crise *clonique*. Bien que d'autres combinaisons soient possibles, la séquence décrite ci-dessus est généralement respectée. Les crises *toniques* et *cloniques* peuvent également survenir de manière indépendante.

2) Les *absences* sont caractérisées par une altération de la conscience soudaine de sévérité variable. Les clonies des paupières, de la tête, des sourcils et du menton sont aussi caractéristiques de cette crise. Contrairement à la crise convulsive, les membres sont rarement touchés. Dans la forme atypique, la perte de conscience est moins soudaine et l'on observe fréquemment une perte du tonus musculaire de la tête, du tronc ou des membres. Dans certains cas, l'altération de la conscience est légère et n'empêche pas les patients de poursuivre leurs

activités. Toutefois, celles-ci peuvent être ralenties ou erratiques. De plus, les absences peuvent être associées à des contractions musculaires rythmiques brèves. Lorsque celles-ci consistent en l'abduction des épaules et des bras, on nomme la crise *myoclonique avec absence*. Toutefois, on la nomme *absence avec myoclonies palpébrales* lorsque les muscles des paupières sont touchés.

3) La crise *myoclonique* est une contraction musculaire brève qui dure généralement quelques millisecondes. De façon générale, elle touche les membres supérieurs et le haut du corps. Elle peut survenir seule ou en série, dans lequel cas elle peut progresser en crise tonique clonique.

4) La crise *atonique* est caractérisée par une perte du tonus musculaire des muscles de la tête, du tronc ou des membres. Elle peut aussi induire une chute.

Tableau 1.1.2.1 : Classification des crises épileptiques

1. Crises généralisées
 - a. Toniques, cloniques, toniques-cloniques
 - b. Absences
 - i. Typiques
 - ii. Atypiques
 - iii. Absences avec caractéristiques spéciales
 1. Absences myocloniques
 2. Myoclonies palpébrales
 - c. Myocloniques
 - i. Myocloniques – atoniques
 - ii. Myocloniques – toniques
 - d. Atoniques
2. Crises partielles
3. Spasmes épileptiques

* Adapté de ⁶

1.1.3 Diagnostic

Le diagnostic de l'épilepsie est basé sur l'évaluation clinique des patients. Lors de celle-ci, l'historique médical auprès du patient (et de la famille), les conditions médicales existantes ainsi que la prise courante de médicaments sont considérés. De plus, les informations fournies par des témoins de la crise peuvent être très utiles au diagnostic (type, durée, éléments précédents la crise, etc.). Par la suite, plusieurs tests sont effectués et chacun d'eux permet d'améliorer la prise en charge du patient (imagerie par résonance magnétique (MRI), tomographie par émission de positron (PET), électroencéphalogramme (EEG), tomодensitométrie (CT)). Le test le plus important est l'EEG. Celui-ci mesure l'activité électrique du cerveau, et détecte la localisation ainsi que les signes caractéristiques des différents types de crises épileptiques. De manière complémentaire, les examens d'imageries permettent d'identifier des malformations cérébrales qui pourraient être à l'origine de la pathologie observée. À l'heure actuelle, l'ILAE recommande que pour chaque patient, le type de crise (**tableau 1.1.2.1**), le syndrome électro-clinique (SE) (**section 1.1.4**) et l'étiologie (**section 1.1.5**) soient caractérisés ⁶.

1.1.4 Syndromes électro-cliniques

Les SE représentent la « combinaison complexe de manifestations cliniques qui, ensemble, définissent un désordre distinct. Ainsi, en tenant compte de l'âge du début des symptômes, les traits de l'EEG ainsi que le type de crises, il est possible de diagnostiquer le SE. L'exactitude de ce dernier est cruciale pour la prise en charge, le traitement et le pronostic du patient ». En 2010, la classification des SE a été révisée par L'ILAE afin d'intégrer les nouvelles connaissances acquises en neurosciences (neuro-imagerie, génétique, et biologie moléculaire)

⁴. Une liste détaillée de tous les SE est présentée dans le **tableau 1.1.4.1**

Tableau 1.1.4.1 : Classification des syndromes épileptiques par l'âge du début des symptômes

- 1) Période néonatale
 - a. Épilepsie néonatale familiale bénigne
 - b. Encéphalopathie myoclonique précoce
 - c. Syndrome d'Ohtahara
- 2) Nourrisson
 - a. Épilepsie du nourrisson avec crises partielles migratoires
 - b. Syndrome de West
 - c. Épilepsie myoclonique du nourrisson
 - d. Épilepsie bénigne du nourrisson
 - e. Épilepsie bénigne du nourrisson familiale
 - f. Syndrome de Dravet
 - g. Encéphalopathie myoclonique dans les syndromes non progressifs
- 3) Enfance
 - a. Crises fébriles plus
 - b. Syndrome de Panayiotopoulos
 - c. Épilepsie avec crises myocloniques atoniques
 - d. Épilepsie bénigne avec décharges centrotemporales
 - e. Épilepsie nocturne du lobe frontal autosomique dominante
 - f. Épilepsie du lobe occipital à début tardif (type Gastaut)
 - g. Épilepsie avec absence myoclonique
 - h. Syndrome de Lennox Gastaut
 - i. Encéphalopathie épileptique avec pointes ondes pendant le sommeil
 - j. Syndrome de Landau Kleffner
 - k. Épilepsie absence de l'enfant
- 4) Adolescence – Adulte
 - a. Épilepsie absence juvénile
 - b. Épilepsie myoclonique juvénile
 - c. Épilepsie avec crise généralisée tonique clonique
 - d. Épilepsie myoclonique progressive
 - e. Épilepsie autosomique dominante avec manifestations auditives
 - f. Autre épilepsie du lobe temporal de l'adulte
- 5) Épilepsie sans âge de début précis
 - a. Épilepsie partielle familiale à foyer variable
 - b. Épilepsies réflexes

* Adapté de ⁴

1.1.5 Étiologie

Historiquement, les classifications officielles ont principalement mis l'accent sur la sémiologie des crises et les données encéphalographiques. Aujourd'hui, les méthodes modernes d'imagerie permettent d'identifier l'étiologie de la maladie ⁷. En 2010, la classification selon l'étiologie établie par l'ILAE contenait trois grandes catégories : génétique, structurelle/métabolique et inconnue. Tout comme celle des SE, la classification des épilepsies selon l'étiologie a évolué au fil du temps. En effet, la plus récente version proposée par l'ILAE inclut six catégories qui remplacent les trois catégories proposées dans les classifications de 2010, 1989 et 1985 :

1) L'épilepsie est causée par des facteurs *génétiques* et il n'y a aucune anomalie neuro-anatomique ou neuro-pathologique ⁶.

2) Une étiologie *structurelle* est suspectée lorsque les études d'imagerie montrent que des anomalies morphologiques sont à l'origine des crises épileptiques. Parmi les causes structurelles, on retrouve les dysplasies corticales ⁸, les traumatismes, les infections et les dommages liés à l'hypoxie ou l'anoxie ⁶.

3) Les épilepsies de cause *métabolique* sont associées à des altérations des niveaux de certaines molécules biochimiques qui mènent à l'apparition des crises épileptiques ⁹.

4) Dans certains cas, la crise épileptique peut survenir suite à l'inflammation due à une réponse immunitaire excessive au niveau du cerveau ^{10,11}.

5) L'étiologie *infectieuse* est la plus répandue dans le monde. Dans cette catégorie, l'épilepsie est causée par une maladie infectieuse. La tuberculose, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), et la malaria sont des exemples ¹².

6) Dans certains cas, l'étiologie ne peut pas être déterminée. Alors, le diagnostic ne peut être fait qu'à partir des manifestations électro-cliniques (ie. épilepsie du lobe frontal).

Ces catégories ont été créées afin de mieux comprendre la pathologie et d'améliorer la prise en charge des patients ⁶. Toutefois, elles ne sont pas mutuellement exclusives, et dans certains cas, la cause peut être multifactorielle. *Dans cette thèse, une attention particulière sera portée aux épilepsies généralisées ainsi qu'aux épilepsies structurales ou métaboliques causées par des mutations génétiques.*

1.1.6 Traitements

Cliniquement, l'épilepsie se manifeste par des crises épileptiques. Toutefois, l'épileptogénèse – le mécanisme par lequel la maladie se développe – survient avant l'apparition des premiers symptômes ^{13,14}. Actuellement, le traitement pharmacologique de l'épilepsie permet de contrôler les manifestations cliniques, mais ne peut prévenir ou renverser les processus de l'épileptogénèse. Depuis les années 1980, plus de 15 médicaments AED ont été commercialisés. Ainsi, considérant les avantages et limitations de chacun, le choix de l'AED peut représenter un défi de taille. Malgré tout, dans 70-80% des cas diagnostiqués, la prise d'AED permet de contrôler complètement les crises épileptiques ¹⁵. En dépit des succès des AED, 20 à 30% des patients seront pharmaco-résistants (incapable d'atteindre une rémission des crises après 2 essais) ^{16,17}. Parmi les autres traitements disponibles, la stimulation du nerf vague ¹⁸, la diète cétogène (très basse en glucides) ¹⁹ ainsi que l'ablation du foyer épileptique peuvent être envisagés ²⁰.

1.2 Maladies monogéniques associées à l'épilepsie

Comme décrit dans la **section 1.1.5**, l'épilepsie peut se manifester seule, ou en combinaison avec d'autres symptômes. Ainsi, plusieurs maladies associées à l'épilepsie sont causées par des mutations dans un seul gène (« single gene disorders »). Parmi celles-ci, on retrouve plusieurs formes d'épilepsie génétique généralisée, les épilepsies myocloniques progressives, ainsi que certains syndromes neurocutanés (SNC) ²¹. **La section 1.2** présente un aperçu de ces différents syndromes.

1.2.1 Les épilepsies génétiques

Les épilepsies génétiques (EG) représentent 47% de toutes les épilepsies ²². Toutefois, les formes monogéniques ne représentent que 1 à 2% des EG. Dans la plupart de ces cas, une transmission autosomique dominante est observée. Parmi les formes monogéniques d'épilepsie, on retrouve :

1) *L'épilepsie nocturne du lobe frontal à transmission autosomique dominante (ADNLFLE)* est caractérisée par des crises motrices nocturnes avec manifestations hyper-cinétiques et toniques bien que des crises toniques-cloniques peuvent aussi survenir ²³. Les crises, qui sont principalement d'origine frontale, surviennent la nuit, lorsque le patient commence à s'endormir ainsi que peu après son réveil, et n'altèrent pas la conscience. Les symptômes débutent dans l'enfance et se poursuivent jusqu'à l'âge adulte. Initialement découvert chez 5 familles ²⁴, on retrouve actuellement au moins 100 familles décrites avec ce syndrome ²⁵. Bien que, décrit à l'époque comme un syndrome homogène sur le plan du phénotype, des manifestations psychiatriques et cognitives peuvent s'ajouter au tableau clinique ²⁶⁻²⁹.

2) *L'épilepsie partielle familiale à foyer variable (FFEVF)* a été rapportée pour la première fois en 1998 dans une famille australienne ³⁰. La particularité de ce syndrome réside dans le fait qu'au sein d'une même famille, les foyers épileptiques se retrouvent dans différentes régions corticales. Ainsi, des crises frontales, temporales, occipitales, centropariétales et pariétales ont été retrouvées chez les patients FFEVF ³¹. La présence des crises frontales chez les patients FFEVF peut parfois mener à un diagnostic d'ADNFLE ²³. Toutefois, au contraire de l'ADNFLE, les auras et les crises diurnes sont typiques des FFEVF. Les crises sont également moins fréquentes ^{32,33}. Les fonctions cognitives sont généralement préservées même si un historique familial de maladies psychiatriques a été rapporté dans certains cas ³¹⁻³⁴. À l'heure actuelle, 13 familles avec FFEVF ont été rapportées suggérant qu'il s'agit d'un syndrome épileptique rare ^{31,35,36}.

3) *L'épilepsie partielle autosomique dominante avec composante auditive (ADPEAD)* (aussi appelé épilepsie du lobe temporal latéral à transmission autosomique dominante (ADLTE) est

un syndrome électro-clinique rare caractérisé par des hallucinations auditives et des crises aphasiques ³⁷. Les hallucinations auditives s'apparentent à des grognements, des bourdonnements ou des sons subissant une distorsion. Les crises TC sont fréquentes, tandis que les vertiges et les hallucinations visuelles surviennent rarement ^{38,39}. Chez ces patients, l'analyse de l'EEG ne montre aucune anomalie et les crises semblent provenir du lobe temporal latéral ³⁸. En 2009, 35 familles avaient été décrites avec ce syndrome qui montre généralement un bon pronostic ^{23,39}.

4) *Les épilepsies convulsions néonatales familiales bénignes* peuvent être regroupées en trois syndromes selon l'âge du début des crises. La forme néonatale (BNFS) a été rapportée pour la première fois en 1964 dans une famille présentant des crises épileptiques dans les premiers jours après la naissance ^{23,40}. Celles-ci peuvent être de type généralisées toniques-cloniques quoique des crises partielles ont été décrites ²³. Dans 85% des cas, les crises disparaissent après l'âge d'un mois et le développement de l'enfant se poursuit normalement. Dans de rares cas, une déficience intellectuelle a été rapportée ^{41,42}. Pour sa part, la forme néonatale/nourrisson (BNIFS) est caractérisée par des crises partielles afebriles secondairement généralisées se développant durant les sept premiers mois suivant la naissance. Les crises cessent généralement vers 12 mois ⁴³. Elle fut décrite pour la première fois en 1983 dans une famille américaine ⁴⁴. Finalement, une forme plus tardive survenant vers six mois a été décrite en 1992 (BIFS) ⁴⁵.

5) *L'épilepsie généralisée avec crises fébriles plus* (GEFS+) a été décrite pour la première fois en 1997 dans une famille contenant 25 individus atteints ⁴⁶. Ce syndrome électro-clinique est caractérisé par des crises fébriles (FS) débutant dans l'enfance. Toutefois, contrairement aux crises fébriles typiques, celles-ci peuvent perdurer au-delà de 6 ans et être associées à des crises afebriles ^{23,46-48}. *Le syndrome de Dravet* ou épilepsie myoclonique sévère du nourrisson (SMEI) est caractérisé par des crises cloniques unilatérales ou généralisées survenant au cours des 12 mois suivant la naissance (typiquement 5-6 mois). Dans certains cas, les premières manifestations cliniques sont les crises afebriles cloniques, TC ou myocloniques ⁴⁹. Comme dans le GEFS+, les patients présentent des FS, et ce, jusqu'à l'apparition des autres crises afebriles (vers 2 à 4 ans). Contrairement au GEFS+, les crises cloniques évoluent vers des crises TC pharmaco-résistantes avec l'âge ⁴⁹. Bien que certains patients aient un développement

normal après l'âge de deux ans, la plupart des patients montrent un retard psychomoteur et intellectuel ^{50,51}. Ainsi, les SMEI représentent les formes les plus sévères du spectre phénotypique des GEFS+. Un historique familial de FS ainsi que l'occurrence de ces deux syndromes électro-cliniques au sein d'une même famille supporte cette hypothèse ^{48,49}. Dans cet ordre d'idée, *l'épilepsie réfractaire de l'enfance avec crises généralisées toniques cloniques* (ICEGTC) est une autre forme d'épilepsie sévère avec une symptomatologie et une évolution similaire au syndrome de Dravet. Toutefois, les myoclonies sont absentes ⁵². Donc, ce syndrome s'ajoute au spectre des GEFS+.

6) Parmi les *épilepsies génétiques généralisées* (GGE), on retrouve *l'épilepsie avec absence de l'enfant* (CAE). Ce syndrome commun de GGE représente 10 à 17 % des épilepsies de l'enfant et il est généralement bien contrôlé par les médicaments. La maladie se manifeste entre l'âge de 4 et 10 ans (plus fréquemment entre 5 à 7 ans) et elle est caractérisée par des absences qui peuvent survenir jusqu'à 12 fois par jour ⁵³. Certains patients peuvent également développer des crises TC à l'adolescence ⁵⁴. *L'épilepsie avec absence de l'adolescent* (JAE) présente une symptomatologie similaire à la CAE, mais les crises surviennent plus tard et elles sont moins fréquentes ⁴⁸. Enfin, *l'épilepsie myoclonique juvénile* (JME) est caractérisée par des crises myocloniques bilatérales des membres supérieurs et un âge de début des symptômes dans l'adolescence (entre 4 à 25 ans). Les crises surviennent principalement peu après le réveil ou dans des cas de fatigue extrême, et la conscience n'est pas altérée. Généralement, les crises sont bien contrôlées par les médicaments. D'autres manifestations épileptiques sont retrouvées dans les patients JME comme les absences (32%) et les crises TC (80-95%) ⁵⁵. Il est important de noter que, contrairement aux autres syndromes électro-cliniques présentés dans cette section, une faible proportion des GGE présentées ci-dessus sont causées par des mutations dans un seul gène. En effet, pour la grande majorité des épilepsies génétiques généralisées communes, un mode de transmission complexe est suspecté.

1.2.2 Les épilepsies myocloniques progressives

Les épilepsies myocloniques progressives (PME) sont un groupe de maladies neurodégénératives rares caractérisées par des crises myocloniques déclenchées lors du

mouvement, ainsi que des crises généralisées toniques-cloniques (GTCS), et un déclin neurologique progressif. Généralement, l'atteinte neurologique se manifeste par une ataxie ou une démence ⁵⁶. Outre les GTCS, les absences, les crises toniques et les crises partielles peuvent survenir chez certains patients. Les crises myocloniques ont une distribution focale ou segmentaire et apparaissent de façon arythmique, asynchrone et asymétrique ⁵⁶. Les premiers symptômes des PME se manifestent généralement tard dans l'enfance ou à l'adolescence, quoiqu'ils puissent survenir à tout âge. La plupart des PME sont regroupées, à l'exception de la maladie de Lafora, au sein des maladies de surcharge lysosomale (la maladie d'Unverricht-Lundborg, le syndrome des myoclonies d'action avec ou sans troubles rénaux, les céroïdes-lipofuscinoses neuronales (NCL), les sialidoses et la maladie de Gaucher). Certaines formes de PME sont également associées à des troubles mitochondriaux (Épilepsie myoclonique avec fibres rouges en haillons) ⁵⁷⁻⁵⁹. *Étant donné que le chapitre 2 porte sur le syndrome de Kufs, une forme rare de NCL dominante, celles-ci seront décrites plus en détail dans cette section. Le tableau 2 résume les manifestations cliniques des PME qui ne seront pas couvertes dans cette thèse.*

Tableau 1.2.2.1 : Manifestations cliniques des épilepsies myocloniques progressives

Syndrome	Transmission génétique	Début de la maladie	Manifestations épileptiques	Autres manifestations	Déclin cognitif	Références
EPM1	Récessive	6 à 13 ans	Myoclonies, toniques-cloniques généralisées	Dysarthrie, tremblements, ataxie, troubles de la coordination	Non	57,60
EPM2	Récessive	8 à 18 ans	Myoclonies, visuelles, toniques-cloniques généralisées	Démence avec apraxie, perte visuelle	Oui	57-59
Sialidose de type 1	Récessive	11 à 30 ans	Myoclonies	Troubles visuels, ataxie	Non	57
Sialidose de type 2	Récessive	11 à 20 ans	Myoclonies	Retard cognitif	Sévère	57
Syndrome MERRF	Mitochondriale	Enfance	Myoclonies, crises généralisées	Ataxie, démence, surdité, neuropathie périphérique	Oui	57,58,61
Maladie de Gaucher, type 3	Récessive	Variable	Myoclonies, toniques-cloniques, généralisées	Tremblements, démarche instable, dysarthrie, dystonie, déficience intellectuelle	Oui	62
ADRPL	Dominante	<20 ans	Myoclonies	Ataxie, choréo-athétose, démence	Oui	57,58,63
EPM4	Récessive	15 à 25 ans	Myoclonies action, crises généralisées	Tremblements, ataxie, dysfonction rénale	Non	57,64,65

Syndrome	Transmission génétique	Début de la maladie	Manifestations épileptiques	Autres manifestations	Déclin cognitif	Références
EPM5	Récessive	4 à 10 ans	Myoclonies, crises généralisées toniques-cloniques	Ataxie	Léger	57,58
EPM6	Récessive	<2 ans	Myoclonies, crises généralisées toniques-cloniques, absences	Ataxie, scoliose	Non	57,58
MEAK	<i>de novo</i>	6 à 15 ans	Myoclonies, toniques-cloniques généralisées	Ataxie	Léger	57

Légende : EPM1 : Maladie d'Unverricht–Lundborg ; EPM2 : Maladie de Lafora ; MERRF : Épilepsie myoclonique avec fibres rouges en haillons ; ADRPL : Atrophie dentato-rubro-pallido-lusienne ; EPM4 : Syndrome des myoclonies action avec/sans troubles renaux ; EPM5 : Épilepsie myoclonique progressive – ataxie ; EPM6 : Épilepsie myoclonique progressive - Mer du Nord ; MEAK : Épilepsie myoclonique et ataxie causées par des variations dans le canal potassique.

1.2.2.1 Les céroïdes-lipofuscinoses neuronales

Les NCL sont un groupe de maladies neurodégénératives ayant une incidence globale qui varie entre 1 : 12,500 à 1 : 100,000 ⁶⁶. Elles représentent la cause la plus commune de neurodégénérescence et de démence chez l'enfant, et peuvent survenir dès la naissance, à l'adolescence et plus rarement à l'âge adulte. Individuellement, les NCL sont des maladies génétiques rares transmises de manière récessive ⁶⁷. Toutefois, il existe une forme adulte où le mode de transmission est autosomique dominant. Cliniquement, elles sont caractérisées par des crises épileptiques, un déclin psychomoteur progressif, une atteinte visuelle pouvant mener à la cécité ainsi que la mort prématurée (revue dans ⁶⁸). À l'analyse pathologique, on retrouve une accumulation anormale de matériel de stockage dans les neurones ainsi que dans d'autres types cellulaires. On les regroupe au sein des maladies de surcharge des lysosomes. À l'heure actuelle, 14 formes différentes de NCL ont été décrites. Celles-ci sont classées selon le début des symptômes (congénitale, infantile, infantile tardif, juvénile et adulte), le type de transmission (récessif ou dominant) et le gène muté.

1.2.3 Les syndromes neurocutanés

Les SNC sont un groupe de maladies qui combinent des atteintes au niveau du système nerveux central et de la peau. Malgré leur présence, les manifestations cutanées ont un rôle variable dans l'établissement du diagnostic de SNC ⁶⁹. En effet, ce sont les progrès en génétique ainsi que les méthodes d'imagerie qui ont permis de mieux comprendre les SNC les plus rares et de faire des associations avec les malformations cérébrales. Ainsi, la plupart de ces syndromes sont des maladies monogéniques causées par des variations fortement pénétrantes dans un seul gène. En raison de l'atteinte cérébrale, les patients atteints de SNC sont à risque de développer l'épilepsie ⁷⁰. *Afin de rester dans les limites de cette thèse seulement les SNC plus communs seront traités. Une attention particulière sera portée aux manifestations neurologiques des SNC familiaux avec épilepsie. En raison de leur lien direct avec les chapitres 3 et 4, deux formes rares de SNC seront également décrites.*

Parmi les SNC avec épilepsie, la *sclérose tubéreuse* (TS) est la maladie neurocutanée la plus commune avec une prévalence de 1 sur 6000 individus ^{70,71}. Les manifestations neurologiques incluent l'épilepsie ^{72,73}, les troubles cognitifs ⁷⁴ et l'autisme ⁷⁵. Elles sont causées par des anomalies développementales du cortex – les tubers corticaux. Avec une fréquence de 75 à 90%, l'épilepsie représente la manifestation neurologique la plus fréquente ^{72,76}. L'expression du phénotype épileptique est très variable. En effet, pratiquement tous les types de crises ont été rapportés chez des patients avec la TS (partielle, tonique, clonique, tonique-clonique, myoclonique, atonique et atypique) ⁷². Dans la majorité des cas, les patients sont résistants aux médicaments. Ainsi, l'ablation des tubers peut être envisagée comme une alternative aux médicaments (revue sur la TS ⁷¹) ^{77,78}.

La *neurofibromatose de type 1* (NF1) est le deuxième SNC le plus commun ⁷⁹⁻⁸². Les manifestations cutanées incluent, entre autres, des lésions hyperpigmentaires de couleurs variées (taches « café au lait »), des éphélides (taches de rousseur) au niveau des aisselles et de l'aîne et des neurofibromes (tumeurs) ^{79,82}. En plus de l'épilepsie qui est retrouvée chez 4 à 9,5% des cas ⁸³, les patients présentent des tumeurs cérébrales malignes, un déficit cognitif et d'attention ainsi que des maux de tête. Les crises épileptiques sont principalement partielles (revue sur la NF1 ⁸²) ^{82,83}.

Le *syndrome de Sturge-Weber* (SWS) a une fréquence entre 1 : 20 000 et 1 : 50 000, et est caractérisé, entre autres, par l'épilepsie, le retard mental, et les taches de naissance de type « facial port-wine stain ». Les crises épileptiques sont présentes chez plus de 75% des patients avec le SWS et surviennent généralement dans les deux premières années de vie de l'enfant. Elles peuvent être de type tonique-clonique généralisé, quoique la moitié des patients présentent des crises partielles ⁸⁴. Bien que des familles aient été rapportées, la majorité des cas surviennent sans historique familial (revue sur le SWS ⁸⁵).

Le *syndrome de Sjögren-Larsson* est un SNC découvert par les médecins du même nom vers la fin des années 50 caractérisé par un retard mental, une ichtyose congénitale et une paralysie spastique ^{86,87}. Cliniquement, les manifestations cutanées sont apparentes dès la naissance et se manifestent par des plaques érythémateuses avant de progresser en hyperkératose généralisée.

Les régions les plus touchées sont les genoux, les coudes, le bas de l'abdomen, le tronc et les extrémités ⁸⁸. Pour leur part, les manifestations neurologiques surviennent durant les deux premières années de vie du patient et incluent la diploégie spastique et la tétraplégie (plus rare). La sévérité de l'atteinte motrice est variable – la moitié des patients ne peuvent se déplacer et la majorité des autres ont besoin de dispositif pour les aider à marcher (béquilles) ⁸⁹. En plus du retard moteur, les fonctions cognitives sont également altérées. En effet, l'atteinte neurologique peut être de sévérité variable, et rares sont les patients qui ne présentent aucune déficience intellectuelle ⁹⁰. Les anomalies du langage, les anomalies ophtalmologiques ainsi que la dysarthrie sont également possibles. Enfin, 40% des patients souffrent également de crises épileptiques ^{91,92}. Toutefois, celles-ci ne sont pas très bien décrites dans la littérature.

Le *syndrome d'Aicardi-Goutières* (AGS), identifié en 1984, est caractérisé par une encéphalopathie précoce avec une calcification des ganglions de la base, des anomalies au niveau de la matière blanche ainsi qu'une lymphocytose chronique du liquide céphalo-rachidien. Les symptômes peuvent survenir dès la naissance, ou après plusieurs mois de développement normal. Ceux-ci incluent une spasticité, une dystonie, une microcéphalie progressive ainsi qu'un retard psychomoteur ⁹³. Une étude publiée en 2013 a aussi montré que, dans un groupe de 16 patients, 75% d'entre eux souffraient de crises épileptiques. Plus spécifiquement, les auteurs ont observé des crises toniques, myocloniques et des crises secondairement généralisées. De plus, la plupart étaient réfractaires aux traitements ⁹⁴. Dans plus de 30% des cas, des lésions cutanées de type « chilblain » (engelures) ont été rapportées. Celles-ci surviennent généralement au niveau des pieds, des mains, des doigts, ainsi que des oreilles, et sont induites par le froid.

1.3 Étiologie génétique des épilepsies monogéniques

L'étiologie génétique de l'épilepsie n'est pas contestée. En effet, depuis près de 20 ans, un grand nombre de gènes associés à la maladie ont été identifiés. La majorité de ces découvertes proviennent des études de familles et elles ont permis d'élucider plusieurs types d'épilepsies. Parmi celles-ci, on retrouve les formes monogéniques d'épilepsie (**section 1.2.1**) ainsi que les maladies mendéliennes associées à l'épilepsie (**sections 1.2.2 et 1.2.3**). Bien qu'elles ne soient pas abordées en détails dans cette thèse, plusieurs études ont montré que les formes plus sévères

d'épilepsie (les encéphalopathies épileptiques) étaient fréquemment expliquées par des mutations *de novo* ⁹⁵⁻⁹⁷. Le mosaïsme cellulaire est également en cause dans quelques syndromes neurocutanés ⁹⁸. Dans cette section, les mécanismes génétiques causant les épilepsies monogéniques seront décrits. *Afin de rester dans les limites de cette thèse, une attention particulière sera portée aux études de liaison et un survol rapide des autres approches sera présenté. De plus, en raison de leur pertinence vis-à-vis les chapitres subséquents certains syndromes épileptiques rares seront présentés.*

1.3.1 Les études de liaison

Les études de liaison sont des analyses génétiques ayant démontré un fort succès dans le domaine des épilepsies monogéniques (dominantes ou récessives). Durant la méiose, les chromosomes se recombinent par enjambement ce qui crée des agencements qui sont différents de ceux du départ. Ainsi, des chromatides provenant d'un des parents peuvent dorénavant contenir du matériel provenant de l'autre parent. En étudiant les familles, il est possible de suivre les blocs de recombinaisons (haplotypes) et de retracer l'origine parentale de chacun d'eux. Par la suite, dans un contexte où des individus sont atteints d'une maladie, on peut évaluer si l'association de cet haplotype avec la maladie est due au hasard ou non. Le but des études de liaison est d'établir un score qui reflète la probabilité qu'une région chromosomique soit liée à la maladie étudiée. Ensuite, en utilisant différentes méthodes, les gènes les plus prometteurs peuvent être séquencés dans le but d'identifier une mutation causative. Considérant qu'on dénombre plus de 18,000 gènes dans le génome ⁹⁹, cet intervalle candidat permet de réduire grandement le nombre de gènes à considérer. La liste de gènes candidats peut varier de quelques-uns à quelques centaines, selon la taille de la région chromosomique impliquée et la densité des gènes retrouvés dans cet intervalle ¹⁰⁰. Cette méthodologie, aussi appelé clonage positionnel, a permis d'identifier un grand nombre de gènes associés à des formes monogéniques d'épilepsie. De plus, les analyses de liaison ont démontré que la majorité des épilepsies monogéniques suivent un mode de transmission autosomique dominant. Parmi les rares formes récessives, on retrouve les épilepsies progressives myocloniques.

1.3.1.1 Les épilepsies génétiques

La plupart des *épilepsies génétiques* sont causées par des mutations hétérozygotes dans les canaux ioniques ¹⁰¹. Ceux-ci sont des protéines qui permettent le passage des ions (chlore, potassium, sodium) de part et d'autre de la membrane cellulaire afin de générer l'excitabilité électrique. Ils sont divisés en deux catégories : les canaux dépendants du voltage (s'ouvrent suite à un changement dans le voltage) et les canaux dépendants d'un ligand (s'ouvrent suite à la liaison d'une molécule comme l'acétylcholine ou le GABA). Chacun d'eux est constitué de plusieurs sous-unités, certaines essentielles, d'autres accessoires. En plus d'être importants pour le fonctionnement normal de la cellule, les canaux ioniques jouent un rôle capital dans le système nerveux central. Plus spécifiquement, ils sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie électrique du cerveau. Ainsi, il n'est pas surprenant qu'un déséquilibre de cette dernière suite à des mutations génétiques soit associé à l'épilepsie ¹⁰².

Le rôle des canaux ioniques dans l'épilepsie a été démontré pour la première fois dans les épilepsies monogéniques. En effet, les mutations dans les canaux sodiques et potassiques ont d'abord été retrouvées dans des familles atteintes de GEFS+ (*SCN1A* et *SCN1B*) ^{103,104} et de BNFS (*KCNQ2* et *KCNQ3*) ¹⁰⁵⁻¹⁰⁸, respectivement. Également, les premières mutations dans les récepteurs nicotiniques et les récepteurs GABAergiques ont été retrouvées dans des familles d'ADNFLE (*CHRNA4*) ¹⁰⁹ et GEFS+ (*GABRG2*) ¹¹⁰. Suite à ces découvertes, le séquençage des autres gènes codant les canaux ioniques a montré l'hétérogénéité clinique associée à ces gènes. Le **tableau 1.3.1.1.1** résume l'implication des canaux ioniques dans l'étiologie génétique des épilepsies.

Bien que les canaux ioniques expliquent un grand nombre de phénotypes épileptiques, d'autres gènes ont également un rôle important dans l'étiologie de la maladie. Par exemple, le gène *LGII* a été associé à l'ADEAF. Depuis son identification en 2002 ^{111,112}, 42 mutations dans 48 familles/cas ont été répertoriées. Ainsi, ce gène explique 30 à 50 % des cas d'ADEAF suggérant le rôle important de *LGII* dans ce phénotype ¹¹³. Récemment, la voie de signalisation mTOR a été impliquée dans formes d'épilepsie partielle. En effet, plusieurs mutations dans le gène *DEPDC5* ont d'abord été retrouvées dans des familles avec FFEVF ¹¹⁴⁻¹¹⁶ et, par la suite, dans

différentes épilepsies ^{117,118}. D'autres gènes de cette voie, comme *NPRL2* et *NPRL3* ont récemment été associés à des familles d'épilepsie partielle et de dysplasie corticale ^{119,120}. Le **tableau 1.3.1.1.2** résume l'implication des gènes ne codant pas les canaux ioniques dans la maladie. L'implication de la voie mTOR est connue également dans les syndromes neurocutanés. En effet, la sclérose tubéreuse (**section 1.2.3**) est associée à des mutations hétérozygotes dans les gènes *TSC1* et *TSC2* ¹²¹⁻¹²³, deux modulateurs de la voie mTOR. En 2006, on répertoriait respectivement plus de 200 et 700 mutations dans ces gènes ⁷¹.

Tableau 1.3.1.1.1 : Tableau des principaux gènes codant les canaux ioniques associés à l'épilepsie

Syndrome électro-clinique	Gène	Type de mutations	Nombre de mutations	Références
ADNFLE	<i>CHRNA4</i>	SNV, Indel	6	109,124–128
ADNFLE	<i>CHRNA2</i>	SNV	6	129–133
ADNFLE, BIFS	<i>CHRNA2</i>	SNV	3	134–136
BNFS, RE	<i>KCNQ2</i>	SNV, Indel, Épissage	>50	41,107,108,137–146
BNFS, EE, RE, BIFS	<i>KCNQ3</i>	SNV, Indel	12	105–107,146–152
ADNFLE, EE	<i>KCNT1</i>	SNV	14	95,153–159
EE	<i>KCNA2</i>	SNV	4	97
TLE, IE	<i>KCND2</i>	SNV	2	160,161
EAST	<i>KCNJ10</i>	SNV	10	148,162–164
GGE, FS, EE	<i>GABRA1</i>	SNV, Indel	13	165–171
GEFS+, CAE, FS, GGE	<i>GABRG2</i>	SNV, Indel, Épissage	12	110,168,172–180
GGE, EE	<i>GABRB3</i>	SNV	7	169,181
GEFS+, GGE, FS	<i>GABRD</i>	SNV	3	182
EE, GEFS+, GGE, PE	<i>SCN1A</i>	SNV, Indel, Épissage, SV	>695	183
GEFS+, TLE, PE, DS	<i>SCN1B</i>	SNV, Épissage	8	103,184–189
BFNIS, FS, GGE, EE, DS	<i>SCN2A</i>	SNV, Indel	30	43,95,148,156,168,190–202
PE	<i>SCN3A</i>	SNV	5	203,204
EE	<i>SCN8A</i>	SNV, Épissage	22	95,168,205–208
GGE, EE	<i>CACNA1A</i>	SNV	4	95,209–211
GGE, MAE	<i>CACNA1H</i>	SNV, Indel	23	212–214
GGE	<i>CACNB4</i>	SNV	2	215
EE	<i>CACNA2D2</i>	SNV, indel	2	216,217

Tableau 1.3.1.1.2 : Tableau des autres principaux gènes associés à l'épilepsie

Syndrome électro-clinique	Gène	Type de mutations	Nombre de mutations	Références
FFEVF, PE, ADNFLE, RE	<i>DEPDC5</i>	SNV, Indel	33	36,114,115,117,118,218
PE	<i>NPRL2</i>	SNV	5	120
PE, ADNFLE	<i>NPRL3</i>	SNV, Indel	9	119,120,219
ADEAF	<i>LGII</i>	SNV, Indel, Épissage	42	113
GGE	<i>EFHC1</i>	SNV, Indel	17	220–224

Légende tableau 1.3.1.1.1 et tableau 1.3.1.1.2: ADNFLE : Épilepsie nocturne du lobe frontal à transmission autosomique dominante; BIFS : Épilepsie familiale bénigne infantile; BNFS : Épilepsie familiale bénigne néonatale; RE : Épilepsie rolandique, EE : Encéphalopathie épileptique; TLE : Épilepsie du lobe temporelle; IE : Épilepsie réfractaire; EAST : Syndrome de EAST; GGE : Épilepsie génétique généralisée; FS : Convulsion fébrile; GEFS+ : Épilepsie généralisée avec crises fébriles plus; CAE : Épilepsie absence de l'enfance. PE : Épilepsie partielle; DS : Syndrome de Dravet; BNFIS : Épilepsie familiale bénigne néonatale/infantile; MAE : Épilepsie myoclonico-astatique SNV : Variation nucléotidique simple; Indel : Insertion/délétion; SV : Variation structurale; FFEVF : Épilepsie partielle à foyer variable; RE : Épilepsie rolandique; ADPEAF : Épilepsie partielle autosomique dominante avec composante auditive.

1.3.1.2 Les épilepsies progressives myocloniques

La plupart des épilepsies progressives myocloniques ont une transmission autosomique récessive. Le **tableau 1.3.1.2.1** présente la cause génétique des différentes formes de PME. *Afin de rester dans les limites de cette thèse, seulement l'étiologie génétique des NCL sera décrite plus en détail.*

Les premières associations entre des gènes et NCL sont survenues en 1995, avec l'identification des mutations dans les gènes *PPT1*²²⁵ et *CLN3*²²⁶. Suivant ces découvertes, le clonage positionnel (**section 1.3.1**), la biochimie, les modèles animaux ainsi que le séquençage à haut débit (**section 1.4.1**) ont montré l'implication de 11 gènes additionnels²²⁷⁻²³⁷. La majorité des gènes identifiés codent pour des protéines faisant partie de la voie lysosomale. À l'heure actuelle, plus de 400 mutations dans 13 gènes différents ont été associées NCL⁶⁷ (**tableau 1.3.1.2.2**). Dans la majorité des cas, des mutations perte de fonctions sont associées à un type spécifique de NCL. Toutefois, pour pratiquement tous les gènes, on observe des phénotypes plus tardifs avec des mutations moins dommageables (**tableau 1.3.1.2.3**). De plus, des mécanismes génétiques communs entre différentes pathologies ont également été rapportés (**tableau 1.3.1.2.4**). Malgré tout, un nombre significatif de patients avec une symptomatologie et une histopathologie compatibles avec les NCL demeurent sans aucun diagnostic génétique. D'autres gènes restent, donc, à être identifiés⁶⁷. *Le chapitre 2 présente la découverte des mutations dans le gène *DNAJC5* associé au *CLN4*, une forme adulte de NCL. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Clinical Genetics*.*

Tableau 1.3.1.2.1 : Causes génétiques des épilepsies progressives myocloniques

Syndrome	Gène	Type de mutations	Nombre de mutations	Références
EPM1	<i>CSTB</i>	Expansion, SNV, Indel	14	238–247
EPM2	<i>EPM2A</i>	Délétion, SNV, Indel	>50	248–252
	<i>EPM2B</i>	Délétion, SNV, indel	>50	248,249,252–256
Sialidose de type 1	<i>NEUI</i>	SNV, Indel	18	257,258
Sialidose de type 2	<i>NEUI</i>	SNV, Indel, Épissage	20	257,259
MERRF	<i>ARNt (I, K)</i>	SNV	2	260,261
Maladie de Gaucher, type 3	<i>GBA</i>	SNV, Indel	20	62
ADRPL	<i>DRPLA</i>	Expansion	1	262
EPM4	<i>SCARB2</i>	SNV, Indel, Épissage	16	65,263–270
EPM5	<i>PRICKLE1</i>	SNV	1	271
EPM6	<i>GOSR2</i>	SNV	1	272
MEAK	<i>KCNC1</i>	SNV	1	273

Légende : EPM1 : Maladie d'Unverricht–Lundborg ; EPM2 : Maladie de Lafora ; MERRF : Épilepsie myoclonique avec fibres rouges en haillons ; ADRPL : Atrophie dentato-rubro-pallido-luisienne ; EPM4 : Syndrome myoclonie d'action avec/sans troubles renaux ; EPM5 : Épilepsie myoclonique progressive – ataxie ; EPM6 : Épilepsie myoclonique progressive - Mer du Nord ; MEAK : Épilepsie myoclonique et ataxie causées par des variations dans le canal potassique.

Tableau 1.3.1.2.2 : Causes génétiques des NCLs

Syndrome	Gène	Types de mutations	Nombre de mutations
CLN1	<i>PPT1</i>	SNV, Indel, Épissage	67
CLN2	<i>TPP1</i>	SNV, Indel, Épissage	116
CLN3	<i>CLN3</i>	SNV, Indel, Épissage	67
CLN4	<i>DNAJC5</i>	SNV, Indel	2
CLN5	<i>CLN5</i>	SNV, Indel	36
CLN6	<i>CLN6</i>	SNV, Indel, Épissage	71
CLN7	<i>MFSD8</i>	SNV, Indel, Épissage	38
CLN8	<i>CLN8</i>	SNV, Indel, Épissage	31
CLN9	<i>CLN9</i>	-	0
CLN10	<i>CTSD</i>	SNV, Indel, Épissage	8
CLN11	<i>GRN</i>	SNV, Indel	2
CLN12	<i>ATP13A2</i>	SNV	1
CLN13	<i>CTSF</i>	SNV, Indel, Épissage	6
CLN14	<i>KCTD7</i>	SNV	1

Légende : SNV : Variation nucléotidique simple; Indel : Insertion/délétion. Adapté de ⁶⁷

Tableau 1.3.1.2.3 : Corrélation génotype-phénotype dans les NCLs

Gène	Protéine	Congénitale	Infantile	Infantile tardif	Juvenile	Adulte
<i>PPT1</i>	PPT1		<u>✓</u>	✓	✓	✓
<i>TPP1</i>	TPP1			<u>✓</u>	✓	
<i>CLN3</i>	Protéine Transmembranaire				✓	
<i>DNAJC5</i>	CSPalpha					✓
<i>CLN5</i>	Protéine Lysosomale			<u>✓</u>	✓	✓
<i>CLN6</i>	Protéine Transmembranaire			<u>✓</u>		✓
<i>MFSD8</i>	Protéine Transmembranaire			<u>✓</u>		
<i>CLN8</i>	Protéine Transmembranaire			<u>✓</u>		
<i>CTSD</i>	Cathepsine D	<u>✓</u>		✓	✓	✓
<i>GRN</i>	Progranuline					<u>✓</u>
<i>ATP13A2</i>	ATPase type 13A2				<u>✓</u>	
<i>CTSF</i>	Cathepsine F					<u>✓</u>
<i>KCTD7</i>	Canaux potassique		<u>✓</u>			

Légende : ✓ associée à des mutations perte de fonction. Adapté de ⁶⁷

Tableau 1.3.1.2.4 : Autres gènes associés aux NCLs

Gène	Transmission	Type de mutations	Maladie	Références
<i>CLN8</i>	AR	SNV	Épilepsie progressive avec retard mental	231
<i>CLN2</i>	AR	SNV	Ataxie spinocérébelleuse (SCAR7)	274
<i>GRN</i>	AD	SNV	Démence fronto-temporale avec inclusion TDP43	233
<i>CLN3</i>	AR	SNV	Rétinite pigmentaire	275
<i>CLN3</i>	AR	SNV	Myopathie autophagique avec atteinte cardiaque	276
<i>KCTD7</i>	AR	SNV, Cadre de lecture	Épilepsie progressive myoclonique	277,278
<i>KCTD7</i>	AR	SNV, Indel	Syndrome ataxie opsono myoclonique	279
<i>ATP13A2</i>	AR	SNV	Syndrome Kufor-Rakeb	234
<i>SGSH</i>	AR	SNV	Mucopolysaccharidose type IIIA	280

Légende : AR: Autosomique récessive ; AD: Autosomique dominante ; SNV: Variation nucléotidique simple ; Indel: Insertion/délétion

1.3.1.3 Les syndromes neurocutanés

Le syndrome de *Sjögren-Larsson* est causé par une déficience de l'enzyme « fatty aldehyde dehydrogenase » (FALD) associé aux mutations dans le gène *ALDH3A2*. La maladie est transmise selon un mode autosomique récessif et, en 2005, on répertoriait 72 mutations (faux-sens, indel, épissage ou réarrangement chromosomique) dans le gène *ALDH3A2*. Plus de 120 familles à travers le globe ont été associées avec ces mutations²⁸¹. Même si la majorité de celles-ci étaient spécifiques à une seule famille, quelques-unes étaient communes à des populations distinctes²⁸²⁻²⁸⁷. Les études *in vitro* ont montré que les mutations faux-sens provoquaient une diminution (partielle ou complète) de l'activité catalytique de la FALD²⁸⁸. En 2011, un groupe de recherche a rapporté deux patients avec une symptomatologie similaire au syndrome de Sjögren-Larsson. Toutefois, chez ces patients, le phénotype neurologique était plus sévère et la maladie était causée par des mutations homozygotes dans le gène *ELOVL4*²⁸⁹. Ce gène code pour une élongase et est, comme la FALD, impliqué dans le métabolisme des acides gras. *Le chapitre 3 porte sur l'identification d'une mutation hétérozygote dans le gène ELOVL4 associé à un autre syndrome neurocutané caractérisé par une érythrokatodermie de type variabilis et une ataxie spinocérébelleuse – le syndrome de Giroux-Barbeau. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue JAMA Neurology*

Malgré des manifestations cliniques qui peuvent être confondues avec celles d'une infection virale congénitale, le *syndrome d'Aicardi-Goutières* est d'origine génétique et suit un mode de transmission autosomique récessif⁹³. En effet, à l'heure actuelle, des mutations dans 7 gènes ont été associées au AGS et chacun d'eux est impliqué dans le métabolisme des acides nucléiques (*TREX1*, *RNASEH2A*, *RNASEH2B*, *RNASEH2C*, *SAMHD1*, *ADAR* et *IFIH1*)²⁹⁰⁻²⁹⁴. Une étude publiée en 2015 montrait qu'avec 44 mutations, le gène *TREX1* était à l'origine de 24% des cas (299 familles étudiées) d'AGS²⁹⁵. Bien que la plupart de celles-ci étaient retrouvées à l'état homozygote, des mutations hétérozygotes ont également été associées à d'autres maladies (lupus érythémateux systémique (SLE)²⁹⁶, lupus érythémateux avec engelure (CHLE)²⁹⁷ et vasculopathie rétinienne avec leucodystrophie cérébrale (RVCL)²⁹⁸). Dans cet ordre d'idée, les études de corrélation génotype-phénotype ont également montré qu'une seule mutation peut être associée à différentes manifestations cliniques. En effet, la mutation p.D18N héritée du côté

maternel a été retrouvée chez un patient avec le AGS. Toutefois, sa mère ne présentait que les lésions cutanées de type engelure ²⁹⁹. *Le chapitre 4 porte sur l'identification de la mutation D18N dans une famille canadienne-française présentant des lésions cutanées sévères provoquées par des engelures sans aucune manifestation neurologique, qui a été identifiée dans un contexte de diagnostic génétique. Un manuscrit présentant les résultats de cette étude est présentement en préparation.*

1.3.2 Mosaïsme cellulaire et mutation *de novo*

Le mosaïsme survient lorsque toutes les cellules d'un individu ne portent pas le même génotype. Pendant le développement, lors de la division cellulaire, des mutations spontanées peuvent survenir. Lorsque la mutation survient tôt dans le développement de l'embryon, toutes les cellules issues de cette division sont porteuses de cette variation (mosaïsme somatique). À titre d'exemple, la forme sporadique du SWS est causée par des mutations somatiques dans le gène *GNAQ*. Chez ces patients, celles-ci étaient retrouvées uniquement dans le cerveau et les régions affectées de la peau ³⁰⁰. Dans le cas d'un mosaïsme germinale, lorsque la mutation survient dans les gonades, celle-ci peut être transmise à la génération suivante. Toutefois, elle sera absente des autres types cellulaires des parents, et nommée mutation *de novo*. Ce type de mutation est notamment en cause dans plusieurs formes d'épilepsie sévère, les encéphalopathies épileptiques. À titre d'exemple, le syndrome de Dravet est causé par des mutations *de novo* dans le gène *SCN1A*. Bien que ce gène ait déjà été associé au GEFS+, 70 à 80% patients avec le syndrome de Dravet ont une mutation dans ce gène ³⁰¹. Des mutations *de novo* dans le gène *GABRA1* ont également été retrouvées dans des patients avec syndrome de Dravet ¹⁶⁸. *Puisque les mutations de novo et somatiques ne sont pas traitées dans les prochains chapitres de cette ouvrage, cette section ne présente qu'un aperçu.*

1.3.3 Autres mécanismes génétiques

Les anomalies chromosomiques participent aussi au portrait génétique de l'épilepsie. Elles peuvent notamment prendre la forme de *variation du nombre de copie d'ADN* (CNV). Les CNVs sont des événements de taille variable (plus de 1kb) qui consistent en la délétion,

l'insertion ou la duplication d'un ou plusieurs allèles. Ainsi, plusieurs CNV récurrentes ont été associées à l'épilepsie génétique généralisée (1q21.1, 15q11.2, 15q13.3, 15q11-q13, 16p11.2, et 16p13.11) ³⁰². Notons que ces CNV ont également été associées à d'autres maladies neurologiques comme l'autisme, la schizophrénie et le retard mental ³⁰³. Bien que des gènes connus pour causer l'épilepsie comme *KCNQ2*, *SCN1A* et *CHRNA4* ³⁰² peuvent être touchés par des CNV, certaines d'entre-elles n'ont pas de gène de susceptibilité identifié. Il reste néanmoins que la contribution des CNV dans les formes d'épilepsie génétique est importante ³⁰⁴.

L'étude des formes monogéniques d'épilepsie se base principalement sur la recherche des variations génétiques rares ou privées ayant un fort effet sur le phénotype. Ainsi, au sein d'une même famille, une mutation causale sera partagée par tous les individus atteints. Toutefois, la plupart des patients épileptiques sont les seuls atteints de leur famille et la majorité de celles-ci ne présente pas un mode de transmission clairement mendélien ^{305,306}. Ainsi, pour la plupart des épilepsies familiales communes (CAE, JME, etc.), une transmission génétique complexe est suspectée. Les études d'*association du génome entier* (GWAS) sont des analyses qui permettent d'établir un lien entre une variation commune (polymorphisme présent chez plus de 5% de la population) et un phénotype. Elles sont de type cas-contrôles et requièrent généralement un grand nombre d'individus de même ethnicité. De plus, elles sont fréquemment utilisées pour l'étude des maladies avec un profil de transmission complexe ³⁰⁷. Bien que la majorité des épilepsies génétiques généralisées semble respecter ce mode de transmission, seulement un petit nombre de GWAS ont été réalisés. Parmi les découvertes, on retrouve l'association du locus 2q24.3 (rs7587026) qui inclut le gène *SCN1A*, et de l'épilepsie du lobe temporal avec sclérose médiale (épilepsie partielle) ³⁰⁸. Un signal positif, mais non significatif, pour ce locus (rs11890028) a également été obtenu dans une étude impliquant plus de 3000 patients avec épilepsie généralisée et 4000 contrôles. En effectuant des analyses différentes pour les deux phénotypes retrouvés dans cette cohorte, les auteurs ont démontré une association entre les locus 2q22.3 et 1q43 pour les patients avec absences épileptiques (AE) et les patients JME, respectivement ³⁰⁹.

1.4 Séquençage à haut débit et étude génétique

La plupart des gènes présentés dans la **section 1.3** ont été identifiés par l'approche de clonage positionnel qui consiste à identifier un intervalle candidat (analyse de liaison) et ensuite séquencer les gènes de celui-ci à la recherche de mutations. Parmi les méthodes employées, le séquençage de type Sanger, découvert en 1977 par Frederick Sanger, décode la séquence nucléotidique des fragments d'ADN d'environ 500 pb. Afin d'être séquencé, chacun des fragments doit être amplifié par une réaction de polymérase en chaîne (PCR). Malgré le succès du clonage positionnel dans l'identification des gènes causatifs de plusieurs formes d'épilepsie (et autres maladies), cette approche présente des limitations. Depuis les débuts de son application, le séquençage à haut débit (HTS) a permis la découverte de plusieurs gènes causatifs pour des maladies et possède des applications cliniques prometteuses. *La présente section présente un survol des applications du HTS dans l'étude des maladies monogéniques ainsi que dans le diagnostic moléculaire.*

1.4.1 Le séquençage à haut débit

Le séquençage à haut débit (aussi appelé séquençage parallèle massif et séquençage de nouvelle génération), est une méthode qui a été développée en 2005 et qui a révolutionné le monde de la génétique ³¹⁰. En effet, en 2014, la compagnie *Illumina* a annoncé la sortie de la plateforme HiSeq X qui séquencerait 16 génomes humains en 3 jours pour la somme de 1000\$ US (par génome) ³¹¹. À titre comparatif, le premier séquençage du génome humain (via le projet Human Genome Project) avec les méthodes conventionnelles a nécessité un investissement de 3,4 milliards de dollars américains, 13 ans et la collaboration d'une centaine de laboratoires internationaux ³¹². Au contraire des approches traditionnelles, qui nécessitent une sélection préalable des régions à séquencer, le HTS permet de séquencer des millions de fragments (de 100 à 10 000 pb) en parallèle en une seule étape ³¹². Chacun de ces fragments est séquencé plusieurs fois ce qui permet une lecture fiable de l'information génétique (couverture). Outre le séquençage de l'ADN, les applications possibles du HTS sont le RNAseq (séquençage de l'ARN), le ChIPseq (séquençage de la chromatine), le Methyl-seq (séquençage de l'ADN méthylé). Puisque la majorité (85%) des variations pathogéniques ont été retrouvées dans les

exons, les régions de l'ADN codant pour les protéines, les chercheurs ont développé des méthodes afin de les prioriser. Ainsi, le séquençage de l'exome (WES) consiste à capturer uniquement les régions codantes avant de les séquencer sur des appareils HTS. Cette approche permet de réduire le nombre de bases séquencées ce qui facilite grandement les analyses informatiques. En raison de l'importante quantité de données générées, des analyses bio-informatiques doivent être effectuées (revue dans ³¹²). Ainsi, le WES est une approche non biaisée qui permet d'obtenir l'information génétique des régions codantes en une seule étape. Pour sa part, le séquençage ciblé (« targeted sequencing ») est une application du HTS qui consiste à interroger uniquement les régions codantes de gènes prédéfinis (« panels » de gène).

1.4.2 L'étude des maladies monogéniques

En 2009, une équipe a rapporté la première utilisation du séquençage de l'exome dans l'étude des maladies monogéniques. En effet, en utilisant le WES chez 4 patients non reliés atteints du syndrome de Freeman–Sheldon, ils ont démontré que le meilleur gène candidat était *MYH3* un gène associé à ce syndrome 3 ans plus tôt ^{313,314}. Ainsi, les auteurs ont démontré que le WES est une approche qui permet de découvrir les gènes pour les maladies rares, et ce, en utilisant un très petit nombre d'individus atteints non reliés. Pendant les deux années suivant cette publication, une trentaine de gènes causatifs pour des maladies monogéniques ont été identifiés ³¹⁵. À titre d'exemple, les mutations dans les gènes *DEPDC5* ont été trouvées grâce à cette approche ^{114,115}. *Les chapitres 2, 3 et 5 présentent les succès de cette approche dans l'identification des gènes prédisposant aux syndromes de Kufs et Giroux-Barbeau ainsi qu'aux épilepsies génétiques généralisées.*

1.4.3 Diagnostic génétique

Pendant plusieurs années, le séquençage Sanger a été la méthode de choix afin d'effectuer un diagnostic génétique. Toutefois, depuis l'avènement des méthodes à haut débit, l'utilisation des « panels » de gènes est grandissante. En épilepsie, la première utilisation de cette approche est survenue en 2012. Dans cette étude, les auteurs ont rapporté que le séquençage d'un panel de 265 gènes a permis d'établir un diagnostic génétique dans 50% des cas (16 sur 33 patients) ¹⁴⁸.

En 2014, plus d'une centaine de « panels » étaient utilisés dans le diagnostic moléculaire de l'épilepsie (Genetic Testing Registry). Ceux-ci contiennent entre 70 et 465 gènes, et incluent la plupart des gènes causant les maladies monogéniques décrites dans cet ouvrage³¹⁶. Ainsi, dans le cas où le gène causatif n'a pas été découvert, le séquençage de l'exome peut grandement aider au diagnostic. Dans le même ordre d'idées, les patients atteints de maladies phénotypiquement et génétiquement hétérogènes sont de bons candidats pour le WES. *Le chapitre 4 présente l'utilisation du WES dans un contexte de diagnostic clinique.*

1.5 Problématiques

L'épilepsie est une maladie hétérogène qui, cliniquement, peut-être la seule manifestation où une comorbidité associée à une autre symptomatologie. Comme il a été démontré dans ce chapitre, la plupart des découvertes génétiques ont été faites à partir de grandes familles atteintes de syndromes monogéniques. Bien que l'approche par clonage positionnel a eu un rôle important à jouer dans ces découvertes, elle présente certaines limites, notamment lorsque la région candidate contient un grand nombre de gènes. Le développement des méthodes de séquençage à haut débit représente donc une alternative de choix dans ce type d'analyse. En effet, le WES permet d'obtenir la séquence génomique de tous les gènes contenus dans les intervalles codants. Considérant le succès de cette méthodologie dans les études de familles avec un nombre restreint d'individus, ainsi que l'insuccès à identifier les gènes causatifs des formes communes d'épilepsie, elle apparaît également comme une approche de choix pour l'étude des familles avec des pathologies non expliquées. De façon plus spécifique, les objectifs de cette thèse sont :

Objectifs 1 et 2 : Identifier la cause génétique des syndromes de Kufs et de Giroux-Barbeau en utilisant les analyses de liaison ainsi que le séquençage de l'exome.

Objectif 3 : Utiliser le séquençage de l'exome dans un contexte de diagnostic clinique.

Objectif 4 : Identifier les causes génétiques des formes communes d'épilepsie chez 7 familles provenant de la population canadienne-française en utilisant le séquençage de l'exome.

Chapitre 2 : Des mutations récurrentes dans le gène *DNAJC5* causent le syndrome de Kufs à transmission autosomique dominante

2.1 Présentation de l'article

Les céroïdes-lipofuscinoses neuronales sont un groupe de maladies neurodégénératives regroupé au sein des épilepsies myocloniques progressives. Bien que la cause génétique de la plupart des NCL soit connue, aucun gène n'a encore été associé à la forme adulte – le syndrome de Kufs. L'étude présentée ici a été entreprise suite à de nombreux travaux préalables effectués dans les laboratoires des Drs Guy Rouleau et Patrick Cossette. En effet, à l'époque, deux grandes familles atteintes du syndrome de Kufs ont été recrutées par les Drs Cossette et Rouleau. Celles-ci montrent une structure suggérant une cause génétique hautement pénétrante et transmise de façon autosomique dominante. Ainsi, le but de ce projet était d'identifier la cause génétique de cette pathologie rare. À l'aide de la littérature disponible et des méthodes de séquençage de l'époque, plusieurs gènes candidats ont été étudiés sans toutefois identifier de mutation causative. Toutefois, malgré leurs insuccès, les études antérieures ont établi les bases pour les études génétiques subséquentes. En effet, en utilisant les analyses de liaison, celles-ci ont établi clairement la localisation du gène mutant sur le chromosome 20. En 2009, suite à l'avènement du séquençage parallèle massif, il fut possible de séquencer l'ensemble des régions codantes du génome humain en une seule réaction. En considérant la structure familiale, nous avons séquencé les régions codantes de trois patients provenant de la plus grande famille recrutée. Nous avons émis l'hypothèse que la variation causative serait présent chez tous les individus atteints de la famille et qu'elle serait localisée dans l'intervalle précédemment identifié. Dans cet article, la cause génétique du syndrome de Kufs est présentée. Même si notre publication n'est pas la première chronologiquement, notre découverte est indépendante de celle des autres groupes de recherche. Notre article traite également des difficultés rencontrées dans les études génétiques des maladies rares.

2.1.1 Contribution des auteurs

Recrutement des patients : EA, OA, RIK, EF, SL, SFB

Caractérisation du phénotype clinique dans la famille Kufs1 : EA, AB, FA, SL, SFB

Caractérisation du phénotype clinique dans la famille Kufs2 : RIK, EF

Diagnostique du matériel pathologique de Kufs3 : OA

Séquençage « Sanger » du cas Kufs3 : JD

Rédaction du manuscrit et des figures: MCD, EA, SFB, PC

Analyses bioinformatiques: MCD

Analyses de liaison : PC, PLT, CM

Design expérimental : MCD, PC, GAR

Validation des mutations génétiques : MCD

Séquençage de gène candidats : MCD, PLT

Financement : EA, PC, GAR, RIK, FA, EF, SL

Supervision du projet : PC

2.2 Recurrent mutations in DNAJC5 cause autosomal dominant Kufs disease

Article publié dans Clinical Genetics, 2013, volume 83 (6), page 571-575

Auteurs :

Maxime Cadieux-Dion BSc¹, Eva Andermann MD PhD², Pamela Lachance-Touchette B.Sc¹, Olaf Ansorge MD³, Caroline Meloche M.Sc¹, Alexandra Barnabé B.Sc², Ruben I. Kuzniecky MD⁴, Frederick Andermann MD², Edward Faught MD⁵, Stanley Leonberg MD⁶, John A Damiano BSc⁷, Samuel F. Berkovic MD⁷, Guy A. Rouleau MD, PhD¹ and Patrick Cossette MD, Ph.D¹

1) CHUM Research Center, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada. 2) Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Quebec, Canada. 3) Department of

Neuropathology, John Radcliffe Hospital, Oxford, UK. 4) Department of Neurology, Langone Medical Center, New York University, New York, New York, USA. 5) Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia, USA. 6) Rutgers Medical School and Cooper Hospital/University Medical Center, Camden, New Jersey. 7) Epilepsy Research Center, University of Melbourne, Austin Health, Heidelberg, VIC 3084, Australia

2.2.1 Abstract

Objective: We sought to identify the molecular basis of the autosomal dominant form of Kufs disease, an adult onset form of neuronal ceroid lipofuscinosis.

Methods: We used a combination of classic linkage analysis and Next Generation Sequencing to map and identify mutations in *DNAJC5* in a total of three families. We analyzed the clinical manifestations in 20 individuals with mutation in *DNAJC5*.

Results: We report here the mapping and the identification of a p.L116del mutation in *DNAJC5* segregating with the disease in two distinct American families, as well as a p.L115R mutation in an additional family. The age of onset and clinical manifestations were very homogeneous among mutation positive individuals, including generalized tonic-clonic seizures, myoclonus, ataxia, speech deterioration, dementia, and premature death. A few individuals also exhibited parkinsonism.

Conclusion: *DNAJC5*, which encodes the cysteine string protein (CSP α), a presynaptic protein implicated in neurodegeneration, causes autosomal dominant Kufs disease. The leucine residues at positions 115 and 116 are a hotspot for mutations and result in a homogeneous phenotype of progressive myoclonus epilepsy with onset around 30 years old.

Mots clés : Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, Neurogenetic, Neurodegenerative disorders, Exome Sequencing.

2.2.2 Introduction

The neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs) are a group of inherited neurodegenerative disorders characterized by abnormal lysosomal accumulation of autofluorescent lipopigment in the

neurons and in the eye, that are associated with seizures, motor and intellectual deterioration, visual impairment and early death³¹⁷. In the majority of the cases, the pattern of inheritance is autosomal recessive with onset during childhood. Mutations in a total of 10 genes (*PPT1*, *TPPI1*, *CLN3*, *CLN5*, *CLN6*, *MSFD8*, *CLN8*, *CTSD*, *ATP13A2*, *KCTD7*) have been associated with infantile (INCL, Santavuori-Haltia), late-infantile (LINCL, Jansky-Bielschowsky), and juvenile (JNCL, Batten disease, Spielmeyer-Vogt) forms of the disease³¹⁷. Kufs disease is a rare form of NCL with onset during adulthood. In contrast to the childhood NCLs, vision is normal and the syndrome exhibits either autosomal dominant or recessive inheritance. Mutations in *CLN6* and *GRN*, initially described in late-infantile NCL and frontotemporal dementia, respectively, have been recently reported in cases of recessive adult NCL^{233,318}.

Kufs disease with autosomal dominant inheritance was first described in 1971 in a large kindred from New Jersey, USA (Parry family; MIM 162350) with more than 22 affected individuals over 7 generations³¹⁹. Additional smaller dominant families have been later described. The molecular basis of the dominant form of adult NCL was obscure but, recently, Nosková *et al.* reported variants in *DNAJC5* in 5 families. In parallel, reported here, we mapped the gene on chromosome 20p13.33 causing Kufs disease in the Parry family. We also took advantage of this unique family to identify the causative p.L116del mutation in *DNAJC5* gene by using Next Generation Sequencing (NGS). Sequencing of additional Kufs individuals allowed us to identify the same p.L116del mutation segregating in another well characterized family³²⁰. The phenotype was revisited in all the family members and we provide here a full clinical characterization on 19 mutation positive individuals. We also report a p.L115R missense mutation in another individual with Kufs disease without family history.

2.2.3 Materials and Methods

2.2.3.1 Subjects

In this study, two families with known history of AD Kufs disease were first investigated. The first kindred is an American family (**Figure 1A**) with British ancestry from New Jersey (Parry family)³¹⁹. Clinical information and neurological examinations were completed during two field

trips by four of us (E.A., F.A., S.L., S.F.B.). Key family members were subsequently contacted by phone to obtain updates on the clinical status of all family members. The clinical update on the second family (**Figure 1B**) from Alabama, USA, was obtained by E.F. who previously reported this family³²⁰. Finally, we studied 5 additional families, as well as 1 sporadic case with clinical manifestations and brain biopsy compatible with Kufs disease for a total of 8 unrelated cases in our cohort. After informed consent, we collected blood samples and extracted genomic DNA according to standard protocols.

2.2.3.2 Genotyping and linkage analysis

We first started to investigate the Parry family with a genome scan of 6 affected and 13 unaffected individuals. The genotyping was conducted at the Montreal Genome Centre as described elsewhere¹⁶⁵.

2.2.3.3 Identification and validation of variants

Three affected individuals (V.12, V.14 and VI.2) from distinct branches of the Parry family (**Figure 1A**) were selected for exome sequencing (see supplementary methods). dbSNP 132 was used to exclude common variants from the general population. For the validation of NGS variants, primers were designed with *Primer 3* software to amplify the coding region encompassing the putative variation. For further screening of *DNAJC5* in the Alabama family and other cases at least 50 bp of the exon intron boundaries were amplified and sequenced as described elsewhere¹⁶⁶.

2.2.4 Results

2.2.4.1 Linkage analysis and exome sequencing

Using a combination of various microsatellites and SNP markers, linkage analysis revealed a maximum multipoint LOD score of 5.3 at SNP rs11204451 and a candidate region of approximately 3.8 megabases (Mb) on chr20q13.33 in the Parry family (**supplementary Figures 1,2A**). Detailed alignment statistics of the exome sequencing performed in this family

are summarized in **supplementary Table 1**. Within the 20q13.33 candidate interval, a 3 base pairs deletion in exon 3 of the *DNAJC5* gene (p.L116del) was found in the three affected individuals and validated by Sanger sequencing in all other affected individuals from the family (Figs.1A, 2). The same p.L116del was also found in the Alabama family (Fig. 1B). We did not find haplotype sharing between these two American families suggesting that the p.L116del mutation is not a founder mutation (**supplementary Figure 2A,B**). Further screening of the *DNAJC5* gene in 6 unrelated cases revealed another mutation (p.L115R) in a sporadic case without familial history. The two mutations were not found in available unaffected family members as well as in 380 control chromosomes.

2.2.4.2 Clinical manifestations of *DNAJC5* mutation positive individuals

Clinical data on all the mutation positive individuals from the Parry and Alabama families, as well as on the sporadic case with Kufs disease are summarized in **Table 1**. In at least one case of the Parry and Alabama families, the diagnosis has been confirmed by brain biopsy and/or autopsy, with granular osmophilic deposits found on electron microscopy examination^{319,320}. In the Parry family, the clinical manifestations of 16 definite affected individuals including 9 p.L116del mutation positive individuals and 7 obligated carriers were virtually identical. The clinical syndrome was of progressive myoclonus epilepsy with myoclonus, generalized tonic-clonic (GTC) seizures, ataxia, speech deterioration and dementia. Mean age of onset and of death were 30 and 45 years old respectively. The clinical manifestations were also similar in the Alabama family individuals exhibiting the same p.L116del mutation in *DNAJC5*, except for parkinsonism reported in 6 individuals³²⁰. One mutation positive individual (VI.7, **Figure 1B**) has been previously reported as unaffected³²⁰, but revisiting the clinical information has confirmed early manifestations of Kufs disease over the recent years. This individual is now 32 years old and myoclonus and GTC seizures began at the age of 29. Clinical manifestations of the sporadic case (Kufs3) were mainly myoclonic epilepsy followed by ataxia and dementia. The onset occurred later at 43 years old and death at 58 years old. No family history was reported. Examination of ultrastructural pathology revealed granular osmophilic deposits (data not shown).

2.2.5 Discussion

Using a combination of genome scan and whole-exome sequencing, we describe here the identification of a p.L116del mutation in *DNAJC5* segregating with Kufs phenotype in the original Parry family. Screening of additional familial and sporadic Kufs cases revealed the same p.L116del segregating in another autosomal dominant family from Alabama ³²⁰ as well as the p.L115R in a sporadic case. Fine genotyping of the two families described here revealed that the p.L116del mutation occurred on two distinct haplotypes, suggesting a recurrent rather than a founder mutation. Overall, these unrelated familial and sporadic cases with mutations in *DNAJC5* represent 38% of our cases with unexplained Kufs disease.

Mutations in *DNAJC5* have been recently described by Nosková *et al.* who reported two mutations (p.L115R and p.L116del) in a total of five families. In their study, the p.L116del was found in two families; one American family, and one Czech family ³²¹. Recent investigation on the origin of the proband of this later American family revealed that this affected individual was in fact from the Parry family (Kmoch *et al.* personal communication). Surprisingly, they reported negative results in the Alabama family (see UCL562 family ³²¹). However, resequencing of an affected member of this family allowed the identification of the p.L116del mutation thereby corroborating our findings (Kmoch *et al.* personal communication).

After this original finding, there have been two additional reports on mutations implicating the *DNAJC5* gene. A total of 4 families in Benitez *et al.* and Velinov *et al.* were reported. Careful examination of the origin of these families revealed that three of them were already described as UCL519, UCL562, UCL563 in Nosková *et al.*, 2011. Therefore, by eliminating these redundancies, and including the new data reported here, the p.L116del mutation is found in 3 families ^{319–321} and the p.L115R in a total of 5 families ^{321,322}.

The age of onset and clinical manifestations were homogeneous among *DNAJC5* mutation positive individuals. Progressive myoclonus epilepsy beginning at around 30 years old with late dementia and death approximately 15 years after onset was characteristic. Penetrance appears to be nearly 100%. A few individuals from the Alabama family also exhibited

parkinsonism. Interestingly, one individual from the Parry family (VI.21, **Figure 1A**) was said to be affected but does not carry the *DNAJC5* mutation. However, the clinical manifestations were somewhat different, with earlier age of onset of the myoclonus and epilepsy (21 years old), as well as later survival (62 years old). This individual had an occipital lobe astrocytoma which may have caused his seizure disorder and, in the context of the family history, led to the incorrect assumption that he also had Kufs disease. However, he eventually developed late onset of ataxia, speech disturbance and dementia. Whether he had another neurodegenerative disorder remains unclear.

DNAJC5 encodes for the cysteine string protein (CSP α), a presynaptic J protein expressed in neural tissues, as well as synaptic³²³ and clathrin-coated vesicles³²⁴. CSP α is implicated in the fusion of synaptic vesicles and it has been shown to interact with SNAP-25 via a chaperone complex formed with Hsc70 (Heatshock cognate 70) and SGT (small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein) to enable the formation of a functional SNARE-complex. The two leucine residues (L115 and L116) mutated in Kufs families are located in the cysteine-string domain and are implicated in membrane binding and palmitoylation-dependent sorting of the molecular chaperone CSP α ³²⁵. Expression of EGFP-tagged CSP α in neuronal cells revealed that CSP α proteins bearing the p.L116del and the p.L115R mutations are indeed less efficiently palmitoylated than wild-type protein, and exhibit an abnormal pattern of colocalization with markers of ER and Golgi apparatus³²¹. In addition, immunohistochemical staining of CSP α in brain tissue from Kufs individuals revealed a significant reduction of CSP α staining compared to control individuals³²¹. Those mutations linked to AD Kufs disease thus affect palmitoylation and intracellular location of CSP α which could be associated with a decrease in the level of the CSP α protein in the brain of Kufs individuals.

Recent work has shown that deletion of CSP α in mice produces an abnormal conformation of synaptic protein SNAP-25 which is then subject to degradation. This translates to a 50% decrease in SNAP-25 levels as well as in SNARE-complex assembly^{326,327}. As a consequence, knock-out mice for CSP α are normal at birth but show progressive neurodegeneration by 2-4 weeks followed by premature death at 2 months^{328,329}. This progressive neurodegeneration is consistent with the clinical manifestations observed in patients with Kufs disease. *In vitro*

studies with mice hippocampal neurons also showed that this progressive neurodegeneration primarily occurs in GABAergic synapses whereas glutamatergic synapses are preserved³³⁰. It is thus possible that this selective loss of inhibitory neurons could contribute to the seizures phenotype observed in individuals with Kufs disease. The study of the CSP α function thus indicates that this protein contributes to the rescue of unfolded synaptic proteins. Similar mechanisms have been suggested to underlie various neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Huntington's, Parkinson's disease, as well as Amyotrophic Lateral Sclerosis³³¹⁻³³³. Therefore, the investigation on how mutations in *DNAJC5* lead to severe neurodegeneration and epilepsy in individuals with Kufs disease may provide additional insights on the mechanisms causing more common neurodegenerative disorders.

2.2.6 Acknowledgments

This project was funded by La Fondation GO. MCD is supported by the Réseau de Médecine Génétique Appliquée, the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Fonds de la Recherche du Québec-Santé (FRQS). PC and GAR are supported by the CIHR. PLT is supported by the FRQS. JAD and SFB are supported by the National Health and Medical Research Council (Australia). The authors wish to thank the families for their participation in the study and Olivia Galante as well as Pawan Mann for technical assistance.

2.2.7 Figures

Figure 2.2.7.1 : Pedigree des familles américaines

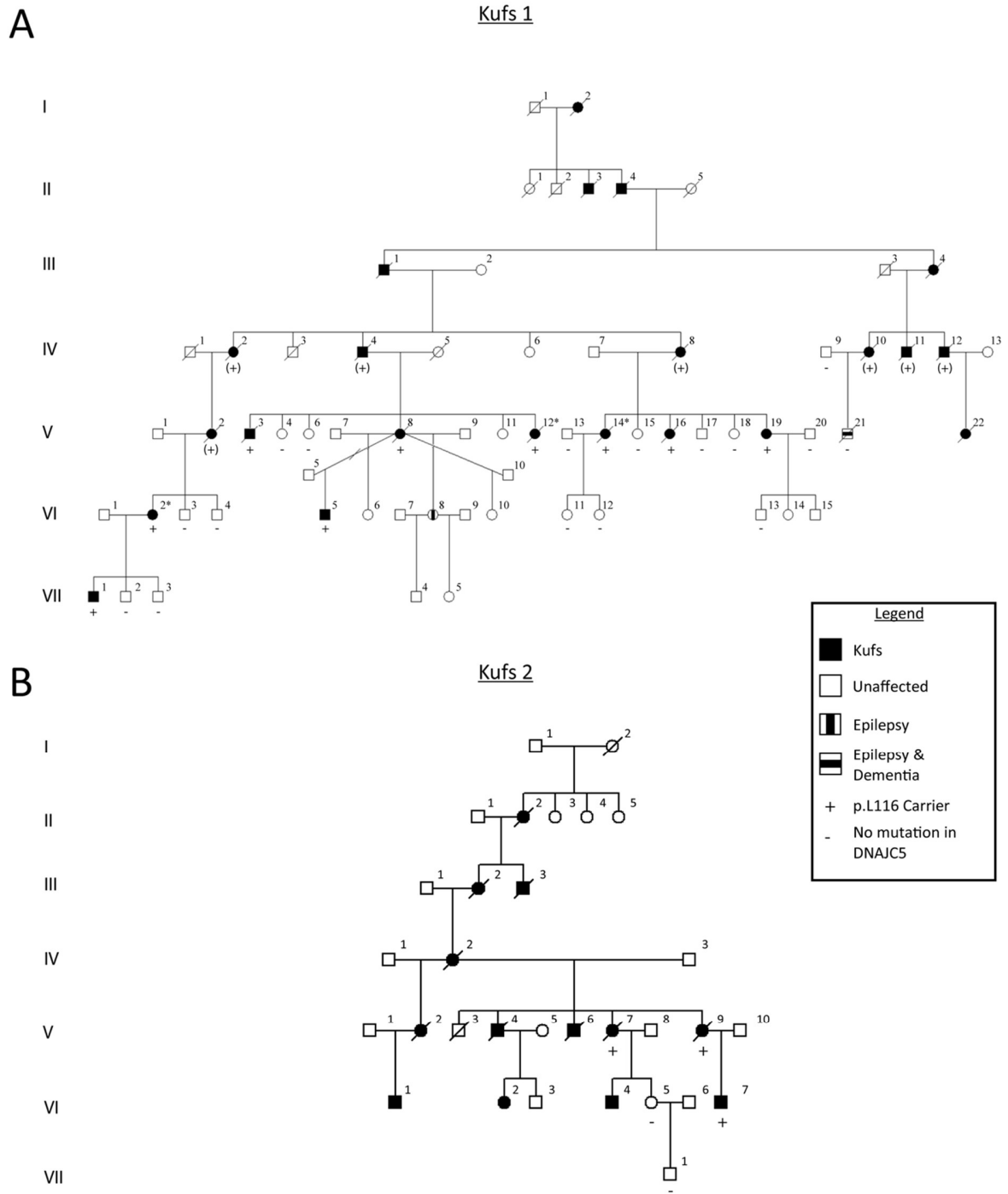


Figure 1: Pedigree of the American families. **A.** Pedigree of the Parry family (Kufs1): Samples with an asterisk (*) were used for Next Generation Sequencing. **B.** Pedigree of the Alabama family (Kufs2). **A, B.** The mutation p.L116del is carried by all affected individuals for whom DNA sample was available. + p.L116del positive individual; - no mutation in *DNAJC5*; (+) obligate mutation carrier; individual with epilepsy (symbol with vertical bar) or epilepsy and dementia (symbol with horizontal bar)

Figure 2.2.7.2 : La mutation p.L116del dans le gène *DNAJC5* retrouvée dans deux familles américaines.

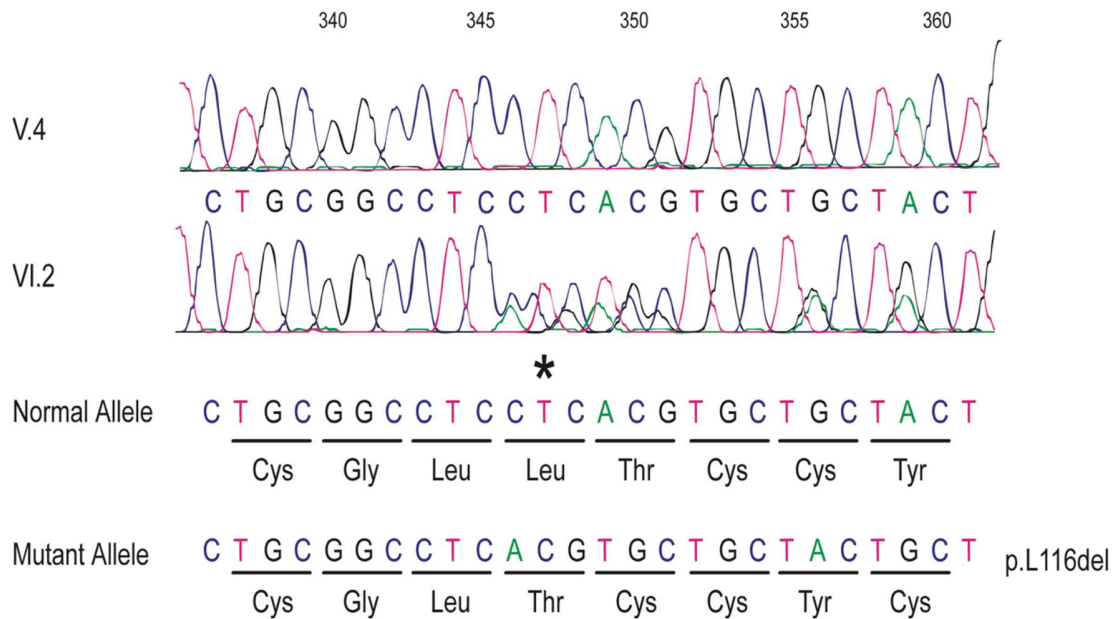
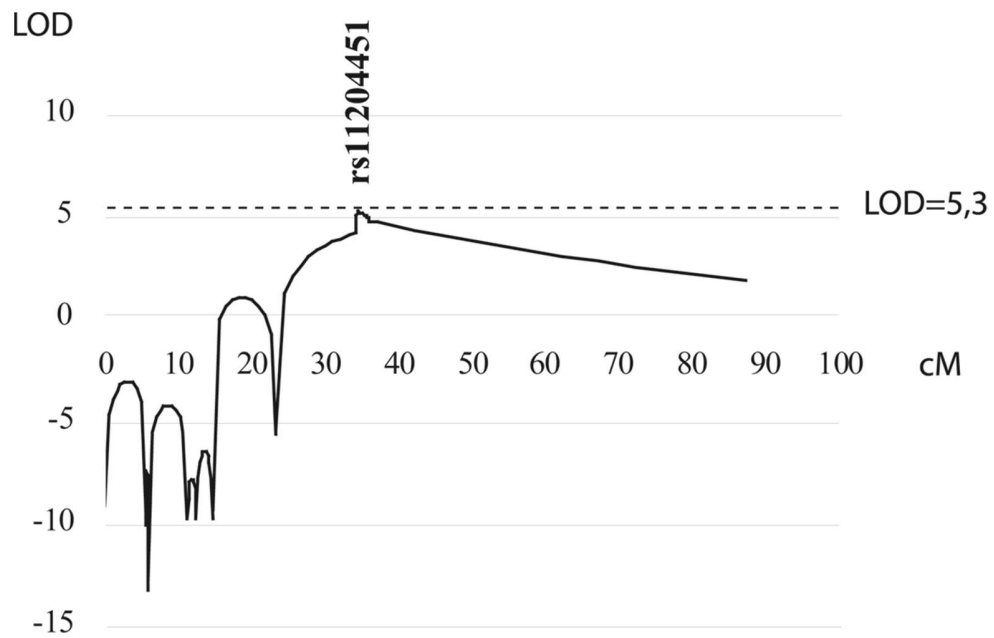


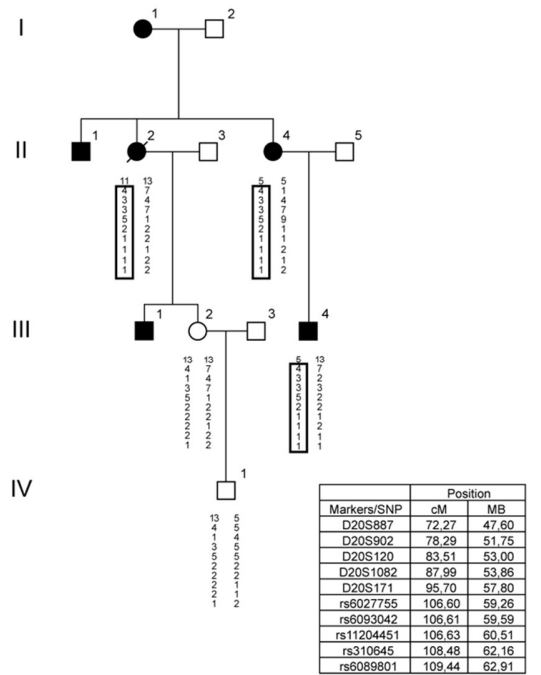
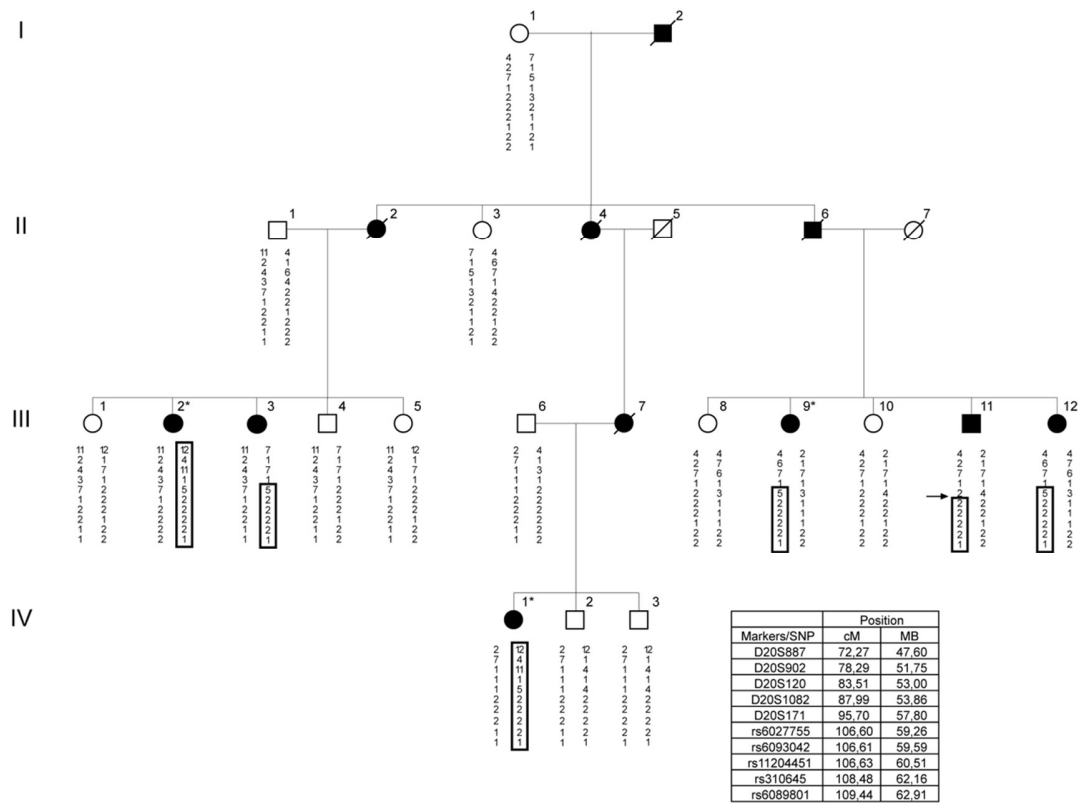
Figure 2: The p.L116del mutation in *DNAJC5* gene found in two American families. Traces from one affected and one unaffected individuals from the Parry family are shown.

Figure 2.2.7.3: Graphique montrant les scores LOD multipoint.



Supplementary figure 1: Graph showing multipoint LOD scores. A hit of 5.3 was obtained at SNP rs11204451. Multipoint LOD scores were calculated using the Simwalk2 program, assuming autosomal dominant inheritance with 90% penetrance, a gene frequency of 0.0001 and marker allele isofrequencies.

Figure 2.2.7.4 : Haplotype de la maladie dans les familles Kufs1 et Kufs2



Supplementary figure 2: A. Pedigree of the Parry family (Kufs1). **B.** Pedigree of the Alabama family (Kufs2). Samples with an asterisk (*) were used for Next Generation Sequencing. Boxes indicate disease haplotype.

2.2.8 Tables

Tableau 2.2.8.1 : Statistiques détaillées du séquençage de nouvelle génération.

Sample	Number of total reads	% reads properly paired	Mean Coverage	% Target Base >15x	% Target Base >30x	% Target Base >40x
V.12	85003048	93,12	92,94	86,5	78,3	72,4
V.14	57385280	84,91	58,96	83,1	69,5	59,4
VI.2	56561938	91,04	61,19	82,7	69,5	60,0

Supplementary table 1: Detailed alignment statistics of the Next Generation Sequencing data.

Chapitre 3 : Une mutation dans le gène *ELOVL4* cause un syndrome neurocutané: le syndrome de Giroux-Barbeau

3.1 Présentation de l'article

En 1972, les docteurs Giroux et Barbeau ont décrit une grande famille canadienne-française atteinte d'un syndrome neurocutané se présentant sous forme d'ataxie spinocérébelleuse et d'erythrokratodermie de type *variabilis* – Le syndrome Giroux-Barbeau. L'étude présentée ci-dessous a été entreprise suite aux travaux effectués dans le laboratoire du Dr Patrick Cossette. C'est en 2008 que l'étude génétique de cette famille a débuté. En effet, par clonage positionnel, le gène causant la maladie a été localisé sur le chromosome 6p12.3-q16.2. En utilisant la méthode Sanger, plusieurs gènes candidats ont été séquencés à la recherche de la mutation causative. Toutefois, aucune mutation n'a été identifiée. Alors, considérant la structure familiale, nous avons séquencé les régions codantes de trois patients de la famille en utilisant une méthode à haut débit. Nous avons émis l'hypothèse que la variation causale serait présente chez tous les patients atteints de la famille et qu'elle serait localisée dans l'intervalle précédemment identifié. Dans cet article, la découverte de la cause génétique du syndrome de Giroux-Barbeau est présentée.

3.1.1 Contributions des auteurs

Design et conception : MCD, MTG, GAR, PC

Acquisition de données : MCD, MTG, CAD, DKN, MG, CMa, CMe, AN

Analyses des données : MCD, MTG, CMa, CMe, CAD, DKN

Rédaction du manuscrit et des figures: MCD, MTG, PC, DKN

Révision du manuscrit: CMa, CMe, CAD, CAD, MTG, GAR, AN

Financement: PC, GAR

Support administratif et technique: MG, CMe

Supervision: PC, DKN

3.2 Expanding the clinical phenotype associated with *ELOVL4* mutation: study of a large French-Canadian family with autosomal dominant spinocerebellar ataxia and erythrokeratodermia (SCA34).

Article publié dans JAMA Neurology, 2014, volume 71(4), page 470-475

Maxime Cadieux-Dion B.Sc¹, Maude Turcotte-Gauthier MSc¹, Anne Noreau M. Sc², Caroline Martin B.Sc¹, Caroline Meloche M.Sc¹, Micheline Gravel¹, Christian Allen Drouin MD³, Guy A. Rouleau, MD, Ph.D², Dang Khoa Nguyen MD, Ph.D¹ and Patrick Cossette MD, Ph.D¹

1) CHUM Research Center, Notre Dame Hospital, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada. 2) Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University, Montreal, Quebec, Canada. 3) Grand Portage Hospital, Rivière du Loup, Quebec, Canada.

3.2.1 Abstract

Importance: The autosomal dominant spinocerebellar ataxias (SCAs) are a complex group of neurodegenerative disorders with significant genetic heterogeneity. Despite the identification of 20 SCA genes, the cause of the disorder in a significant proportion of families with SCA remains unexplained. In 1972, a French-Canadian family segregating a combination of SCA and erythrokeratodermia variabilis (EKV) in an autosomal dominant fashion was described.

Objective: To map and identify the causative gene in this large family with SCA and EKV using a combination of linkage analysis and whole-exome sequencing.

Design, setting and participants: A total of 32 individuals from the family have undergone complete neurologic and dermatologic examinations.

Main outcomes and measures: Mutations in *ELOVL4* have been reported in families with macular degeneration. Recently, homozygous mutations were found in patients with ichthyosis, spastic paraplegia, and severe neurodevelopmental defects. In the present study, we report on a

heterozygote mutation in *ELOVL4* in affected individuals from the family with SCA and EKV. The mutation segregates with a milder phenotype consisting of early-onset patches of erythema and hyperkeratosis, as well as SCA manifesting in the fourth or fifth decade of life.

Results: We describe the mapping and the identification of a c.504G>C transversion in *ELOVL4* resulting in the p.L168F substitution. We also provide clinical characterization of the phenotypes in 19 mutation carriers.

Conclusions and relevance: We report, to our knowledge, the first mutation in *ELOVL4* that is associated with SCA and EKV. This gene encodes a member of the elongase family, which is responsible for the elongation of very long-chain fatty acids (at least 26 carbons). These fatty acids participate in a wide variety of physiological functions, including skin barrier formation and peroxisome β -oxidation. Overall, these results provide additional insight into the pathogenesis of these complex neurodegenerative disorders.

Mots clés:

Elov14, SCA34, Giroux-Barbeau Syndrome, EKV

3.2.2 Introduction

The autosomal dominant spinocerebellar ataxias (SCAs) are a complex group of neurodegenerative disorders characterized by progressive cerebellar ataxia of gait and the extremities variably associated with other neurologic signs. The prevalence of inherited ataxias is approximately 3 to 6 individuals per 100 000 people in the general population³³⁴. At least 32 distinct loci have been identified for SCAs and, of these, 20 SCA genes have so far been documented. Nucleotide repeat expansions, genomic deletions and duplications, and point mutations have been associated with the disease, suggesting genetic heterogeneity of the pathogenic mechanisms³³⁵. To date, a significant proportion of SCA in families remains genetically unexplained.

In 1972, a unique French-Canadian (FC) family segregating a combination of ataxia and skin lesions in an autosomal dominant fashion (SCA34, OMIM 133190) was reported by Giroux and Barbeau³³⁶. The skin lesions were typical of erythrokeratoderma variabilis (EKV, OMIM

133200), a heterogeneous group of diseases characterized by erythematous lesions and hyperkeratosis. The pure form of EKV has been associated with mutations in 2 connexin genes³³⁷, *GJB3* and *GJB4*, on chromosome 1p35.1, but additional genes causing EKV remain to be identified. There is growing evidence that mutations in genes causing keratodermias also predispose people to various neurologic disorders, including deafness, peripheral neuropathy, and mental retardation^{338,339}. Interestingly, a mutation in the gene *GJB1* has recently been associated with X-linked ataxia with peripheral nervous system features³⁴⁰. However, to our knowledge, neither skin lesions nor keratoderma have been reported in families with SCA except for the FC family described by Giroux and Barbeau^{336,341,342}.

Preliminary studies with several affected individuals from this family have suggested linkage at the EKV1/EKV2 locus³⁴¹, but no mutation has been identified. We describe in the present study the mapping of the gene for this unique syndrome on chromosome 6p12.3-q16.1, as well as the identification of a p.L168F (c.504G>C) mutation in the gene *ELOVL4* (RefSeq NM 022726) by using whole-exome sequencing. The p.L168F mutation segregates well with the disease, and we provide detailed clinical characterization of 19 mutation-positive individuals from this family.

3.2.3 Materials and Methods

3.2.3.1 Participants

We investigated an FC kindred presenting a combination of erythrokeratoderma with ataxia. The description of clinical phenotypes of the early generations of the family has been previously described³³⁶. We collected genomic DNA from 32 individuals of this family. These individuals underwent complete neurologic and dermatologic examinations. Measurement of long-chain fatty acids (C22, C24, and C26) was performed on 2 affected individuals (V-3 and V-24 **Figure 1A**) (Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke). An additional cohort of 95 patients with unexplained SCA was used for gene screening. After participants provided written informed consent, genomic DNA was extracted from blood samples using standard protocols. This project

was approved by the research ethics committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. The participants received no financial compensation.

3.2.3.2 Genotyping and linkage analysis

A genome-wide scan of the FC family was performed at deCODE genetics using 524 evenly distributed microsatellite markers covering the whole genome at intervals of approximately 8 centimorgans. Microsatellite markers used to refine the disease locus were genotyped by polymerase chain reaction incorporating primers with fluorescently labeled M13mp18 sequence tails (primer and polymerase chain reaction details available on request), as described elsewhere³⁴³. We calculated pairwise logarithm of odds scores (MLINK program, version 5.1; LINKAGE; <http://www.jurgott.org/linkage/LinkagePC.html>) under the assumption of an autosomal dominant mode of inheritance, a disease frequency of 1:10 000, 90% penetrance, 1/10 000 of phenocopy, and allele isofrequency. We also performed a multipoint linkage analysis using the same variables with a different program (SimWalk, version 2.91; University of California, Los Angeles, Human Genetics; <http://www.genetics.ucla.edu/software/>).

3.2.3.3 Copy number variation

A fine-tiling array comparative genomic hybridization, covering the entire chromosome 6, was performed on one affected individual from the large FC family (participant IV-16). We used 3 different arrays with a probe density of 1/4000 base pair (bp), 1/8000 bp, and 1/20 000 bp (NimbleGen)³⁴⁴. We also performed a whole-genome genotyping and copy number variation analysis (human 610-Quad BeadChip; Illumina)^{345,346}.

3.2.3.4 Exome sequencing and validation of variants

Three affected individuals (V-3, V-5, and V-24) from distinct branches of the family (**Figure 1A**) were selected for exome sequencing. Genomic DNA (5 µg) was fragmented and enriched (SureSelect Human All Exon V4 kit; Agilent Technologies). The prepared library was sequenced with paired-end reads (HiSeq2000; Illumina). The reads were mapped against the

human genome (hg19) (Burrows-Wheeler Aligner; <http://bio-bwa.sourceforge.net>). Reads with a unique mapping location were kept for downstream analysis. Genome Analysis Tool Kit ³⁴⁷ and ANNOVAR ³⁴⁸ were used for the calling of single nucleotide variations, small insertions, and small deletions (indels). Called variants were filtered against dbSNP132 as well as individuals from our in-house exome database. For the validation of next-generation sequencing variants, primers were designed with the software Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) to amplify the coding region encompassing the putative variation.

3.2.3.5 Sequencing of *ELOVL4* in SCA patients

We sequenced all of the coding exons as well as 20 bp of the exon-intron boundaries of the gene *ELOVL4* in 95 patients with SCA. Polymerase chain reaction primers were designed using Primer 3. The primer sequences and polymerase chain reaction conditions are available on request. The amplicons were then sequenced (ABI 3730xl DNA Analyzer; Life Technologies) and analyzed (Mutation Surveyor, version 3.0; Softgenetics).

3.2.4 Results

3.2.4.1 Linkage analysis and exome sequencing

We first excluded linkage at the EKV1/EKV2 and MEDNIK loci in the FC family (data not shown). Genome-wide linkage analysis revealed 3 positive chromosomal regions with a logarithm of odds score superior to 1.5 on chromosomes 1, 6, and 7 (data not shown). Further analysis with additional markers and additional affected individuals confirmed linkage to chromosome 6, with a maximum logarithm of odds score of $Z = 5.33$ at $\theta = 0$ found for marker D6S452 (Supplement [eFigure]). Haplotype analysis allowed the identification of a candidate locus of 46.8 megabases between markers D6S459 and D6S417 at chromosome 6p12.3-q16.1. We also performed comparative genomic hybridization analysis that did not reveal significant copy number variations in this candidate gene region. In turn, whole-exome sequencing allowed us to identify a p.L168F (c.504G>C) mutation in *ELOVL4* (**Figure 1B**) (RefSeq NM_022726), a gene located in the candidate interval (**eTable 1**). This genetic variation was found in the 3

affected individuals (V-3, V-5, and V-24). Sanger sequencing confirmed that this genetic variation segregated with the disease haplotype in 19 individuals. This mutation was not found in 189 additional control individuals, nor was it found in public databases, such as 1000 Genomes (<http://browser.1000genomes.org>) and Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>). Screening of 95 additional patients with SCA failed to identify additional mutations in *ELOVL4*.

3.2.4.2 Clinical manifestations of mutation carriers

The summary of the detailed clinical examination performed on 19 mutation carriers from the FC family is reported in the supplement (**eTable 2**). Erythrokeratoderma variabilis (n = 3), ataxia (n = 1), or a combination of both phenotypes (n = 11) was found in the mutation carriers; the others were unaffected. As previously described³³⁶, 2 types of skin lesions can be distinguished. First, erythematous and hyperkeratotic plaques are most commonly observed over the dorsal aspects of the hands and feet, the elbows, the ankles, and the external ears. The hyperkeratosis usually is more prominent than the erythema, and a fine scaling is observed over those persistent plaques (**Figure 2A**). Second, transient, figurate, and erythematous patches are observed over the legs, thighs, and buttocks (**Figure 2B**). Both types of lesions are usually symmetrically distributed and vary in severity among patients, becoming worse in winter and improving with the use of emollients. The onset is in early infancy and, in most cases, the lesions disappear after the patient is 25 years of age. In all patients, hair, nails, and scalp were normal. No hearing impairment was detected, and cognition appeared normal. The onset of gait ataxia usually occurred in the fourth or fifth decade of life (mean, 51 years), but it could occur as early as the third decade in some patients. The progression of gait disturbance is very slow. Patients may need to use a cane after 10 years of disease progression. The affected individuals in the present study usually required a walker in their mid-60s or 70s, although other medical conditions may have contributed to the gait disturbance (eg, aortic aneurysm, metastatic breast cancer, chronic alcohol consumption and severe emphysema) (**eTable 2**). Magnetic resonance imaging conducted in 7 individuals with mild or moderate ataxia showed cerebellar and pontine atrophy (**Figure 2C**). In these affected individuals, the atrophy was more severe in the vermis than in the cerebellar hemispheres. In turn, 2 individuals with EKV lesions without ataxia had

normal magnetic resonance imaging findings. Individual V-24, who had EKV lesions and very mild ataxia, also exhibited cerebellar hypometabolism on 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (**Figure 2D**). An electromyogram obtained in 8 affected family members, including 1 study participant (13%) with EKV lesions only, disclosed mild axonal peripheral neuropathy in 4 of the 8 individuals (50%) (**eTable 2**). The mutation was also found in 4 individuals (V-16, VI-4, VI-6, and VI-11; 21%) (**Figure 1A**) without any neurologic manifestations or skin lesions. Lipid analysis from whole-blood samples of 2 affected individuals (V-3 and V-24) did not reveal abnormal levels of long-chain fatty acid (C22, C24, and C26). However, the linoleic acid level was slightly above the reference range.

3.2.5 Discussion

We evaluated a p.L168F mutation in *ELOVL4* segregating with SCA and EKV in a large FC family by using a combination of genome scan and whole-exome sequencing. Based on the strong linkage found on chromosome 6p12.3-q16.1, we filtered for genetic variants and found the *ELOVL4* mutation as the only coding genetic variation in 3 affected individuals who were tested. The mutation segregates well with the disease phenotype and was not found in control individuals or in public databases. Moreover, *ELOVL4* is a very good candidate gene because mutations, in both human and animal models, have been associated with skin defects and neurologic impairments^{289,349}. Taken together, our data are consistent with the identification of *ELOVL4* as the causative gene for the EKV and SCA in this FC family.

The *ELOVL4* gene encodes for a member of the elongase family and is involved in the elongation of very long-chain fatty acids. The Elov14 protein is expressed in the retina, brain, testes, and skin³⁵⁰. As a 314-amino acid protein, Elov14 is predicted to have 5 transmembrane segments, a histamine cluster dideoxy binding motif, and a dilysine endoplasmic reticulum retention motif (**Figure 1C**)³⁵¹. Biochemical analysis revealed its implication in the biosynthesis of very long-chain fatty acids, specifically elongating both saturated and unsaturated C26 to C28 products and C28 to products of 30 to 38 carbons³⁵². Very long-chain fatty acids participate in a wide variety of physiological functions, including skin barrier formation²⁸⁹ and peroxisome β -oxidation, which is known to be involved in several

neurodevelopmental disorders ³⁵³. After differentiation of the keratinocytes, different layers of the epidermis are developed, including the stratum corneum ³⁵⁴. This outermost layer of the epidermis acts as a transepidermal barrier that prevents dehydration. It is mainly composed of ceramides containing ω -hydroxy long-chain fatty acids. Interestingly, knockout mice for *Elovl4* die several hours after birth and show severe skin atrophy. They also display reduced body movement, suggesting abnormal neurologic behavior ³⁵⁵.

The gene *ELOVL4* has been associated with a juvenile form of macular degeneration: Stargardt disease type 3 (STGD3; OMIM600110) ^{356–358}. The disease segregates in an autosomal dominant pattern of inheritance, and patients heterozygous for these mutations show progressive macular degeneration and loss of central vision. Three pathogenic variants have been reported ³⁵⁹, resulting in a truncated protein lacking the dilysine endoplasmic reticulum retention motif. *In vitro* studies have shown that mutant proteins are mislocalized and exert a dominant negative effect on the wild-type protein to form aggregates of both normal and aberrant *Elovl4* ³⁵¹. Interestingly, 2 additional homozygous mutations were found in patients with ichthyosis and severe neurologic disturbances, such as spastic paraplegia and neurodevelopmental defects ²⁸⁹. The p.L168F missense mutation described in the present study is located within the third transmembrane domain (**Figure 1C**) and is predicted to be pathogenic by Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>) and PROVEAN ³⁶⁰, and possibly damaging by Polyphen2 ³⁶¹. Further characterization of the mutation will be necessary to understand the role of the mutation in the disease. It is possible that the localization of the mutation in the FC family in a different domain of the protein could be responsible for the phenotypic differences observed in patients with Stargardt disease type 3.

In the present study, a total of 19 *ELOVL4* p.L168F mutation carriers were identified for whom we obtained detailed neurologic and physical examination results (Supplement [eTable 2]). Most (11 [58%]) individuals bearing the p.L168F mutation exhibited a combination of EKV and ataxia. Other mutation carriers (3 [16%]) showed only EKV, most likely because they were younger (aged 36, 33, and 44 years). One (5%) mutation carrier showed cerebellar ataxia at 55 years, without apparent skin lesions. The EKV lesions are usually apparent during childhood, may be minimized by hydrating lotions, and in some instances disappear over time. Therefore,

we cannot exclude that EKV has been overlooked in this individual despite careful assessment. Alternatively, incomplete penetrance for the skin phenotype may exist. Finally, we have identified asymptomatic mutation carriers (4 [21%]), suggesting incomplete penetrance for EKV (**eTable 2**). Because of their relatively young age and considering the late-onset disease course of the ataxic features, it is possible that these carriers may eventually become symptomatic.

The heterogeneity of clinical manifestations associated with mutations in *ELOVL4* in humans is intriguing. Although originally described in macular degeneration (Stargard disease type 3) without skin lesions, homozygous mutations have been associated with ichthyosis, encephalopathy, and epilepsy, without macular degeneration²⁸⁹. In our FC family, EKV lesions were reminiscent of ichthyosis, but we found no clinical evidence of macular degeneration. In *Elovl4* knockout mice, skin lesions appear to be a common feature, but depletion of very long-chain polyunsaturated fatty acids in the retina does not seem to affect visual function³⁶². These observations are consistent with other EKV and ichthyosis genes that are associated with heterogeneous neurologic manifestations^{337,362}.

3.2.6 Conclusions

To our knowledge, we have described, for the first time, a missense mutation in the gene *ELOVL4* associated with SCA as well as EKV. Finding additional mutations in *ELOVL4* in other SCA families, as well as functional characterization of these mutations, should provide additional insights on disease pathogenesis.

3.2.7 Acknowledgments

The authors wish to thank the family for their participation in the study. MCD is supported by the Réseau de Médecine Génétique Appliquée (RMGA) and La Fondation GO. DKN and C.Martin are supported by the Fonds de Recherche du Québec –Santé. PC and GAR are supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). AN has received a Doctoral Award - Frederick Banting and Charles Best Graduate Scholarship by the CIHR. We are grateful

for Dr. Yves Léo Lamarre for reviewing all nerve conduction studies and electromyographic recordings. The authors report no conflict of interest. Patrick Cossette had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

3.2.8 Figures

Figure 3.2.8.1 : Identification et caractérisation d'une mutation faux-sens dans le gène *ELOVL4*

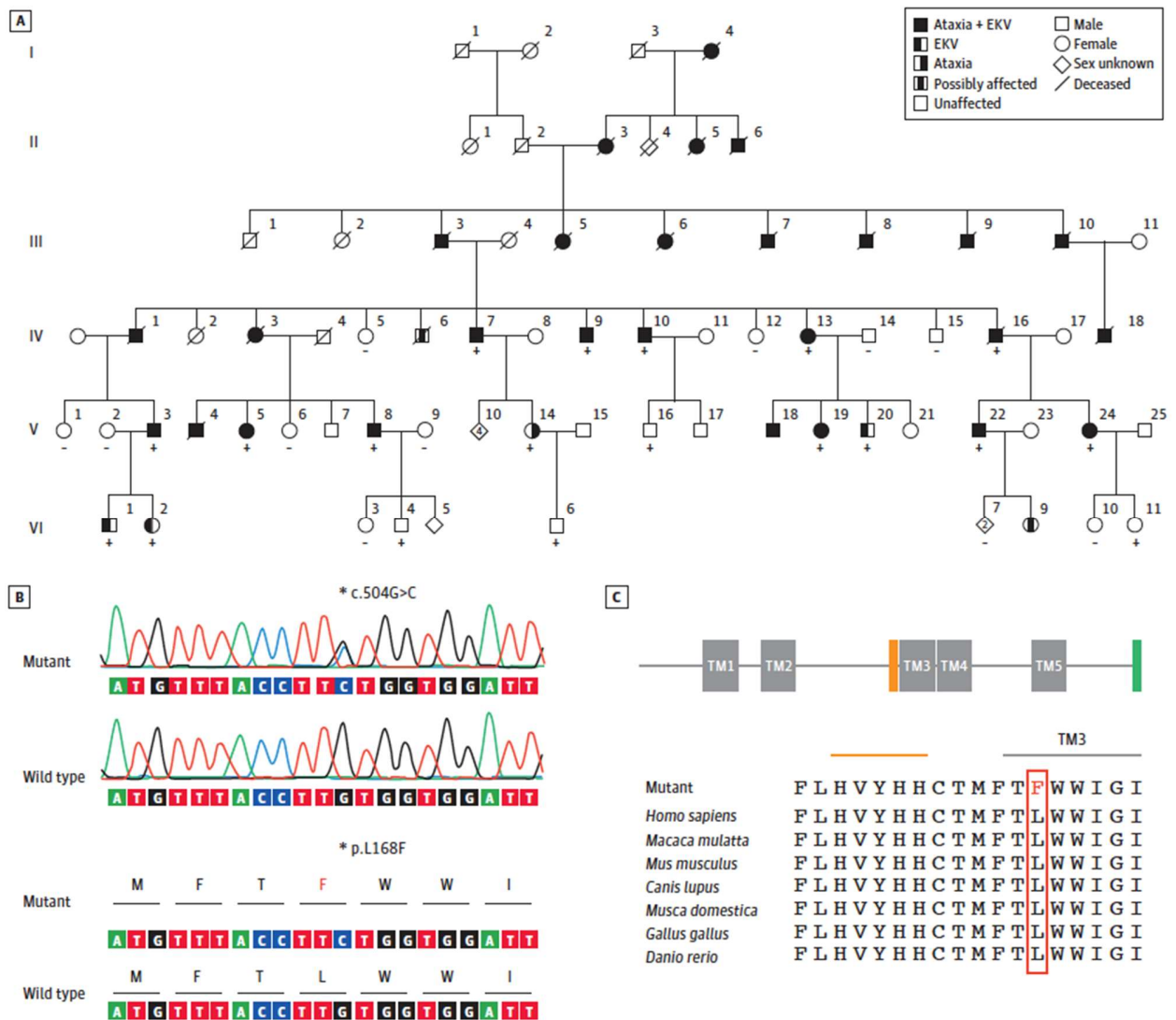


Figure 1 : Identification and characterization of a missense mutation in *ELOVL4*. A) Pedigree of the French-Canadian family in whom the mutation was found. Patients V-3, V-5 and V-24 were used for exome sequencing. Among samples where DNA was available, we identified individuals with (+) or without (-) a mutation in *ELOVL4*. B) In affected individuals,

the c.504G>C transversion was observed, resulting in the p.L168F substitution. C) The protein is composed of 5 transmembrane domains (gray), a histidine cluster dideoxy binding motif (orange) and an endoplasmic reticulum retention signal (green). The mutation involves a well conserved residue and is located within the third transmembrane domain.

Figure 3.2.8.2 : Phénotype clinique de la famille Canadienne-française

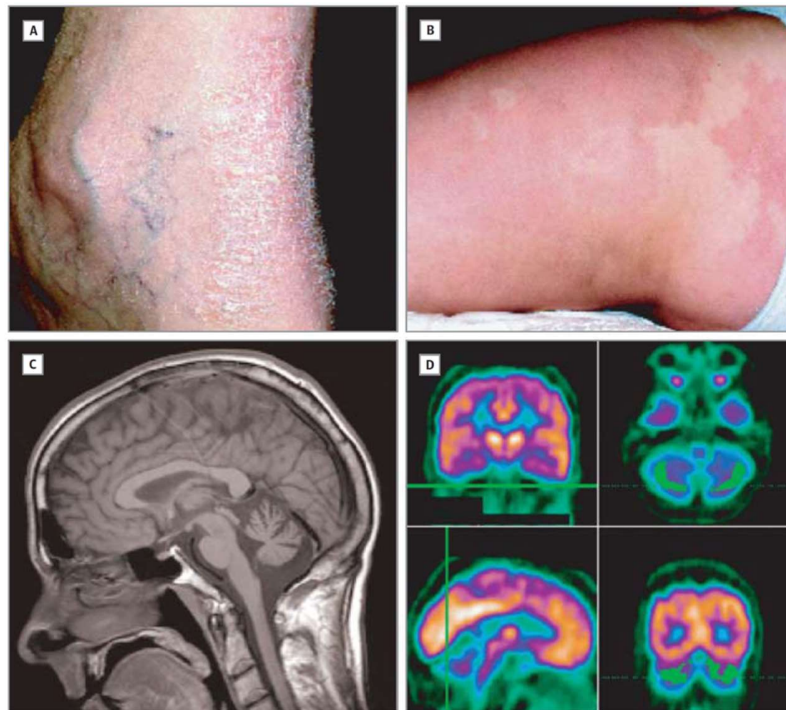
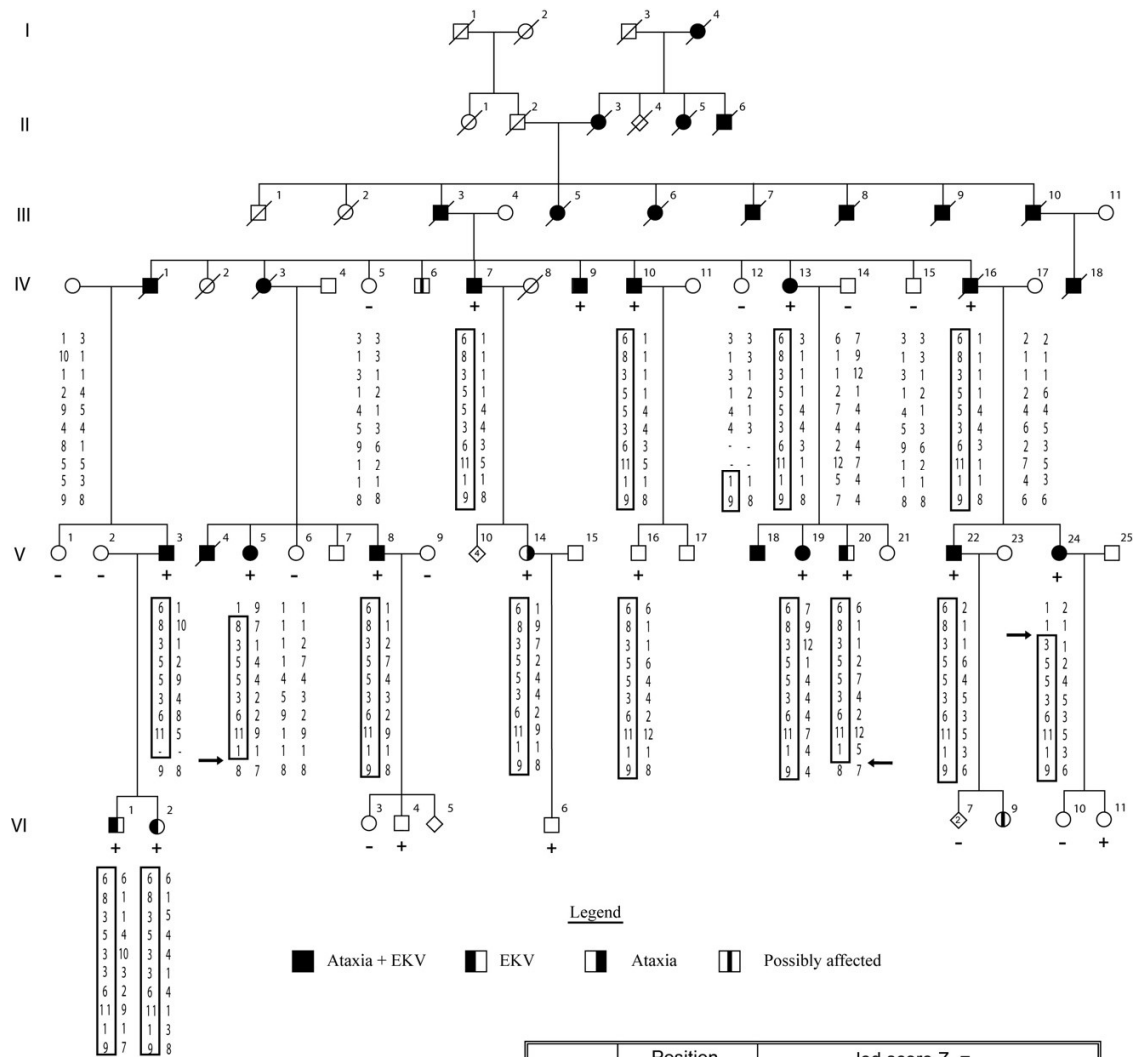


Figure 2: Clinical phenotype of the French-Canadian family. A) Erythematous and hyperkeratotic plaque covered with fine scales over the heel and ankle; B) Red patches of erythema over the thigh. The lesions are typically symmetrical; C) MRI showing severe atrophy of the cerebellum and the pons (V-8); D) Brain FDG- Positron Emission Tomography showing cerebellar hypometabolism in an individual (V-24) with very mild ataxia but without cerebellar atrophy, compatible with an earlier stage of the disease.

Figure 3.2.8.3 : Intervalle contenant la variation causative associée au syndrome de Giroux-Barbeau



eFigure 1: The disease haplotype (boxed) is reconstructed from 10 microsatellite markers and boxed in black. Centromeric (individual V-24) and telomeric (individuals V-5 and V-20) key recombination events are indicated with arrows, and define the disease locus between markers D6S459 and D6S417. Inset shows position of the markers and two-point LOD scores. Dashes are used for untyped markers. Open figure = unaffected; closed half left figure = erythrokeratoderma only; closed half right figure = ataxia only; closed figure = ataxia and erythrokeratoderma.

3.2.9 Tables

Tableau 3.2.9.1 : Statistiques détaillées du séquençage de nouvelle generation

ID	Mean Coverage	% Target Base >10x	% Target Base >20x	% Target Base >30x
V-5	128X	98,4%	95,3%	91,2%
V-3	138X	98,9%	96,7%	93,3%
V-24	133X	98,7%	96,4%	92,8%

eTable1 : Detailed alignment statistics of the Next Generation Sequencing data

Tableau 3.2.9.2 : Tableau des manifestations cliniques des patients de la famille

ID	Sex	Age	Age of Onset	Gait Ataxia	Limb Ataxia	Dysarthria	Nystagmus	Severity	Skin lesions	Others	MRI	EMG
IV-7	M	87	72	+	+	+		Moderate*	+	SP,DTR,AR	CeA,CoA and PA	Mild PAN
IV-9	M	76	65	+	+	+	+	Moderate*	+	SP,DTR		Mild PAN
IV-10	M	75	60	+	+	+	+	Mild	+	SP,DTR	CeA,CoA and PA	Mild PAN
IV-13	F	74	65	+	+	+	+	Mild	+	SS,Mild PT		
IV-16	M	72	48	+	+	+		Moderate*	+	SP,DTR	CeA and PA	Normal
V-3	M	66	60	+	+		+	Mild	+	SP		Normal
V-5	F	63	53	+				Mild	+			
V-8	M	44	40	+	+	+	+	Mild	+		CeA,CoA and PA	
V-14	F	64	55	+	+			Mild	-	SS,DTR		
V-19	F	51	35	+	+			Mild	+	SS,DTR	CeA,CoA and PA	Normal
V-22	M	45	37	+			+	Mild	+		Mild CeA	
V-24	F	48	44	+				Very Mild	+	DTR	Normal	Mild PAN
VI-1	M	36	32	-			+	Mild	+		Normal	Normal
VI-2	F	33		-					+			
V-20	M	44		-					+		Normal	
V-16	M	48		-					-			
VI-4	M	15		-					-			
VI-6	M	34		-					-			
VI-11	F	25		-					-			

eTable 2: Clinical characterization of individuals with the p.L168F mutation. ID = individual; SP = slow pursuit; SS = slow saccade; DTR = decreased tendon reflexes; CeA = cerebellar atrophy; CoA = cortical atrophy; PA = pons atrophy; AR= axial rigidity; PAN = peripheral axonal neuropathy; PT= postural tremor; * = walker, □= cane

Chapitre 4 : Utilisation du WES dans le diagnostic génétique des maladies rares : L'étude d'une famille avec une mutation dans le gène *TREX1*

4.1 Présentation de l'article

Les travaux présentés le chapitre 4 découlent d'une collaboration avec le Dr Phillippe Bégin. Depuis plusieurs années, ce dernier étudie une grande famille canadienne-française présentant des lésions cutanées suite à l'exposition au froid. Les manifestations cliniques des patients sont compatibles avec la cryofibrinogénémie, une maladie caractérisée par la présence de fibrinogène anormal dans le plasma sanguin. Bien que dans la plupart des cas, la maladie est sous-jacente à une autre pathologie, il existe quelques cas où elle se présente comme la seule manifestation clinique³⁶³⁻³⁶⁵. La structure de la famille est compatible avec un trait mendélien avec une transmission autosomique dominante. En premier lieu, en utilisant une approche de type gène candidat (**section 6.1.1.1**), les gènes codant pour le fibrinogène ont été séquencés par la méthode Sanger. Aucune mutation n'a été identifiée. Ainsi, le séquençage de l'exome, par des méthodes à haut débit, chez 3 patients de la famille a été entrepris. Nous avons émis l'hypothèse qu'une mutation rare à forte pénétrance serait à l'origine des manifestations observées. Suite à l'analyse des résultats, une mutation dans le gène *TREX1* a été trouvée chez la majorité des patients. De façon intéressante, cette mutation avait déjà été retrouvée chez des patients atteints d'une autre pathologie, le lupus érythémateux avec engelure. La ressemblance phénotypique entre ces patients et ceux retrouvés dans notre famille nous a permis d'effectuer le diagnostic génétique et d'élargir le spectre des maladies neurocutanées.

4.1.1 Contribution des auteurs

Design et conception : PB, MCD, PC

Acquisition de données cliniques : PB, GL, ADR, MG

Caractérisation clinique du phénotype : PB, GL, ADR

Analyses des données génétiques : MCD, CP, CM

Rédaction du manuscrit et des figures: PB, MCD, CP

Révision du manuscrit: CP, CM, MG, ADR, GL, GAR, PC

Financement: PC

Support administrative et technique: MG, CMe

Supervision: PC

4.2 Clinical use of exome sequencing for diagnosis of Mendelian disorders : study of a large family with TREX1 mutation.

Article en préparation

Maxime Cadieux-Dion*¹, Philippe Begin*², Camille Paradis¹, Caroline Meloche¹, Micheline Gravel³, Anne Des Roches², Georgette Leclerc⁴, Patrick Cossette^{1,3}.

*equal contribution

1) CHUM Research Center, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada. 2) CHU Sainte-Justine Research Center, Montreal, Quebec, Canada. 3) Notre Dame Hospital, Department of Neurology, Montreal, Quebec, Canada. 4) Chicoutimi Health Center, Saguenay, Quebec, Canada.

4.2.1 Abstract

Whole exome sequencing sequencing has been used extensively for research purposes, revealing a number of causative genes in many disorders. In the clinical setting, families presenting with atypical manifestations of rare Mendelian diseases, such as familial cryofibrinogenemia, also make good candidates for their use for diagnostic purposes. Cryofibrinogenemia is defined by the presence of a cold-induced precipitate found in plasma but absent from serum. Clinical manifestations include cutaneous lesions in cold-exposed areas, typically buttocks, hands, feet, ears and nose (e.g. purpura, livedo reticularis, Raynaud's

phenomenon); severe cases can result in ulceration, gangrene, and ischemic necrosis. In this article, exome sequencing was performed on three affected individuals from a large French Canadian family with such symptomatology. We identified the p.D18N mutation in the gene *TREX1* in 19 individuals from the family. Interestingly, this mutation is found in patient with familial chilblain lupus, a rare type of cutaneous lupus erythematosus that manifests with cold-induced lesions on the extremities. In addition to widening the clinical spectrum of *TREX1*-mutation associated chilblain lupus, this familial case study demonstrates the application of WES in rare diseases diagnoses, and its role in diseases with indefinite diagnostic criteria or variable clinical presentations.

4.2.2 Introduction

Whole exome sequencing (WES) has been used extensively for research purpose, revealing a number of causative genes in many disorders ³⁶⁶. Specifically, they are effective at identifying genetic variants associated with rare Mendelian diseases ^{237,367}. Now that WES is more accessible and inexpensive, they are used beyond the research setting to investigate families or individuals with probable but abstruse genetic conditions. In some fields, such as clinical immunology, these tools are frequently used to diagnose challenging cases of atypical immune deficiencies ³⁶⁸. The clinical use of WES is uncommon in dermatology. This is surprising, considering dermatology has a great number of rare diagnoses presenting with variable combinations of symptoms. Experienced clinicians often rely on their knowledge of non-validated symptoms scores or clinical criteria based on known cases. This approach is problematic when dealing with rare syndromes with variable clinical presentation.

Familial chilblain lupus erythematosus (CHLE) is a rare type of cutaneous lupus erythematosus manifesting early in life ^{369,370}. It is caused by heterozygous mutations in the *TREX1* gene, encoding a DNA exonuclease involved in granzyme-mediated cell death. Homozygous *TREX1* gene mutations are associated with Aicardi-Goutières Syndrome (AGS), a severe inflammatory disorder of the brain and skin ^{93,290}. Original major diagnostic criteria for CHLE include cold-induced lesions on the extremities and pathological evidence of lupus erythematosus (LE) in skin lesions ³⁷¹. Major diagnostic criteria must be associated with at least one of four minor

criteria: coexistence of systemic LE or other skin lesion of discoid LE, response to anti-LE therapy, negative results of cryoglobulin, and negative results of cold agglutinin ³⁷². It is generally accepted that the presence of cryoglobulin, cold agglutinin, or cryofibrinogen excludes the diagnosis of primary CHLE ³⁷². However, the clinical spectrum of *TREX1*-mutation associated diseases is broad, even in families carrying the same mutation. Thus, existing inclusion and exclusion diagnostic criteria may not apply to all patients, potentially leading to misdiagnoses ²⁹⁵.

Here, we describe a large French Canadian family which presented with atypical familial CHLE (without systemic LE and with cryofibrinogenemia) where a genetic diagnosis was made using WES, thus demonstrating its usefulness in clinical dermatology settings ³⁷³.

4.2.3 Index cases

A 42-year-old male presented with lesions on his extremities, knees and hips that appeared every fall and disappeared during the spring. Physical examination showed scar tissue on both hips, purple-blue livedoid discolorations with crusts on both knees and purple-blue macules with occasional crusts on finger and toe tips. Two brothers had similar symptoms. None had shown other clinical manifestations of lupus erythematosus, discoid lupus, or another inflammatory condition. Complete blood count, coagulation, protein electrophoresis and sedimentation rate were normal. Biochemistry, including creatinine, C protein, S protein, cholesterol and hepatic enzymes were also normal limits. Serology was negative for hepatitis B and C, mononucleosis, VDRL, rheumatoid factor, C-reactive protein, anti-nuclear, anti-DNA and antiphospholipid antibodies. While no cryoprecipitate was identified in serum, cryofibrinogen was identified in the patient's plasma. Skin biopsies of lesions showed thickened capillary walls with lymphocytic-histiocytic perivascular infiltrate without basal membrane thickening of vacuolization. Immunofluorescence was negative except for the presence of fibrinogen in and around capillaries.

One month later, a 42-year-old female without any apparent link to the first family consulted in a neighboring city with similar complaints. Her two children suffered from the same symptoms,

and she could trace her ancestors with the same problem. The work-up showed similar results to the first case. Ascending genealogy revealed that this nuclear family was related to the previous one.

Based on negative immunological testing and the identification of cryofibrinogen in the plasma, both patients were diagnosed with primary familial cryofibrinogenemia. Based on literature on secondary cryofibrinogenemia, stanozolol treatment was initiated in both cases and although it initially lessened symptoms, lesions reappeared during colder periods, and the treatment was discontinued. Dextran perfusion was also attempted in the second patient, but results were too limited to submit patients to long-term treatment. A trial with nifedipine was also unsuccessful. Given evidence of latent tuberculosis, risks of immunosuppressive treatment outweighed expected benefits in absence of evidence of autoimmune basis at the time. In hope of clarifying diagnosis and generating treatment options by identifying underlying genetic disorder, WES was undertaken in this large multiplex family.

4.2.4 Methods

4.2.4.1 Study participants and samples

Family members of index cases were interviewed to determine affected status and genealogy. Older stems of the genealogical tree were determined by consulting the BALSAC database. The BALSAC database, which is the joint property and responsibility of UQAC, Université Laval, McGill University and Université de Montréal includes data covering the entire province of Quebec in Canada, comprising of 3 million vital event records, representing the lives of 5 million individuals from the foundation of New France in the 17th century to recent years. We collected genomic DNA from 40 individuals over 3 generations of this family. All collected cases underwent dermatological examinations. After participants provided written informed consent, genomic DNA was extracted from blood samples using standard protocols. This project was approved by the research ethics committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montreal. The participants received no financial compensation.

4.2.4.2 Candidate gene sequencing

We first screened the complete open reading frame of FGA (NM_000508), FGB (NM_005141) and FGG (NM_000509 and NM_021870) (primers available upon request) in one individual from the family. We amplified by polymerase chain reaction (PCR) all the coding regions of these genes. The primers were designed approximately 50 base pairs from the exon/intron junctions to analyze the whole sequences, including splice sites. PCR primer pairs were designed using the software Exon primer from the UCSC Genome Browser database. The amplicons were run on the ABI3730 automatic sequencer and studied by using Mutation Surveyor.

4.2.4.3 Exome sequencing and validation of variants

Exome sequencing was performed on three affected individuals from distinct branches of the pedigree (V-6, V-15, IV-39, **Figure 1**). Genomic DNA (5 µg) was fragmented and enriched (SureSelect Human AllExon V4 kit; AgilentTechnologies). The prepared library was sequenced with paired-end reads (HiSeq 2000; Illumina). The reads were mapped against the human genome (hg19) (Burrows-Wheeler Aligner). Reads with unique mapping location were kept for downstream analysis. Genome Analysis Tool Kit ³⁴⁷ and ANNOVAR ³⁴⁸ were used for the calling of single-nucleotide variations, small insertions, and small deletions (indels). Called variants were filtered against dbSNP132 as well as individuals from our in-house exome database. For the validation of next-generation sequencing variants, primers were designed with the software Primer 3 to amplify the coding region encompassing the putative variation.

4.2.5 Results

4.2.5.1 Study participants

Population registers were consulted and common ancestry of both index cases was confirmed. Familial pedigree is presented in **Figure 1** with 34 living individuals reporting a history of cold-induced acral lesions. Clinical manifestations of the phenotype in 19 mutation carriers are

summarized in **Table 1**. Transmission of the disease phenotype was compatible with an autosomal dominant transmission pattern.

4.2.5.2 Genetic

Genomic DNA was collected from 40 individuals of the family over three generations. Based on the presence of cryofibrinogen in index cases, the complete open reading frame of three genes encoding for fibrinogen (*FGA*, *FGB* and *FGG*) were first sequenced in one patient from the family. No mutation was identified. Exome sequencing of three distantly related individuals revealed four shared, low frequency coding genetic variations. Among those, we identified one missense variant (chr11: 1017744 T>C, NM_005961, c.A5057G, p.N1686S) and one synonymous variant (chr3: 49154642 C>T, NM_001199162, c.G729A, p.E243E) in the genes *MUC6* and *USP19*, respectively. *MUC6* encodes for a member of the mucin family and is involved in the epithelial cytoprotection in the gastrointestinal tract³⁷⁴ whereas *USP19* encodes for a deubiquitinating enzyme widely expressed in the body³⁷⁵. A transition was also identified in *COL7A1* (chr3:48620475 G>A, NM_000094, c.C4489T, p.R1497C), a gene associated with dystrophic epidermolysis bullosa. This disease is characterized by blistering of the skin and mucous membranes following mechanical stress³⁷⁶. Finally, we found a missense mutation (p.D18N) in the gene *TREX1* located on chromosome 3 (chr3: 48508106 G>A, NM_033629, c.G52A, p.D18N) (**Figure 2**). The *TREX1* and the *COL7A1* variants were sought by Sanger sequencing in the rest of the pedigree, and were found among 16 additional individuals (12 affected, two possibly affected and two asymptomatic individuals).

4.2.6 Discussion

In this study, we reported a large French Canadian family with an initial diagnosis of primary familial cryofibrinogenemia, where we made a diagnosis of atypical *TREX1*-mutation associated familial CHLE using whole exome sequencing. In 19 individuals, we identified the p.D18N mutation in the gene *TREX1*. Among those, only 2 mutations carriers were asymptomatic suggesting nearly complete penetrance of the mutation. To our knowledge, there are eight reports of familial CHLE caused by *TREX1* mutations and five involving the same p.D18N

mutations associated with CHLE ³⁷⁷. In our cohort, the absence of LE and presence of cryofibrinogen contrasted the classical hallmarks found in most CHLE patients. This symptomatology prevented the diagnosis of CHLE on clinical basis alone.

Interestingly, affected patients also showed another very rare missense variant in the gene *COL7A1*. This finding is remarkable considering mutations in this gene are associated with dystrophic epidermolysis bullosa, another disease with clinical manifestations involving the skin. This disease can also be transmitted following an autosomal dominant pattern of inheritance and is caused by missense, indels, or splice variants ³⁷⁸. The phenotypic spectrum of dominant dystrophic epidermolysis bullosa (DDEB) is large. Some cases show mild blistering limited to regions of trauma with rare mucosal involvement and nail dystrophy. Other cases show only nail loss (DDEB-nails only, reported in some of our patients). However in DDEB, the disease usually manifests early and symptoms diminish throughout life ³⁷⁹. Also, symptoms of DDEB are unrelated to cold-exposure. Thus, the cosegregation of *TREX1* and *COL7A1* variations may be explained by physical proximity on the same chromosome (100 kb), and therefore, incidental.

A large spectrum of phenotypes is associated with mutations in *TREX1*. It has been found in patients with AGS, CHLE, systemic LE, and retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy (RVCL)²⁹⁵. This variability is also observed among carriers of the same mutation ³⁸⁰. Interestingly, in patients with RVCL associated with *TREX1* mutations, lupus symptoms are absent. The p.D18N mutation in the gene *TREX1* was specifically associated with CHLE by Lee-Kirsh (2006). Clinical evidence for this disorder includes cold-induced cutaneous lesions on the extremities that may lead to ulceration ³⁷⁰. Patients usually have clinical or histological manifestations of LE, arthritis, or elevated levels of antinuclear antibodies ³⁷⁷.

Cryofibrinogenemia is a rare cryopathy defined by the presence of a cold-induced precipitate found in plasma but absent from serum. It was first discovered in 1955 by Korst and Kratochvil and consists mainly of fibrinogen, fibrin, and fibronectin ^{381,382}. Clinical manifestations include cutaneous lesions in cold-exposed areas, typically buttocks, hands, feet, ears, and nose (e.g. purpura, livedo reticularis, Raynaud's phenomenon); severe cases can result in ulceration,

gangrene, and ischemic necrosis ^{383–385}. Diagnostic criteria are unestablished, but currently include cutaneous manifestations and two positive results for cryofibrinogen in the plasma.

To our knowledge, five primary cases of cryofibrinogenemia have been documented with familial presentation ^{363–365}. Lolín et al. reported the first family with acrocyanosis on their nose and cheeks after cold exposure (resolving after becoming warm). All subjects tested positive for cryofibrinogen. Detailed histories of 14 individuals from the family suggested an autosomal dominant pattern of inheritance ³⁶³. The first patient (index case) of the second family reported a history of arthralgia in his hands and feet, generalized muscle weakness, and relapsing fever. After acute cold exposure, symptoms of hypertension, iridocyclitis, cyanotic swelling (fingers, feet), and purpura (legs, arms) were observed. A familial history of abnormal response to cold exposure (Raynaud's phenomenon) was present in his aunt and grandfather. The index case in the third family reported severe acrocyanosis of the hands and feet after cold exposure. Raynaud's phenomenon and acrocyanosis were also observed in other family members (maternal). In the fourth family, three sisters presented with acrocyanosis and Raynaud's phenomenon. Interestingly, cryofibrinogenemia was only found in one of the sisters, suggesting that cryofibrinogen was not the cause of the symptoms but possibly an epiphenomenon of another cold-related disorder ³⁶⁵. Finally, in a fifth Moroccan family, a mother and her two children showed painful edematous feet with purpura during the winter, but were otherwise healthy and unmedicated. Other family members were unaffected ³⁶⁴. The family presented in this study represents the largest cohort of familial cryofibrinogenemia to date.

The contribution of cryofibrinogen to clinical presentation is uncertain. Since it could be found in patients with CHLE, and considering the heterogeneous presentation of *TREX1*-related disease, it is unknown whether the aforementioned families were associated with *TREX1* mutations. Furthermore, this notion is supported by cases of other patients with the *TREX1* mutations presenting similar cutaneous lesions without cold exposure or cryofibrinogen. Presence of cryofibrinogen in our cohort could be a non-systematic epiphenomenon of *TREX1* mutation or fortuitous. And while low amounts of cryofibrinogen can be found in 7% of healthy individuals, higher levels (dosed at 850 mg/L in one participant) can be symptomatic ³⁸⁶. Therefore, our findings suggest the presence of cryofibrinogen should not exclude a diagnosis

of familial CHLE. The previously suggested criteria should thus be revised to include the investigation of *TREX1* mutations in subjects with probable CHLE.

TREX1 is one of the major exonucleases acting on single-stranded DNA in mammalian cells. It helps the killer lymphocyte protease granzyme-A damaging single stranded DNA ³⁸⁷. It is also thought to have a gap-filling or proofreading role in DNA repair mechanisms. Deficiency in *TREX1* has been shown to cause an intracellular accumulation of single-stranded DNA and nucleic acids, which could act as a danger signal to trigger type 1 interferon innate immune response, which can in turn promote adaptive response to self and autoimmunity ³⁷⁷. The reason why cold would act as a trigger for such autoimmune events is unclear. A suggested hypothesis has been that these inflammatory events could increase blood viscosity and cause cold-induced microvascular injuries ³⁸⁸.

4.2.7 Conclusions

In conclusion, we described a large French Canadian family with cold-induced skin lesions associated with the presence of cryofibrinogen in plasma ³⁷³. An exome sequencing approach revealed a missense mutation (p.D18N) in the gene *TREX1*, which had been previously described in five of eight families with *TREX1*-associated CHLE. Segregation analysis revealed that the mutation segregated with the disease in 19 individuals from the family. In addition to widening the clinical spectrum of *TREX1*-associated chilblain lupus, this familial case study demonstrates the application of WES in rare cutaneous diseases diagnoses, and its role in diseases with indefinite diagnostic criteria or variable clinical presentations.

4.2.8 Figures

Figure 4.2.8.1 : La mutation p.D18N dans le gène *TREX1* retrouvée dans une famille canadienne-française

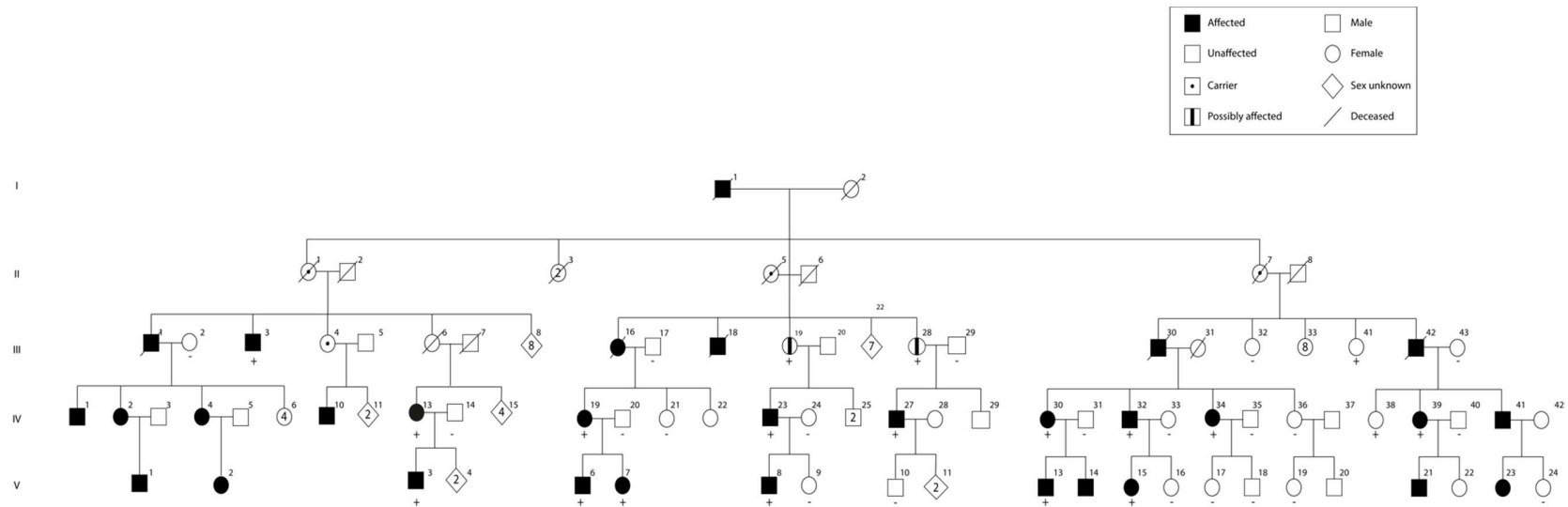


Figure 1: Pedigree of a French Canadian family with a mutation in the gene *TREX1*. The mutation p.D18N in the gene *TREX1* is found in 19 individuals. – No mutation + Mutation positive individuals

Figure 4.2.8.2 : Chromatogramme de la mutation p.D18N retrouvée dans le gène *TREX1*

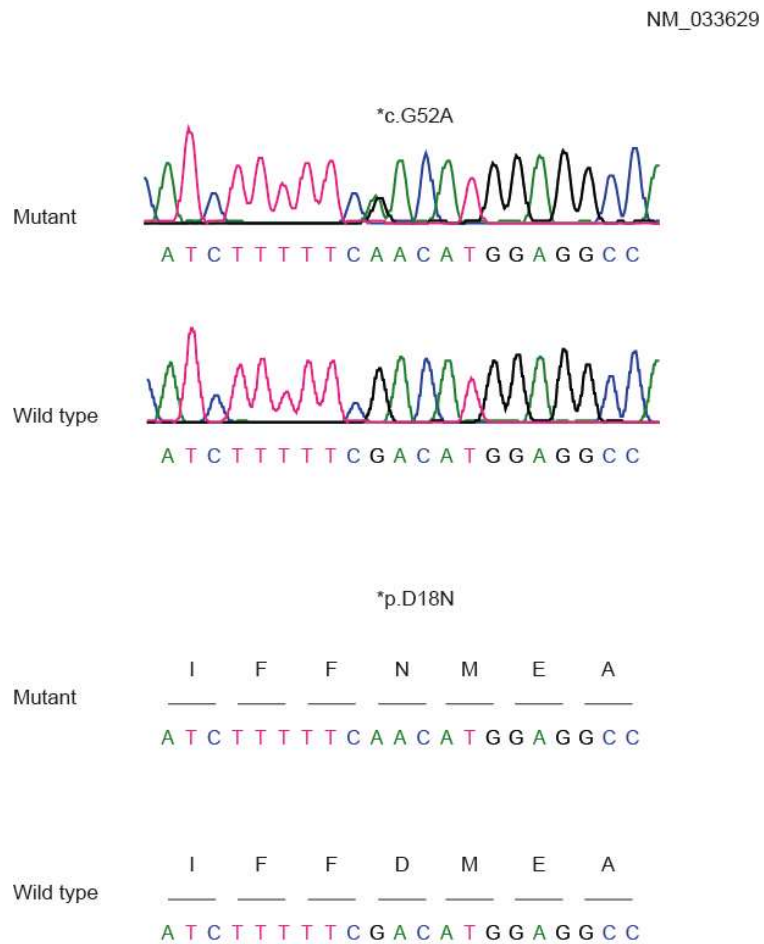


Figure 2 : Chromatogram of the p.D18N mutation found in the gene *TREX1*. Traces from one affected and one unaffected individuals from the family are shown. The effect on the DNA and on the protein are shown.

4.2.9 Tables

Tableau 4.2.9.1 : Tableau des manifestations cliniques de 19 individus porteurs de la mutation p.D18N dans le gène *TREX1*

ID	Sex	Age	Lésions	Mutation status	Age of onset	Localisation of lesions
III.28	F	75	+/-	+	N/A	N/A
V.7	F	N/A	+	+	N/A	N/A
IV.39	F	56	+	+	Childhood	Finger, toes, ears
IV.38	F	59	-	+	-	-
III.41	F	68	-	+	-	-
IV.30	F	55	+	+	Childhood	Toes, feet
IV.34	F	53	+	+	12 yr	Feet, hand, ears
III.3	M	79	+	+	6 yr	Ears
IV.19	F	55	+	+	7 yr	Nose, ears, feet, fingers, hips, knees, face
V.6	M	27	+	+	1 yr	Hands, ears, feet
III.19	F	74	+/-	+	N/A	N/A
V.13	M	24	+	+	2 yr	Hands, feet
IV.32	M	52	+	+	15 yr	Ears, feet, hands
V.15	F	19	+	+	6 yr	Fingers, toes
IV.13	F	43	+	+	12 yr	Thigh
V.3	M	15	+	+	3 yr	Feet, ears, cheek
V.8	M	15	+	+	N/A	N/A
IV.23	M	45	+	+	N/A	N/A
IV.27	M	41	+	+	N/A	N/A

Table 1 : Clinical manifestations of 19 individuals carrying the p.D18N mutation in the gene *TREX1*. (+) Positive (-) Negative (+/-) Possible

Chapitre 5 : Séquençage à haut débit de 7 familles avec épilepsie génétique généralisée

5.1 Présentation de l'article

Les études de familles avec plusieurs individus atteints d'épilepsie ont permis l'identification d'un grand nombre de gènes causatifs pour la maladie. Toutefois, celles-ci ne représentent qu'une faible proportion des cas répertoriés. L'étude présentée dans le chapitre 5 présente un effort de séquençage afin d'identifier de nouveaux gènes prédisposant aux formes communes d'épilepsie. Pour le faire, sept grandes familles d'épilepsie génétique généralisée provenant de la population canadienne française ont été recrutées. En raison du nombre élevé de patients dans chacune d'elles et de la structure des familles, nous avons émis l'hypothèse que dans ces familles, le phénotype serait causé par des mutations rares fortement pénétrantes. À l'instar des chapitres 2, 3 et 4, trois individus par famille ont été sélectionnés pour le WES. Notre étude a montré que les variations identifiées dans les gènes *GLI2*, *MBD5*, *CELSR2*, *CELSR3*, *TNIK* et *CACNA1G* semblent participer à l'étiologie génétique de nos familles. Toutefois, en raison du nombre de variations identifiées, d'autres facteurs pourraient contribuer au phénotype épileptique.

5.1.1 Contribution des auteurs

Design et conception : MCD, SLG, PC

Acquisition de données génétique : MCD, SD, CM

Acquisition des données cliniques : PC, MG

Analyses des données : MCD, SLG

Rédaction du manuscrit et des figures : MCD, SLG

Révision du manuscrit : SLG, PC

Financement : PC

Support administrative et technique : MG, CMe

Supervision: PC

5.2 Exome sequencing in large multiplex families with genetic generalized epilepsy

Article en préparation

Maxime Cadieux-Dion¹, Simon L. Girard¹, Sylvia Dobrzeniecka¹, Caroline Meloche¹, Micheline Gravel^{1,2}, Patrick Cossette^{1,2}.

1) CHUM Research Center, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada. 2) CHUM, Notre-Dame Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

5.2.1 Abstract

Epilepsy is a common neurological disorder (1-3 % of the population), characterized by recurrent episodes of paroxysmal abnormal electrical discharges in the brain. The Genetic Generalized Epilepsies (GGE) have a significant hereditary component among epilepsies, and represents approximately 47% of all epilepsy syndromes. In the present study, exome sequencing was performed on 7 families from our collection. Within each of these, three patients were sequenced, and coding, segregating variants were investigated. Although we selected our largest family with the strongest apparent genetic burden, we were unable to pinpoint a single causative variant for the disease. However, we report missense mutations in *GLI2*, *MBD5*, *CELSR2*, *CELSR3*, *TNIK* and *CACNA1G* genes segregating well with the GGE phenotype. Given their functions and their segregation profile in our families, these genes represent new candidates for epilepsy. In this study we showed the strengths but also the limitations of our approach in light of the genetic complexity of the disease.

5.2.2 Introduction

Epilepsy is a common neurological disorder (1-3 % of the population), characterized by recurrent episodes of paroxysmal abnormal electrical discharges in the brain. In the majority of

epileptic individuals (65%), seizures occur without detectable lesions in the brain. They can be classified as focal, when occurring in a restricted area of the brain, or generalized, when they implicate the entire brain from the onset. The Genetic Generalized Epilepsies (GGE) have a significant hereditary component among epilepsies, and represents approximately 47% of all epilepsy syndromes ³⁸⁹. For this type of epilepsy, the heritability can be monogenic, where the effect of a single mutation is large enough to cause the phenotype. However, it is generally believed that in most of the cases the disease is caused by multiple variants of small effects (complex inheritance) ^{48,306}. Although they only account for 1-2% of cases with epilepsy, large families with monogenic transmission are very useful to discover new genes associated with epilepsy. Over the years, several groups of investigators have clearly demonstrated the implication of genes encoding for ion channels in the disease ³⁸⁹. In contrast to classical linkage studies, large scale association studies have so far failed to identify common variants with large effect on the phenotype suggesting a epistatic effect of several different loci. Similarly, sequencing efforts on large cohorts of patients with GGE have shown that moderately rare variants with intermediate effects did not play a role in the risk of GGE ³⁹⁰. This lack of association of a single variant with the disease phenotype represents well the genetic heterogeneity of the disease and the need for alternative strategies in order to identify new causative genes.

In the present study, exome sequencing was performed on 7 families from our collection. Within each family, three patients were sequenced, we sought for coding and segregating genetic variations. Even though we selected our largest family with the strongest apparent genetic burden, we were unable to pinpoint single causative variants for the disease. However, we report missense in *GLI2*, *MBD5*, *CELSR2*, *CELSR3*, *TNIK* and *CACNA1G* genes segregating with the GGE phenotype. Given their functions and their segregation profile in our families, these genes represent new candidates for epilepsy. Other interesting variants were also identified, but with partial segregation, showing the challenges of this approach in light of the genetic complexity of the disease.

5.2.3 Material and methods

5.2.3.1 Families

One hundred and seven individuals (44 patients with epilepsy and 63 unaffected relatives) from 7 multiplex families were recruited for this study. Each family had between 4 and 9 affected individuals and the relationship to each other ranges from first-degree relatives to distant relatives (**Figure 1**). Clinical characterization of the phenotype was based on detailed neurological examinations and EEG recordings. In each family, we selected 3 patients using homogeneous phenotype and distant relation as selection criteria. After participants provided written informed consent, genomic DNA was extracted from blood samples using standard protocols. This project was approved by the research ethics committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. The participants received no financial compensation.

5.2.3.2 Whole exome sequencing

Exome sequencing was performed on 3 affected individuals from each family (n=21). Genomic DNA (5 ug) was fragmented and enriched with SureSelect Human All Exon v4 (Agilent Technologies). The prepared library was sequenced with paired-end reads on the Hiseq 2000 (Illumina). The reads were mapped against the human genome (GRC37) with Burrows-Wheeler Aligner (BWA)³⁹¹. Reads with unique mapping location were kept for downstream analysis. Unified Genotyper (GATK)³⁴⁷ was used for the calling of single nucleotide variations (SNV), small insertions and small deletions (Indels) using default parameters and raw data from all the sequenced samples. Following initial bioinformatics analysis, heterozygous variants with a genotype quality over 20 were annotated using SNPeff³⁹². For further analysis, variants with a minor allele frequency over 1% in public database (Exome sequencing project, Exome Aggregation Consortium (ExAC)³⁹³, data from 69 WGS from Complete Genomic) and benign effect (“synonymous coding”, “UTR 3 prime”, “synonymous stop”, “synonymous start”, “downstream”, “intron”, “upstream”, “UTR 5 prime”, “intron”, “intergenic”) on the protein were discarded. For each remaining variants, combined analysis was performed to determine the number of mutant alleles in each family and across all sequenced individuals. Considering that causative variant for the disease should be found in most patients from the family, variants

found in at least two affected were investigated. In order to filter common variants from the French Canadian population, we exclude allelic variants observe in more 50% of the total alleles. Finally, variants were annotated using the Residual Variant Intolerance Score (RVIS) ³⁹⁴, EpilepsyGene ³⁹⁵ and a list of 237 genes encoding ion channels (**Supplementary Table 1**).

5.2.3.3 Validation of NGS variants

For the validation of NGS variants, primers were designed with *Primer 3* software to amplify the coding region encompassing the putative variation. PCR were performed with AmpliTaq Gold DNA Polymerase and Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) according to the manufacturer instructions. Primer sequences and cycling conditions are available upon request. PCR products were sequenced at the Genome Quebec Innovation Center using a 3730 XL DNAnalyzer (Applied Biosystems) and analyzed with Mutation Surveyor v3.23 (Soft Genetics).

5.2.4 Results

In this study, the exomes of 21 affected individuals from 7 large multiplex families were sequenced. Data were analyzed in order to prioritize rare, coding, and damaging variations. Using a monogenic dominant model of transmission and the possibility of having phenocopies, variants found in more than two affected individuals per family were investigated. Overall, 1128 variants were identified in genes intolerant to mutations (RVIS percentile <30%), including 483 previously unreported in the 3 databases used (ExAC, EVS and CG). In spite of this large number of variation, 114 variants were segregating in more than one family. Finally, 33 variants were found in genes reported in EpilepsyGene and 15 were found in genes encoding ion channels. Using these criteria, manual curation led us to prioritize 26 variants for Sanger sequencing and segregation analysis. The **Table 1** summarizes the best epilepsy candidates based on segregation profile (**Figure 1**) and gene function.

5.2.4.1 Family A

In family A, two missense variants in *GLI2* (chr2:121736059 G>T, p.R145L) and *CCM2* (chr7:45113115 G>A, p.S190N) segregated in the majority of affected individuals (4/5) from the family. Mutations in the gene *GLI2* have been associated with holoprosencephaly, pituitary anomalies and postaxial polydactyly³⁹⁶, and cerebral cavernous malformations were linked to mutated *CCM2*³⁹⁷. Because of their involvement in pathologies involving the brain, the finding of these variants is interesting even though the usual clinical manifestations associated with these genes were not found in our patients.

5.2.4.2 Family B

In family B, no candidate variants segregated in all affected individuals from the family. However, we identified two variants segregating in 6/7 patients. We first report a missense variant (chr2:149226308 A>G, p.I266V) in the methyl-CpG-binding domain protein gene (*MBD5*). Interestingly, monoallelic expression of *MBD5* was associated with a wide variety of neurodevelopmental phenotypes including intellectual disability, autism and seizures³⁹⁸. Also, mutations in MeCP2, an MBD protein, were found in patients with Rett syndrome³⁹⁹. Considering that epilepsy is found in most patients with this disease, the presence of a missense variant in the gene *MBD5* in patients with GGE could contribute, at least in part, to the disease etiology. Another missense variant (chr3:48680431 G>A, p.A2792V) was identified in the gene *CELSR3*. This gene belongs to the cadherin EGF LAG seven-pass G-type (CELSR) family and they are involved in important functions during development. More specifically, *CELSR3* regulates dendrite growth and axon guidance^{400–402}. Interestingly, *CELSR3* was mutated in two families with Epileptic Encephalopathy (EE) in combination with *CACNA2D2*^{216,217}.

5.2.4.3 Family C

In family C, we identified 2 genes that were mutated in 4/5 of our patients. We first identify an SNV in the Vacuolar Protein Sorting 37 homolog A (*VPS37A*). Surprisingly, a homozygous missense variant (c.1146A>T; p.K382N) in the gene *VPS37A* was identified in two seemingly unrelated kindred. Clinical manifestations in affected family members included early onset

spastic paraparesis of upper and lower limbs, mild intellectual disability, kyphosis, pectus carinatum and hypertrichosis ⁴⁰³. Another *de novo* variation in this gene was identified in one trio with EE. However, the role of this variation in the disease pathology remains uncertain. In the family reported here, another member of the CELSR family was found to be mutated in the Cadherin, EGFL1 Type receptor 2 gene (*CELSR2*). Like *CELSR3*, *CELSR2* plays an important role in the brain wiring ⁴⁰⁴. Considering that VPS37A variations were found in other diseases, including one type of severe epilepsy, and the role of *CELSR2* regulating the neuronal environment, these variants could be part of the complex pattern of inheritance in this family.

5.2.4.4 Family D

In family D, the best candidate based on the segregation profile was the heterozygous missense variant p.E815A (chr3:170811629 T>G) in the gene *TNIK*, encoding for TRAF2/Nck-interacting kinase. Interestingly, this gene is expressed in the post-synaptic density where it modulates the function and the structure of the synapses. More specifically, healthy hippocampal neurons need *TNIK* to maintain normal dendrite complexity, synaptic density and surface AMPA-R expression ⁴⁰⁵. Also, the gene *TNIK* interacts with the gene *DISCI*, a gene previously involved with schizophrenia and their interaction regulates synaptic composition ⁴⁰⁶. Knowing that abnormal synaptic morphology has been linked to several neurologic diseases including epilepsy, the gene *TNIK* represents an interesting candidate gene for epilepsy.

5.2.4.5 Family G

In family G, we report seven patients with a missense variant (chr17:48701789 C>T, p.P1950S) in the gene *CACNA1G* encoding for alpha 1G subunit of a voltage-dependent T-type calcium channel. T-Type calcium channels are encoded by three genes – *CACNA1G* (Cav3.1), *CACNA1H* (Cav3.2) and *CACNA1I* (Cav3.3). They participate in the control of the membrane excitability and by controlling calcium concentrations. In fact, upon activation by low (LVA) or high (HVA) voltage, T-type calcium currents modulate burst activity in thalamocortical circuitry. Interestingly, this circuit is involved in spike wave discharges in absence epilepsy.

Given the previously known association between *CACNAIH* and GGE, *CACNAIG* represents a prime candidate for the phenotype observe in this family ^{212–214,407}

In all our families, 16 additional rare missenses variants were identified, but with partial segregation (**Table 2**). Ten were found in genes encoding ion channels (*SCN5A*, *CACNAIF*, *KCNQ2*, *KCNN1*, *KCNB2*, *CACNAIC*, *CACNAID*, *KCNJI*, *RYR1*, *RYR3*) and 1 was found in a gene from the protocadherin family (*PCDH20*). Other mutated genes included *ODZ3*, *LAMA2*, *ATPIA2*, *FILIP1* and *PNKP*. The gene *ODZ3* belongs to the teneurin family, a group of genes involved in the neural development ⁴⁰⁸ whereas the gene *LAMA2* is associated with muscular dystrophy ⁴⁰⁹. Interestingly, there is an increase risk for seizures in patients with *Lama2* deficiency ⁴¹⁰. The genes *ATPIA2* and *PNKP* were previously associated with other types of epilepsy. Interestingly, *de novo* microdeletion at 6q14, which contained the gene *FILIP1* was found in patients with intellectual disability ⁴¹¹. To conclude, based on their functions or their association with epilepsy comorbidity, these genes might play an unexpected role in the genetic etiology in our families.

5.2.5 Discussion

This project is a sequencing effort to identify genes for monogenic epilepsy. Considering that only 15% of GGE patients have more than one affected first-degree relatives ³⁰⁶, the large number of patients in our family of French-Canadian origin suggested a dominant mode of inheritance. We hypothesized that in those families, highly penetrant variants found in genes intolerant to mutation would segregate perfectly with the disease. Therefore, the residual variant intolerant score (RVIS) was used to prioritize variants in genes most likely to be associated with a disease. Following exome sequencing, a total of 1128 rare variants (MAF<0.01%) were identified in at least two individuals from the family. In order to reduce the number of variants to test for segregation in the family, gene knowledge from two sets of genes was used. First, the EpilepsyGene resource suggests a list of candidate genes for epilepsy. In this extensive work, the authors revised 3931 variations in 499 genes from 831 publications to establish the role of those genes in epilepsy ³⁹⁵. Secondly, considering the important role of ion channels in the disease ⁴¹², a list of 237 genes was used (**supplementary Table 1**). In total, 44 variants

responded to those criteria and were manually curated based on gene function, gene expression profile or association with an epilepsy comorbidity. Considering that causative variants are more likely to be shared among the majority of the patients from a family, segregation analysis was performed on 23 manually curated SNVs. Thus, assuming a monogenic transmission of the disease these variants had the best chance of explaining the phenotype in our families. Following segregation analysis, we were able to identify multiple candidate genes for epilepsy in our families.

Overall, out of the 23 variants investigated, 8 segregated in the majority of affected individuals, compatible with a monogenic transmission (**Table 1, Figure 1**). The presence of these variations in other unaffected individuals suggest an incomplete penetrance as it is generally the case for Mendelian epilepsies. Nevertheless, considering that these variants fitted our previously established selection criteria, their segregation profile in the family suggests a potential involvement in the disease. However, since they were not found in additional family, this assumption needs to be validated in a larger dataset. The discovery of additional mutations in these genes in other patients would provide more insights in their implication in the genetic etiology of epilepsy.

In addition to the variants segregating in our families, 16 variants in good candidate genes for epilepsy, were found, but with a partial segregation (**Table 2**). In turn, in each family, an average of 161 rare variants in genes intolerant to mutations were observed in at least 2 affected individuals suggesting that new genes for epilepsy could still be identified. Also, 114 variations found in at least 2 patients, were recurrent in our families, indicating that common pathogenic pathways could still be identified. Even though a monogenic etiology could be suspected for some of our families, our results indicate that a complex genetic mechanism is more likely to underlie the epilepsy phenotype in our families.

Our data show the challenges in the study of families with common form of epilepsy. In turn, because of the large number of candidate variants, filters had to be applied in order to reduce the number of variations to investigate. Since these filters were based on gene knowledge found in the literature, new associations with the disease could not be found. Thus, we can't rule out

the possibility that our variant prioritization steps might have excluded variants that could participate in the disease etiology. Alternate strategies will be necessary in order to better investigate these genes and eventually understand the genetics of common forms of epilepsy.

5.2.6 Conclusions

In this article, the largest families from our collection were selected for whole exome sequencing. They were chosen because they represented the best available material to identify new genes for epilepsy. In all of our families, a Mendelian pattern of inheritance was suspected. Interestingly, in the majority of them, at least one variant in a good candidate gene was identified. In all cases, the single nucleotide variants were rare, coding and found in a gene intolerant to mutations. Consequently, based on their segregation profile and their function, the genes *GLI2*, *MBD5*, *CELSR2*, *CELSR3*, *TNIK* and *CACNA1G* might represent new candidates for epilepsy. However, considering that we prioritized genes encoding ion channels and genes reported in the EpilepsyGene resource, other variants could play an unexpected role in the disease. Indeed, other variants with partial segregation might be responsible for the variable clinical manifestations found in patients within the same family. Our data suggests new candidates for GGE and reinforces the genetic complexity of the disease and the need to develop new strategies for analyses.

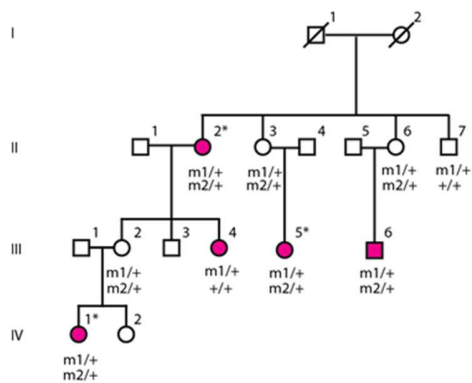
3.2.7 Acknowledgments

The authors would like to thank the families for their participation in the project. MCD, PC and SLG are supported by the Fonds de la recherche du Québec – Santé. The authors would like to thank Cecile Cieuta-Walti and Normand Giard for recruiting patients.

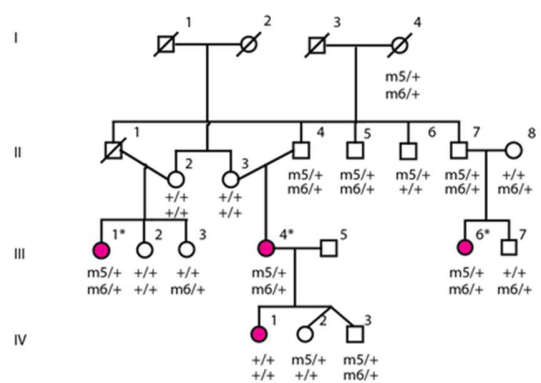
5.2.8 Figures

Figure 5.2.8.1 : Profil de ségrégation des variations trouvées dans les familles d'épilepsie génétique généralisée

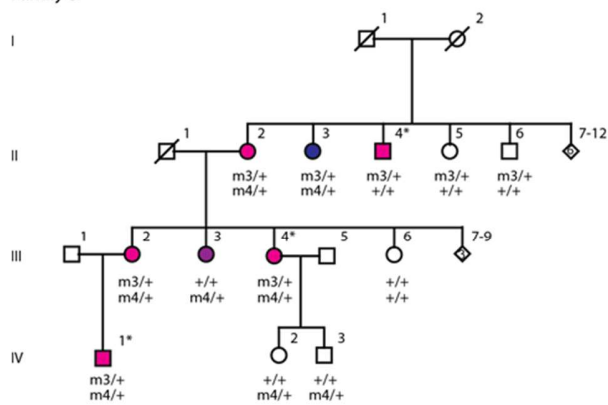
Family A



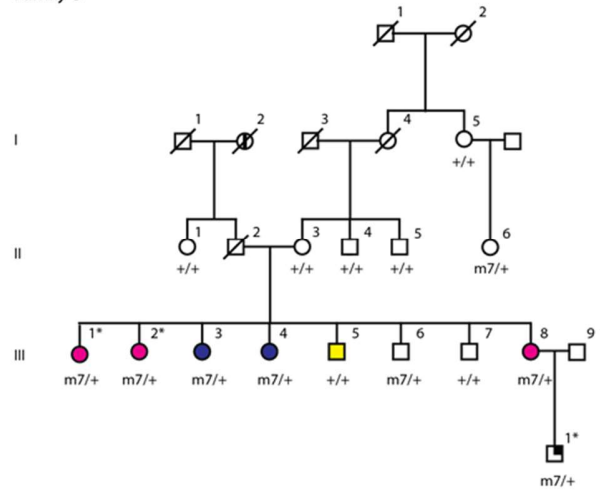
Family C



Family B



Family D



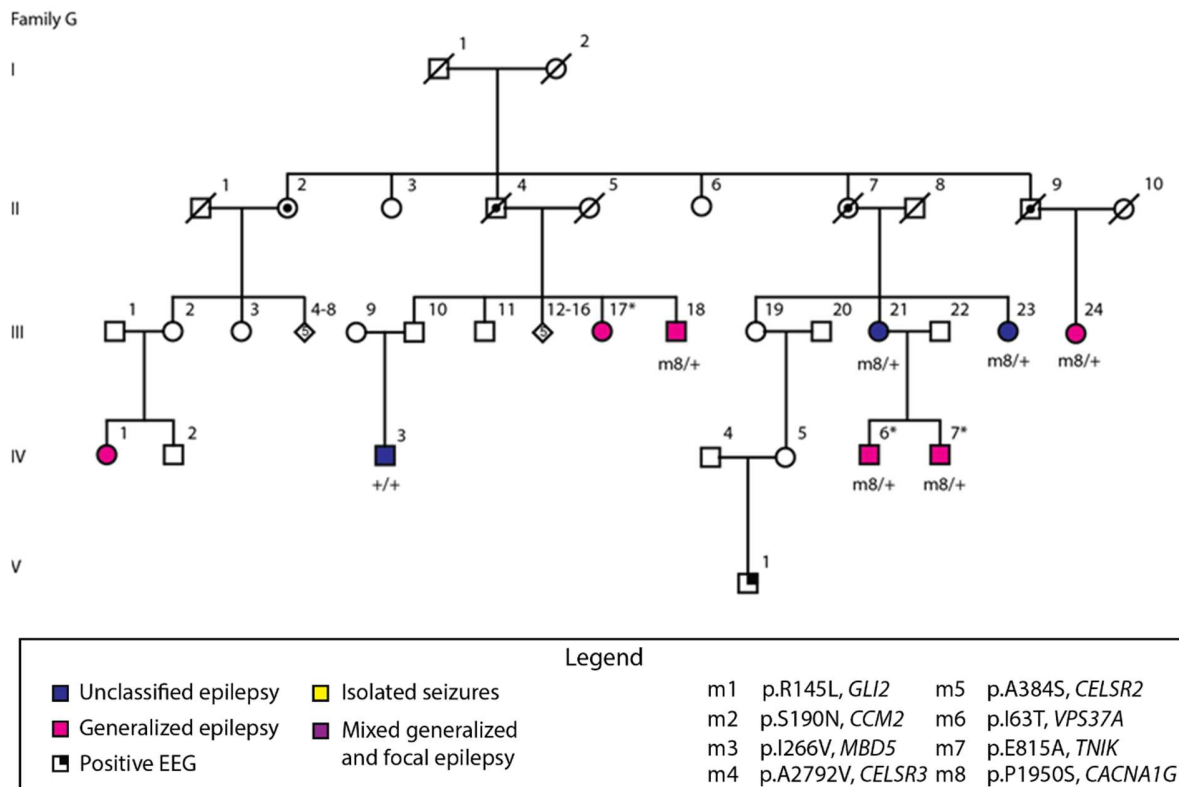


Figure 1 : Simplified pedigrees of the families with segregating variants. In family A, variants were found in the genes *GLI2* (p.R145L) and *CCM2* (p.S190N). In family B, the genes *MBD5* (p.I266V) and *CELSR3* (p.A2792V) were mutated. In family C, two missense variations were identified in the genes *CELSR2* (p.A384S) and *VPS37A* (p.I63T). The genes *TNIK* (p.E815A) and *CACNA1G* (p.P1950S) were mutated in family D and G, respectively. The mutant alleles (m1-m8) are carried by most patients from each families. * Individuals selected for exome sequencing. + Wild type allele.

5.2.9 Tables

Tableau 5.2.9.1 : Variants retrouvés dans les familles d'épilepsie génétique généralisée avec un bon profil de ségrégation

Family	Variant	AA change	Gene	EVS freq	ExAC freq	RVIS (%)	Nbr of patients mutated	Total number of patients	EpilepsyGene	Ion Channel
A	chr2:121736059 G>T	R145L	<i>GLI2</i>	0	0	19,95	4	5	-	-
	chr7:45113115 G>A	S190N	<i>CCM2</i>	0	0	18,69	4	5	-	-
B	chr2:149226308 A>G	I266V	<i>MBD5</i>	0	0,0002	10,7	6	7	-	-
	chr3:48680431 G>A	A2792V	<i>CELSR3</i>	0,0015	0,002	0,1	6	7	Associated	-
C	chr1:109793851 G>T	A384S	<i>CELSR2</i>	0,0004	0,0001	4,41	3	4	-	-
	chr8:17105226 T>C	I63T	<i>VPS37A</i>	0	0,0024	24	3	4	High	-
D	chr3:170811629 T>G	E815A	<i>TNIK</i>	0,0045	0,0064	5,35	5	5	-	-
G	chr17:48701789 C>T	P1950S	<i>CACNA1G</i>	0,0006	0,0013	0,39	7	9	Associated	Yes

Table 1 : Segregating variants found in families with GGE. EVS: Exome Variant server, EXAC: Exome Agregation Consortium.

RVIS: Residual Variant Intolerance Score

Tableau 5.2.9.2 : Variants retrouvés dans les familles d'épilepsie génétique généralisée avec une coségrégation partielle

Family	Variant	AA change	Gene	EVS freq	ExAC freq	RVIS (%)	Nbr of patients mutated	Total number of patients	EpilepsyGene	Ion Channel
A	chr6:76022844 G>A	L803F	<i>FILIP1</i>	0	3e ⁻⁵	22,06	4	5	-	-
	chr1:160093165 G>A	G114S	<i>ATPIA2</i>	0,0006	0,0011	9,58	2	5	High	-
	chr3:38646297 G>A	R481W	<i>SCN5A</i>	0,0032	4e ⁻⁵	1,6	2	5	High	Yes
	chrX:49072890 G>A	S1009L	<i>CACNAIF</i>	0	0	10,22	3	5	-	Yes
B	chr13:61989228 A>G	W22R	<i>PCDH20</i>	0	0	26,02	3	7	-	-
	chr20:62103627 C>A	A64S	<i>KCNQ2</i>	0	0,0005	27,59	4	7	High	Yes
	chr19:18084815 C>T	P40S	<i>KCNN1</i>	0	0	-	3	7	-	Yes
D	chr15:34113484 A>T	E3605V	<i>RYR3</i>	0	0	0,06	3	6	-	Yes
E	chr8:73849653 A>G	H688R	<i>KCNB2</i>	0,0018	0,0024	5,95	2	5	-	Yes
F	chr19:50368466 C>T	R139H	<i>PNKP</i>	0,0023	0,0029	8,58	2	6	Associated	-
	chr12:2789561 C>A	T1826N	<i>CACNAIC</i>	0	0,0005	2,42	2	6	-	Yes
	chr19:38997582 G>A	A2936T	<i>RYR1</i>	0	0	0,01	4	6	-	Yes
G	chr4:183651357 G>T	A864S	<i>ODZ3</i>	0,0006	0,0007	0,18	4	9	-	-
	chr6:129513850 T>A	L545Q	<i>LAMA2</i>	0,0049	0,0042	4,31	4	9	Associated	-
	chr3:53845164 C>T	R1766C	<i>CACNAID</i>	0,0001	4e ⁻⁵	0,23	2	9	-	Yes
	chr11:128709096 G>T	A348D	<i>KCNJI</i>	0	4e ⁻⁵	25,49	4	9	-	Yes

Table 2 : Variants with partial segregation found in families with GGE. EVS: Exome Variant server, EXAC: Exome Agregation Consortium. RVIS: Residual Variant Intolerance Score

Tableau 5.2.9.3 : Liste des gènes codant pour les canaux ioniques

<i>ANK2</i>	<i>CHRNA1</i>	<i>GABRA2</i>	<i>GRIN1</i>	<i>HTR6</i>	<i>KCNH2</i>	<i>KCNK1</i>	<i>SCN4A</i>
<i>BSND</i>	<i>CHRNA10</i>	<i>GABRA3</i>	<i>GRIN2A</i>	<i>HTR7</i>	<i>KCNH3</i>	<i>KCNK10</i>	<i>SCN4B</i>
<i>KCNIP1</i>	<i>CHRNA2</i>	<i>GABRA4</i>	<i>GRIN2B</i>	<i>KCNA1</i>	<i>KCNH4</i>	<i>KCNK12</i>	<i>SCN5A</i>
<i>MINK1</i>	<i>CHRNA3</i>	<i>GABRA5</i>	<i>GRIN2C</i>	<i>KCNA10</i>	<i>KCNH5</i>	<i>KCNK13</i>	<i>SCN7A</i>
<i>PSMD1</i>	<i>CHRNA4</i>	<i>GABRA6</i>	<i>GRIN2D</i>	<i>KCNA2</i>	<i>KCNH6</i>	<i>KCNK15</i>	<i>SCN8A</i>
<i>SLC12A5</i>	<i>CHRNA5</i>	<i>GABRB1</i>	<i>GRIN3A</i>	<i>KCNA3</i>	<i>KCNH7</i>	<i>KCNK16</i>	<i>SCN9A</i>
<i>TNRC15</i>	<i>CHRNA6</i>	<i>GABRB2</i>	<i>GRINA</i>	<i>KCNA4</i>	<i>KCNH8</i>	<i>KCNK17</i>	
<i>CACNA1A</i>	<i>CHRNA7</i>	<i>GABRB3</i>	<i>GRM1</i>	<i>KCNA5</i>	<i>KCNQ1</i>	<i>KCNK2</i>	
<i>CACNA1B</i>	<i>CHRNA9</i>	<i>GABRD</i>	<i>GRM2</i>	<i>KCNA6</i>	<i>KCNQ2</i>	<i>KCNK3</i>	
<i>CACNA1C</i>	<i>CHRNA1</i>	<i>GABRE</i>	<i>GRM3</i>	<i>KCNA7</i>	<i>KCNQ3</i>	<i>KCNK4</i>	
<i>CACNA1D</i>	<i>CHRNA2</i>	<i>GABRG1</i>	<i>GRM4</i>	<i>KCNAB1</i>	<i>KCNQ4</i>	<i>KCNK5</i>	
<i>CACNA1E</i>	<i>CHRNA3</i>	<i>GABRG2</i>	<i>GRM5</i>	<i>KCNAB2</i>	<i>KCNQ5</i>	<i>KCNK6</i>	
<i>CACNA1F</i>	<i>CHRNA4</i>	<i>GABRG3</i>	<i>GRM6</i>	<i>KCNAB3</i>	<i>KCNRG</i>	<i>KCNK7</i>	
<i>CACNA1G</i>	<i>CHRNA5</i>	<i>GABRP</i>	<i>GRM7</i>	<i>KCNB1</i>	<i>KCNS1</i>	<i>KCNK9</i>	
<i>CACNA1H</i>	<i>CHRNA6</i>	<i>GABRQ</i>	<i>GRM8</i>	<i>KCNB2</i>	<i>KCNS2</i>	<i>KCNMA1</i>	
<i>CACNA1I</i>	<i>CHRNA7</i>	<i>GABRR1</i>	<i>HCN1</i>	<i>KCNC1</i>	<i>KCNS3</i>	<i>KCNMB2</i>	
<i>CACNA1S</i>	<i>CLCN1</i>	<i>GABRR2</i>	<i>HCN2</i>	<i>KCNC2</i>	<i>KCNT1</i>	<i>KCNMB3</i>	
<i>CACNA2D1</i>	<i>CLCN2</i>	<i>Gcom1</i>	<i>HCN3</i>	<i>KCNC3</i>	<i>KCNV1</i>	<i>KCNMB4</i>	
<i>CACNA2D2</i>	<i>CLCN3</i>	<i>GLRA1</i>	<i>HCN4</i>	<i>KCNC4</i>	<i>KCNV2</i>	<i>KCNN1</i>	
<i>CACNA2D3</i>	<i>CLCN4</i>	<i>GLRA2</i>	<i>HTR1A</i>	<i>KCND1</i>	<i>KCNJ1</i>	<i>KCNN2</i>	
<i>CACNA2D4</i>	<i>CLCN5</i>	<i>GLRA3</i>	<i>HTR1B</i>	<i>KCND2</i>	<i>KCNJ10</i>	<i>KCNN3</i>	
<i>CACNB1</i>	<i>CLCN6</i>	<i>GLRB</i>	<i>HTR1D</i>	<i>KCND3</i>	<i>KCNJ11</i>	<i>KCNN4</i>	
<i>CACNB2</i>	<i>CLCN7</i>	<i>GRIA1</i>	<i>HTR1E</i>	<i>KCNE1</i>	<i>KCNJ12</i>	<i>RYR1</i>	
<i>CACNB3</i>	<i>CLCNKA</i>	<i>GRIA2</i>	<i>HTR1F</i>	<i>KCNE1L</i>	<i>KCNJ14</i>	<i>RYR2</i>	
<i>CACNB4</i>	<i>CLCNKB</i>	<i>GRIA3</i>	<i>HTR2A</i>	<i>KCNE2</i>	<i>KCNJ15</i>	<i>RYR3</i>	
<i>CACNG1</i>	<i>DRD1</i>	<i>GRIA4</i>	<i>HTR2C</i>	<i>KCNE3</i>	<i>KCNJ16</i>	<i>SCN10A</i>	
<i>CACNG2</i>	<i>DRD2</i>	<i>GRID1</i>	<i>HTR3A</i>	<i>KCNE4</i>	<i>KCNJ2</i>	<i>SCN11A</i>	
<i>CACNG3</i>	<i>DRD3</i>	<i>GRID2</i>	<i>HTR3B</i>	<i>KCNF1</i>	<i>KCNJ3</i>	<i>SCN1A</i>	
<i>CACNG4</i>	<i>DRD4</i>	<i>GRIK1</i>	<i>HTR3C</i>	<i>KCNG1</i>	<i>KCNJ4</i>	<i>SCN1B</i>	
<i>CACNG5</i>	<i>DRD5</i>	<i>GRIK2</i>	<i>HTR3D</i>	<i>KCNG2</i>	<i>KCNJ5</i>	<i>SCN2A2</i>	
<i>CACNG6</i>	<i>GABBR1</i>	<i>GRIK3</i>	<i>HTR3E</i>	<i>KCNG3</i>	<i>KCNJ6</i>	<i>SCN2B</i>	
<i>CACNG7</i>	<i>GABBR2</i>	<i>GRIK4</i>	<i>HTR4</i>	<i>KCNG4</i>	<i>KCNJ8</i>	<i>SCN3A</i>	
<i>CACNG8</i>	<i>GABRA1</i>	<i>GRIK5</i>	<i>HTR5A</i>	<i>KCNH1</i>	<i>KCNJ9</i>	<i>SCN3B</i>	

Supplementary table 1 : List of gene encoding ion channels

Chapitre 6 : Discussion et perspectives

6.1 Succès du WES: l'étude des maladies rares

Les chapitres 2, 3 et 4 montrent comment les technologies de séquençage à haut débit peuvent être utilisées dans l'étude des maladies rares. En effet, elles ont mené à l'identification de mutations causales dans les gènes *DNAJC5* et *ELOVL4* pour les syndromes de Kufs et de Giroux-Barbeau respectivement. Dans les deux cas, des approches similaires ont été employées. Ces deux projets ont débuté par l'étude de familles présentant des syndromes rares bien caractérisés. Dans le cas du syndrome du Kufs, cette maladie avait été décrite depuis plus de 40 ans dans une grande famille américaine et dans quelques petites familles^{319,320}. De façon similaire, le syndrome de Giroux-Barbeau a été caractérisé en 1972 par les dermatologues et neurologues du même nom dans une grande famille canadienne-française³³⁶. Bien que les érythrokratodermies et les ataxies soient bien caractérisées, la combinaison de ces manifestations dans les individus d'une même famille est très rare. À notre connaissance, aucun autre cas n'avait été décrit avec cette symptomatologie. Dans le chapitre 4, le HTS a été utilisé dans un contexte diagnostique. En effet, nous présentons le cas d'une famille atteinte d'un syndrome cutané, où le diagnostic a été effectué suite au WES.

6.1.1 Retour sur les travaux

6.1.1.1 Identification des mutations dans les gènes *DNAJC5* et *ELOVL4*

Considérant la grande taille des deux familles, la rareté du phénotype ainsi que la forte pénétrance de la maladie, le clonage positionnel du gène mutant a été entrepris. Dans les deux cas, des analyses de liaison ont prédit un locus candidat avec une haute confiance statistique. Par la suite, des gènes contenus dans cet intervalle ont été séquencés (via la méthode Sanger) sans toutefois révéler de mutation causale. Le biais introduit lors du séquençage des gènes candidats est probablement responsable de ces succès. En effet, en raison du nombre élevé de gènes présents dans les deux intervalles (plus de 30 et 200 dans les chapitre 2 et 3 respectivement), certains d'entre eux ont dû être priorisés pour le séquençage Sanger selon les critères suivants : l'expression tissulaire, la fonction du gène, ainsi que son implication dans

d'autres maladies (approche par gène candidat). Par exemple, dans l'étude impliquant les patients atteints du syndrome de Giroux-Barbeau, plusieurs candidats intéressants ont été séquencés : deux gènes codant des connexines (celles-ci ont déjà été associées aux érythrokratodermies), le gène *SNAP91* associé à un syndrome neurocutané et le gène *DST*. Puisque des mutations dans ce dernier chez la souris ont été associées à la neurodégénérescence ainsi qu'à une altération des propriétés de la peau ⁴¹³, ce gène représentait un candidat de choix. Toutefois, aucune mutation n'a pu être identifiée ⁴¹⁴. De la même manière, bien que présent dans l'intervalle candidat, le gène *ELOVL4* n'avait pas été séquencé. Ainsi, l'approche par WES a permis de mettre en place une stratégie non biaisée afin d'identifier les mutations causatives.

En 2009, lorsque le WES est devenu disponible à la communauté scientifique, nous avons utilisé cette approche pour identifier les gènes causatifs des syndromes de Kufs et de Giroux-Barbeau. Toutefois, puisque le WES génère le portrait mutationnel de l'ensemble des gènes du génome, des stratégies ont dû être développées afin de filtrer les variations qui ne sont pas associées à la maladie. Parmi celles-ci, le séquençage de plusieurs individus atteints d'une même famille permet de réduire le nombre de variations candidates. En effet, puisque les maladies rares sont généralement causées par des mutations fortement pénétrantes, il est attendu que tous les individus atteints de la famille soient porteurs de la mutation. De plus, la sélection de patients qui sont plus éloignés génétiquement permet de réduire le nombre de variations partagées entre les individus séquencés. Dans les chapitres 2 et 3, trois individus atteints ont été choisis pour le séquençage. Dans ces études, les trois patients partageaient 12,5% et 25% de leur génome, pour le syndrome de Kufs et Giroux-Barbeau respectivement. Toutefois, puisque des polymorphismes propres à la population peuvent être introduits dans les premières générations d'une famille, et ainsi être partagés par un grand nombre d'individus, une attention particulière doit être portée aux variations avec une fréquence allélique très basse dans la population. En combinant cette approche avec des études de liaison, il est possible d'établir un filtre positionnel qui restreint beaucoup le nombre de candidats susceptibles d'être causatifs. Au contraire des approches traditionnelles décrites précédemment, celle-ci est empirique et est basée sur un modèle statistique fourni par l'analyse de liaison. Ainsi, elle n'est pas biaisée et peut plus facilement permettre la découverte de nouvelles associations entre des gènes et des maladies. Avec cette approche, le nombre de variations génétiques présentes chez les 3 individus

séquencés (par famille) et contenues dans l'intervalle fourni par l'analyse de liaison était très bas. Ainsi, la mutation p.L116del dans le gène *DNAJC5* a été associée au syndrome de Kufs et la mutation p.L168F dans le gène *ELOVL4* a été associée au syndrome de Giroux-Barbeau.

6.1.1.2 Identification de la mutation dans le gène *TREX1*

L'étude présentée dans le **chapitre 4** découle d'une collaboration avec le Dr Philippe Bégin qui, depuis plusieurs années, étudie une grande famille avec des lésions cutanées au niveau des extrémités suite à l'exposition au froid. Les manifestations cliniques des patients sont compatibles avec la cryofibrinogénémie, une maladie cutanée généralement secondaire à d'autres pathologies pour laquelle seulement quelques cas familiaux ont été décrits. En raison de sa taille et de la forte pénétrance du phénotype, cette famille représentait une opportunité pour la découverte des mécanismes génétiques sous-jacents. Dans cette famille, la maladie semblait être transmise selon un mode de transmission autosomique dominant. Considérant le rôle possible du fibrinogène dans la maladie, les trois gènes codant pour celui-ci ont été séquencés par la méthode Sanger, sans toutefois révéler de mutation. Ainsi, suite aux succès obtenus précédemment (**section 6.1.1.1**), le WES a été effectué chez trois patients avec une symptomatologie bien caractéristique et représentative du phénotype clinique de la famille. En raison de l'absence d'analyse de liaison dans cette famille, les variations rares à l'échelle génomique ont été inspectées. Bien que tout le génome ait été interrogé, seulement 4 variations rares, codantes et présentes chez les trois individus ont été retrouvées. En raison de leur implication avec des maladies incluant des manifestations cutanées, les mutations p.R1497C dans le gène *COL7A1* et p.D18N dans *TREX1* ont été priorisées. Par séquençage Sanger, les deux variations ont été confirmées chez tous les individus atteints de la famille. Il est intéressant de noter la proximité physique des deux variations (100k pb). Aussi, les mutations dans le gène *COL7A1* ont été reportées chez des patients atteints d'épidermolyse bulleuse dystrophique. Toutefois, les manifestations cutanées caractéristiques de ce syndrome ne sont pas causées par une exposition au froid, un critère important chez nos patients. Pour ces raisons, la présence de cette mutation dans 19 patients de notre famille pourrait être expliquée par un déséquilibre de liaison plutôt que par une association avec la maladie.

6.1.2 Validation des découvertes génétiques

Dans les études génétiques, afin de confirmer l'association d'un gène et d'une maladie, il est important que plusieurs familles soient étudiées. Ainsi, dans le chapitre 2, l'implication du gène *DNAJC5* dans le syndrome de Kufs a été démontrée dans deux autres cas/familles. En effet, nous avons retrouvé la mutation p.L116del dans une autre famille américaine et la mutation p.L115R dans un cas sporadique. Pour ce patient, l'historique familial ne suggérait pas la présence d'une maladie neurologique. Dans les deux cas, le phénotype clinique était compatible avec le syndrome de Kufs. Nous avons également montré que la mutation p.L116del retrouvée dans les deux familles américaines n'était pas comprise dans un haplotype commun indiquant qu'il s'agit d'une mutation récurrente. Dans le cas du patient avec la mutation p.L115R, il est possible que la mutation soit survenue de manière *de novo*. Au moment de la publication de notre article, d'autres groupes ont rapporté les mêmes mutations (p.L116del et p.L115R) dans d'autres familles/cas corroborant ainsi nos trouvailles. À l'heure actuelle, 8 familles/cas ont été décrites avec des mutations dans le gène *DNJAC5*²³⁷. À l'instar de nos résultats, un patient parmi ceux-ci ne présentait aucun historique familial d'épilepsie, de démence ou autres troubles neurologiques. De plus, la récurrence des mutations p.L116del et p.L115R sur des haplotypes distincts suggère que les résidus 115 et 116 sont des points chauds (« hotspots ») mutationnels. Ils sont caractérisés par une fréquence mutationnelle particulièrement élevée et peuvent être causés par la présence de séquences répétées⁴¹⁵. Ainsi, la série de résidus cystéines retrouvée à proximité des mutations p.L116del et p.L115R pourrait expliquer la récurrence des mutations associées au syndrome de Kufs. Dans notre étude sur le syndrome de Giroux-Barbeau, en raison de la rareté de la maladie, d'autres familles avec une symptomatologie similaire n'ont pu être recrutées. Toutefois, la confirmation de l'implication de ce gène dans la maladie est venue en 2015, lorsque qu'un autre groupe a identifié une nouvelle mutation faux-sens (p.Q180P) dans ce gène chez un patient présentant un phénotype clinique similaire⁴¹⁶. Dans le chapitre 4, une revue de la littérature nous a permis de constater que la mutation dans le gène *TREX1* (p.D18N) était déjà associée à plusieurs maladies notamment le syndrome d'Aicardi-Goutières ainsi que le lupus érythémateux avec engelure^{295,297}. De façon intéressante, l'évaluation clinique de ces patients n'indiquait ni l'une ni l'autre des pathologies. Toutefois, la similarité des manifestations

cutanées retrouvées au sein de ces maladies était frappante. L'étude de cette famille représente un bon exemple du rôle du WES dans un contexte de diagnostic clinique (**section 6.1.4**).

6.1.3 Impact des découvertes sur les maladies neurodégénératives

Comme démontré dans la section précédente, la découverte des gènes associés à des syndromes rares est facilitée par la forte pénétrance des mutations et la présence de grandes familles avec plusieurs individus atteints. Outre leur rôle dans le diagnostic génétique (**section 6.1.4**), ces découvertes permettent une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires causant la maladie. Aussi, la présence de neurodégénérescence, d'ataxie et de démence, dans les épilepsies myocloniques progressives peut contribuer à l'avancement des connaissances d'autres maladies neurologiques plus communes avec une symptomatologie similaire. En effet, une étude récente a montré des changements dans les niveaux d'expression de 17 protéines dans des échantillons de cerveau de patients positifs pour des mutations dans le gène *DNAJC5*. Parmi celles-ci la palmitoyl-thio estérase 1 (PPT1), une enzyme déjà associée à CLN1, une autre forme de NCL, montrait le changement le plus important. Ainsi, les auteurs ont établi un lien entre deux formes de NCL suggérant des mécanismes neurodégénératifs communs. De plus, une analyse des interactions entre les protéines exprimées différemment dans le cerveau des patients suggérait l'implication de celles-ci dans des voies biologiques d'autres maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer et Huntington ⁴¹⁷. Finalement, les auteurs présentent plusieurs protéines avec des profils d'expression altérée qui, à l'heure actuelle, n'ont aucune association directe avec des pathologies humaines et pourraient représenter de bons candidats dans des études futures ⁴¹⁷. Plusieurs modèles expérimentaux ont montré que la protéine CSP α (codé par le gène *DNAJC5*) avait un rôle neuroprotecteur ^{333,418,419} (**section 2.2.5**) et les études fonctionnelles sur celle-ci ont montré qu'elle participait à la sauvegarde des protéines synaptiques mal repliées. De plus, les souris n'exprimant pas la protéine CSP α montrent une neurodégénérescence sélective qui semble être dépendante de l'activité neuronale ⁴²⁰. Toutefois, c'est la découverte des mutations dans le gène *DNAJC5* chez des patients atteints du syndrome de Kufs qui a permis d'établir les premiers liens entre ce gène et les maladies neurodégénératives. Sachant que des mécanismes similaires ont été suggérés afin d'expliquer plusieurs maladies neurodégénératives comme le Parkinson, l'Alzheimer, ou la maladie de

Huntington^{331-333,421}, l'étude des syndromes familiaux permet d'obtenir des pistes de recherche additionnelles pour des maladies avec des manifestations cliniques communes.

À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif pour les NCLs et celui-ci consiste principalement à contrôler les symptômes de la maladie⁶⁸. Plusieurs stratégies de traitements curatifs sont actuellement étudiées comme la thérapie génique, la thérapie par cellule souche et la thérapie pharmacologique (revue dans⁴²²). Celles-ci requièrent le développement de modèles expérimentaux comme la drosophile, la souris, le poisson zèbre, et le chien⁴²³. L'identification des mutations dans le gène *DNAJC5* a mené la communauté scientifique à développer un modèle expérimental utilisant le nématode *C.elegans* pour étudier le syndrome de Kufs. Bien que celui-ci soit très utilisé dans l'étude des maladies neurodégénératives^{424,425}, il est peu utilisé dans le contexte des NCLs⁴²⁶. En 2014, Kashyap et coll. ont montré qu'un modèle de *C.elegans* mutant pour le gène *DNAJC5* (*dnj-14* chez *C.elegans*) présentait un phénotype compatible avec le syndrome de Kufs⁴²⁷. En effet, comme dans les autres modèles animaux^{328,428}, celui-ci présentait une mort prématurée, une neurodégénérescence à l'âge adulte et des troubles locomoteurs. Les auteurs ont aussi montré que le traitement pharmacologique au resveratrol augmentait la durée de vie des vers mutants en plus de prévenir partiellement la neurodégénérescence⁴²⁷. L'utilisation de modèles animaux mutants pour des gènes associés à des pathologies peut donc orienter les recherches afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielle. Toutefois, d'autres essais cliniques sont nécessaires afin d'en déterminer la validité chez l'homme.

Dans le chapitre 3, nous rapportons l'association d'une mutation dans le gène *ELOVL4* avec le syndrome de Giroux-Barbeau, un syndrome neurocutané rare associée à l'ataxie, l'érythrokratodermie et la neurodégénérescence. Cette étude a notamment permis de mettre en évidence le rôle du métabolisme des acides gras à très longues chaînes dans les maladies neurocutanées et les ataxies héréditaires. En effet, peu après la publication de nos travaux, un groupe de recherche a rapporté deux mutations dans le gène *ELOVL5* dans des cas présentant une ataxie spinocérébelleuse sans autres manifestations cliniques (SCA38)⁴²⁹. L'approche utilisée par les auteurs est similaire à celle décrite dans notre étude. Toutefois, suite à l'identification d'un locus candidat, la mutation p.G230V a été identifiée via le séquençage à

haut débit de tous les gènes contenus dans cet intervalle. Leurs découvertes ont été validées dans une cohorte de 456 patients avec ataxie spinocérébelleuse. Trois autres familles avec une mutation dans *ELOVL5* ont été identifiées (2 familles avec p.G230V, 1 famille avec p.L72V). Une comparaison de l'expression tissulaire des gènes *ELOVL4* et *ELOVL5* montre que les deux gènes sont exprimés dans le cerveau^{358,429}. Toutefois, le gène *ELOVL5* n'est que très peu exprimé au niveau de la peau, ce qui peut expliquer la différence phénotypique entre les patients atteints du syndrome de Giroux-Barbeau et les patients atteints de SCA38. Néanmoins, la grande diversité des élongases (*ELOVL1-7*), ainsi que la présence d'autres acteurs dans la voie de synthèse des acides gras à très longue chaîne, indique que celle-ci pourrait être perturbée par des mutations dans d'autres gènes. Ainsi, considérant le rôle du métabolisme des lipides dans le développement du système nerveux central, ceux-ci représentent de bons candidats pour le criblage de gènes dans d'autres maladies neurologiques avec ou sans manifestations cutanées.

L'hétérogénéité des maladies associées au gène *ELOVL4* est intrigante. En effet, des mutations hétérozygotes (non-sens) causent la maladie de Stargardt (type 3)^{351,358,430,431} et des mutations homozygotes (non-sens) causent une ichtyose congénitale avec troubles neurologiques sévères^{289,432}. Récemment, une nouvelle mutation faux-sens (p.W246G) a été identifiée dans 2 familles présentant une ataxie spinocérébelleuse pure⁴³³. Sachant que la mutation rapportée est également une mutation faux-sens, l'absence des manifestations cutanées chez ces familles est intrigante. Toutefois, en comparant les structures protéiques prédites, les auteurs ont montré que les mutations p.W246G (*ELOVL4*) et p.G230V (*ELOVL5*) étaient, toutes deux, situées tout près de la membrane lipidique du reticulum endoplasmique dans une boucle située dans la lumière du réticulum endoplasmique. Ainsi, sachant qu'une structure à sept domaines transmembranaires est prédite pour *ELOVL4* et *ELOVL5*, et que les mutations sont toutes deux situées près du septième domaine transmembranaire, un mécanisme commun pourrait causer le phénotype ataxique chez ces patients. Pour sa part, la proximité de la mutation p.L168F (décrite au **chapitre 3**) (*ELOVL4*) avec un motif important pour l'activité enzymatique de la protéine pourrait entraîner une perte de fonction partielle de la protéine. Considérant que des mutations tronquantes homozygotes, entraînant une perte de fonction, ont été associées à une forme d'ichtyose congénitale et des troubles neurologiques sévères, cette mutation faux-sens pourrait altérer la fonction de la protéine normale et provoquer un phénotype neurocutané. La

nature de la mutation pourrait être à l'origine du phénotype intermédiaire observée chez nos patients. D'autres études seront nécessaires afin de mieux comprendre cette hétérogénéité clinique.

6.1.4 Impact des découvertes sur le diagnostic génétique

Dans le présent ouvrage, le HTS, plus précisément le WES, a permis les découvertes de nouveaux gènes causant des syndromes rares. Mise à part la contribution de celles-ci à l'avancement des connaissances, elles ont également permis de mettre en place des tests permettant le diagnostic moléculaire. En effet, suite à la découverte des mutations dans le gène *DNAJC5*, celui-ci a été ajouté dans les « panels » de gènes des laboratoires de diagnostic moléculaire (Gene DX, Athena). Considérant les similarités phénotypiques de certaines formes d'épilepsie myoclonique progressive, et la difficulté à diagnostiquer le syndrome de Kufs, l'existence d'un test génétique permet une meilleure prise en charge des patients. À l'heure actuelle, il n'existe pas de test génétique officiel pour le syndrome de Giroux-Barbeau, probablement en raison de la rareté de la maladie. Toutefois, l'intégration du séquençage du gène *ELOVL4* dans un contexte clinique pourrait aider les médecins à mieux diagnostiquer la maladie. Considérant l'hétérogénéité des maladies associées aux mutations dans le gène *ELOVL4*, celui-ci pourrait être associé à d'autres syndromes neurocutanés ou à d'autres ataxies.

Même si, à court terme, ces découvertes ne mèneront probablement pas à la découverte d'un traitement curatif, les patients pourront bénéficier d'un conseil génétique. En effet, sachant que ces deux maladies ont des conséquences dévastatrices à long terme sur la santé et que les principaux symptômes apparaissent généralement après 30 ans, certains souhaiteront savoir s'ils sont porteurs de la mutation. Puisque ces derniers auront 50% des chances de transmettre un allèle mutant, et que celui-ci prédispose fortement à une maladie neurodégénérative sévère, ils pourront choisir de procréer ou non. Dans le **chapitre 4**, la mutation identifiée dans le gène *TREX1* avait déjà été associée à d'autres maladies. Ainsi, puisque d'autres cas ont été répertoriés avec des symptômes similaires, d'autres stratégies de traitement pourraient être envisagées. Celles-ci pourraient, notamment, être basées sur le traitement des autres cas rapportés. Comme

pour les syndromes de Kufs et Giroux-Barbeau, les patients pourront bénéficier d'un conseil génétique.

La popularité du WES dans le contexte clinique est grandissante. Plusieurs sujets devront être adressés avant son utilisation routinière en milieu hospitalier. En particulier, l'identification de variations avec importance clinique non reliées à la condition initialement étudiée – les découvertes fortuites. À l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus quant à la façon de définir, d'analyser et de reporter ces variations aux patients ⁴³⁴. Toutefois, une liste de 56 gènes devant être investigués à la recherche de mutations a été proposée par le Collège Américain des Médecins Généticiens (ACMG) ⁴³⁵. Malgré les progrès effectués dans les dernières années, ce sujet demeure propice au débat. Considérant les résultats prometteurs de cette approche dans plusieurs laboratoires autour du monde (États-Unis ⁴³⁶, France ⁴³⁷, Pays-Bas ⁴³⁸), des critères spécifiques devront être établis avant que celle-ci remplace complètement les approches moléculaires plus ciblées ⁴³⁴.

6.1.5 L'étude des maladies rares : la suite

Dans cette thèse, nous avons démontré le rôle du séquençage à haut débit dans l'identification des gènes pour les maladies rares et dans le diagnostic moléculaire. L'utilisation du WES dans un contexte clinique a permis de mettre en évidence l'interdépendance de ces deux disciplines. Par exemple, une étude publiée en 2012 a montré que l'utilisation du WES chez 12 patients a permis d'identifier la cause génétique de six d'entre eux. Parmi ceux-ci, deux patients souffrant d'anomalies congénitales avec ou sans retard intellectuel avaient des mutations *de novo* dans le gène *EFTUD2*. Initialement, ils ne semblaient pas appartenir à la même entité clinique quoique quelques manifestations étaient communes aux deux patients ⁴³⁹. Après cette découverte, les mutations dans le gène *EFTUD2* ont été retrouvées dans 12 patients additionnels avec une forme de microcéphalie et un trouble de l'ossification mandibulo-faciale ⁴⁴⁰. En raison des ressemblances phénotypiques des patients de ces deux études, un diagnostic a pu être suggéré. Ainsi, cette étude montre qu'en étudiant des syndromes avec un grand spectre phénotypique, il est possible de lier des manifestations cliniques avec des mutations dans un gène commun. Ils ont également montré que le diagnostic n'aurait pu être fait sans l'association préalable de ces

gènes avec d'autres maladies. L'étude montre également que l'approche non biaisée du WES permet de faire des associations qui n'auraient pu être faites par une approche uniquement basée sur l'évaluation clinique et des gènes candidats. Cette capacité à lier les informations génétiques et cliniques ouvre la voie sur la médecine personnalisée. Par exemple, le cas d'une fillette atteinte d'une maladie neurologique progressive où le WES a identifié des mutations dans le gène *SLC52A2* qui code pour un transporteur à la riboflavine (vitamine B2). Ainsi, en administrant de hautes doses de vitamine B2, les médecins ont pu améliorer grandement la condition de celle-ci (Goldstein DB, communication personnelle). Dans le même ordre d'idées, des études ont suggéré que les effets délétères des mutations dans le gène *KCNT1* associé à l'épilepsie du nourrisson avec crises partielles migratoires (EIMFS) et l'ADNFLE pouvaient être renversés avec un traitement à la quinidine ⁴⁴¹. Sachant que la majorité des patients ADNFLE ont des mutations dans le gène *CHRNA4* et que l'EIMFS et l'ADNFLE ont des portraits cliniques différents, le séquençage à haut débit peut avoir un impact majeur sur les traitements et donc sur la santé publique. Dans le futur, les études génétiques devraient être faites en première ligne lors de l'évaluation médicale des patients. En effet, celles-ci pourraient permettre l'identification de maladies associées à des mutations dans une même famille de gènes, mais avec différentes manifestations cliniques.

6.2 Limites du WES : Étude génétique des épilepsies génétiques généralisées

Suite aux succès des études présentées dans la **section 6.1**, nous avons émis l'hypothèse que le WES chez des patients provenant de familles avec épilepsie génétique généralisée pourrait révéler de nouveaux gènes ou de nouvelles mutations causatives. En effet, même si les épilepsies monogéniques ne représentent que 1 à 2%, le nombre d'individus atteints ainsi que la structure des familles portaient à croire que certaines d'entre elles pourraient être expliquées par une défectuosité dans un seul gène. Nous avons donc entrepris l'étude génétique de ces familles par le WES.

6.2.1 Retour sur les travaux

Malgré les succès évidents de l'utilisation du WES dans l'identification des gènes causatifs pour des maladies rares, le **chapitre 5** montre les limites de cette méthode pour l'étude des traits génétiques complexes comme l'épilepsie généralisée. En effet, nous avons tenté d'identifier de nouvelles causes monogéniques pour des épilepsies génétiques généralisées. Pour ce faire, 7 familles atteintes de GGE ont été étudiées. Dans ces familles, les patients étaient atteints des syndromes électro-cliniques typiques des GGE (JME et CAE) et la maladie présentait une transmission compatible avec un modèle dominant. À l'instar des **chapitres 2, 3 et 4**, trois patients par familles avec un phénotype homogène et possédant la plus grande distance génétique ont été sélectionnés pour le WES. Les données provenant des 21 individus séquencés ont été analysées simultanément afin d'obtenir la fréquence allélique des variations dans notre population. Cette approche a permis de filtrer les variations communes et bénignes propres à la population canadienne-française. En considérant uniquement les variations ayant un effet fonctionnel sur la protéine (non-sens, faux-sens, indel, épissage, etc.) un peu plus de 1000 variations ont été identifiées. Parmi celles-ci, une vingtaine ont été choisies pour les analyses de ségrégation familiale. Celles-ci permettent de valider la présence de la mutation chez les autres membres de la famille. Comme démontré dans les chapitres précédents, l'hypothèse derrière les maladies monogéniques repose sur l'identification de mutation ayant une très forte pénétrance sur le phénotype. Ainsi, il est attendu que celle-ci soit présente chez tous (ou sinon la grande majorité) des patients. Malgré l'étude de familles avec phénotype et origine ethnique très homogène, nous n'avons pas pu identifier une cause génétique unique dans nos familles de GGE. En effet, nous avons identifié plusieurs variations candidates avec ségrégation partielle (les individus atteints de la famille ne sont pas tous porteurs de la mutation). Néanmoins, les gènes *GLI2*, *MBD5*, *CELSR2*, *CELSR3*, *TNIK* et *CACNA1G*, semblent prometteurs et pourraient jouer un rôle dans la maladie. Nos travaux montrent bien la complexité de l'architecture génétique des épilepsies et la **section 6.2.2** présente les défis rencontrés.

6.2.2 Les études de familles d'épilepsie génétique

Dans le chapitre 5, bien que nos familles suggéraient un mode de transmission monogénique, une cause génétique unique n'a pu être identifiée hors de tout doute. En effet, suite au séquençage de trois individus par famille, nous avons identifié un grand nombre de variations. La faible distance génétique entre les individus pourrait être à l'origine de cet obstacle. Afin d'en réduire le nombre pour effectuer les analyses de ségrégation familiale, les gènes codant les canaux ioniques ainsi que ceux précédemment associés à l'épilepsie ont été priorisés. Même si ceux-ci représentent les meilleurs candidats, il n'est pas impossible que des mutations dans d'autres gènes avec des fonctions moins connues soient associées à la maladie dans nos familles. Donc, en raison du nombre élevé de variations identifiées, des méthodes de priorisation ont dû être employées et celles-ci représentent un obstacle majeur à la découverte de nouveaux mécanismes pathogéniques. L'utilisation de méthodes non biaisées comme l'identification de segment identique par descendance (« identity by descent ») pourrait révéler l'implication inattendue d'autres gènes. En effet, cette approche permet de prioriser les variations situées sur des intervalles génomiques partagés par tous les individus atteints. Tel que discuté dans la **section 6.1**, la méthodologie introduit un lourd biais basé sur les hypothèses existantes.

Les analyses de ségrégation dans les familles d'épilepsie génétique généralisée présentent aussi des défis. En effet, au contraire des familles présentées aux **chapitres 2, 3 et 4**, celles présentés ici contenaient des individus sains porteurs de mutations. Ainsi, pour ces individus, la mutation a une pénétrance incomplète sur le phénotype. Les résultats observés dans notre étude sont consistants avec la littérature. En effet, même si les épilepsies monogéniques sont causées par des mutations ayant un fort effet sur le phénotype, on retrouve plusieurs exemples où la mutation causative a une pénétrance réduite ⁴⁴². Ce concept pourrait, entre autres, être expliqué par la présence d'allèle protectrice. À titre d'exemple, des modèles murins ont montré qu'individuellement, l'inactivation des gènes *KCNA1* et *CACNA1A* causait un phénotype épileptique. Toutefois, lorsque ces deux gènes sont inactivés chez le même animal, le phénotype est perdu ⁴⁴³. De plus, les épilepsies génétiques généralisées sont un groupe de maladies très hétérogènes. Ainsi, au sein d'une même famille, plusieurs SE cliniques peuvent être retrouvés. L'absence de mutation chez des patients avec des SE différents pourrait être expliquée par la

présence de plusieurs causes génétiques dans la même famille (phénocopie). En résumé, en contraste avec les maladies rares présentées aux **chapitres 2, 3 et 4**, les analyses de ségrégation familiales ne sont pas toujours garantes de succès. De plus, la coségrégation partielle des mutations pourrait jouer un rôle important dans l'expression du phénotype épileptique. L'identification de mutations additionnelles dans les gènes *GLI2*, *MBD5*, *CELSR2*, *CELSR3*, *TNIK* et *CACNA1G* dans d'autres familles pourrait renforcer le rôle de ceux-ci dans la maladie. L'évaluation du fardeau mutationnel (« mutation burden ») de ces gènes dans une grande cohorte de patients épileptiques pourrait, aussi, être utilisée afin de confirmer l'implication de ceux-ci dans l'épilepsie. Dans le but d'élucider le rôle de la génétique dans ces familles, d'autres approches devront être utilisées.

6.2.3 Limitations du WES

6.2.3.1 Biais de sélection envers les régions codantes

La majorité des études utilisant le séquençage à haut débit ont priorisé les régions codantes. Bien que plusieurs mutations causatives aient été identifiées avec cette méthode, elle présente certaines limitations. Par exemple, puisque la capture des exons est dépendante des bases de données d'annotation de gènes (refSeq, CCDS), ceux qui n'ont pas été décrits ne peuvent être séquencés. De plus, certains d'entre eux peuvent ne pas être bien capturés pour diverses raisons et donc, avoir une couverture inférieure à la moyenne. Ceci peut avoir un impact important, notamment lors de l'utilisation des fréquences alléliques provenant des bases de données populationnelles de séquençage. Des fréquences erronées peuvent être rapportées si la base en question n'est pas bien couverte par le séquençage. En résumé, les limitations techniques de la méthode peuvent limiter la découverte de nouvelles causes génétiques.

Bien que peu étudiées en raison de leur taille et de leur diversité, les régions non codantes pourraient expliquer une partie du portrait génétique des épilepsies génétiques complexes. Ainsi, les recherches futures en épilepsie pourraient être guidées par les progrès effectués dans d'autres maladies avec un mode de transmission complexe. Par exemple, une méta analyse des GWAS de 75000 patients a permis l'association de 163 loci indépendants avec les maladies

inflammatoires de l'intestin (« inflammatory bowel disease », IBD) ⁴⁴⁴. Pour la recherche en épilepsie, les GWAS devront se faire sur un très grand nombre de patients. De plus, une caractérisation très précise du phénotype pourrait être nécessaire. On peut penser que les syndromes électro-cliniques des épilepsies généralisées auront des mécanismes génétiques différents.

Un des problèmes majeurs des GWAS est la caractérisation des mécanismes causatifs des loci/SNP associé à la maladie. En effet, puisque ceux-ci n'affectent généralement pas la séquence des protéines, d'autres approches doivent être utilisées afin de démontrer leur contribution au phénotype. Parmi les approches utilisées, les analyses eQTL permettent de mesurer le rôle d'une mutation génétique sur l'expression de gènes contenus dans un locus. Toutefois, cette approche requiert des données d'expression protéique (RNAseq) ⁴⁴⁵. Outre les polymorphismes identifiés par GWAS, les ARN non codants, les séquences promotrices et les « enhancers » sont des exemples de régions pouvant avoir un effet important sur l'expression des gènes ⁴⁴⁶. Au contraire du WES, celles-ci peuvent être interrogées par le séquençage du génome entier (WGS).

D'autres disciplines, comme l'épigénétique, ont montré des résultats intéressants. Celle-ci regroupe plusieurs mécanismes moléculaires comme la méthylation de l'ADN et la modification des histones, et sont responsables de la modulation de l'expression génique. Ces changements sont causés par des stimuli provenant de l'environnement et peuvent être maintenus bien après l'exposition initiale. Ainsi, le contrôle de l'expression génique par des mécanismes épigénétiques joue un rôle important dans le développement du cerveau, mais aussi dans plusieurs maladies neurologiques incluant l'épilepsie ⁴⁴⁷. À titre d'exemple, le syndrome de Rett, associé au retard intellectuel et à l'épilepsie, est principalement causé par des mutations dans le gène *MECP2* ³⁹⁹. Considérant le rôle de celui-ci dans la méthylation de l'ADN, on peut penser que la maladie soit causée par l'altération de l'expression des gènes sous le contrôle de *MECP2* (revue des mécanismes épigénétiques associés à l'épilepsie dans ⁴⁴⁸). Dans le futur, des méthodes alternatives devront être utilisées. Ainsi, une plus grande utilisation des méthodes de séquençage à haut débit (CHiPseq, Methylseq, RNAseq) pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes épigénétiques en épilepsie.

6.2.3.2 Limitations techniques

Outre le biais envers les régions codantes, le WES présente également certaines limitations techniques. Parmi celles-ci, l'identification de variations génétiques qui ne sont pas vraies (faux positifs). Bien que la détection des variations nucléotidiques simples s'effectue généralement avec une bonne sensibilité (capacité à détecter les vraies mutations), on retrouve un taux plus élevé de faux positifs dans le cas des petites insertions/délétions⁴⁴⁹. En effet, en raison de la nature de ces mutations, celles-ci posent plus de problèmes pour l'analyse⁴⁵⁰. L'abondance des régions répétées dans le génome (>50%) complique également l'analyse des données. Une fois séquencé, ces fragments peuvent correspondre à plusieurs régions dans le génome ce qui complexifie l'identification des mutations causatives dans ces régions. Malgré ces défis, il est possible d'utiliser des mesures de la qualité des données de séquençage afin de réduire le nombre de faux-positifs⁴⁵¹. De plus, les variations ayant potentiellement un impact clinique peuvent être validées par une autre méthode (Sanger). Le seuil de détection peut également être un obstacle à la découverte de mutations causatives. Toutefois, celui-ci peut atteindre 95% si la couverture de séquençage est supérieur à 40X⁴⁵².

6.2.3.3 Identification des variations structurales

Les limitations techniques du WES ne permettent également pas d'identifier efficacement les CNVs. Parmi les méthodes à envisager pour ce genre d'analyse, on retrouve les puces d'hybridation génomique comparative (CGH) et les micropuces SNP. Bien que les puces CGH permettaient initialement de détecter les événements de plus de 100000 pb, deux études utilisant des puces à très haute densité ont permis l'identification de CNVs jusqu'à 500 pb. Néanmoins, ces deux méthodes semblent surtout efficaces pour la détection des événements de quelques milliers de paires de bases⁴⁵³. Au contraire, l'utilisation du WGS permet de détecter des CNVs de petites tailles (>50pb). Cette augmentation de la résolution permet de détecter des événements affectant quelques exons en plus de fournir de l'information sur les points de cassure de l'ADN (« breakpoints »). De plus, elle permet d'identifier plusieurs types de variations structurales (insertion, délétion et duplication) avec une seule réaction de WGS. À l'heure actuelle, le WGS reste une méthode très coûteuse qui pose plusieurs problèmes, notamment au niveau de la quantité de données générées. Toutefois, considérant le rôle des CNVs dans la

pathogénèse de l'épilepsie, les études futures à grande échelle bénéficieraient grandement de WGS (revue sur les méthodes de détection des CNVs dans ⁴⁵³).

6.2.4 Perspectives : modèle oligogénique

À la lumière de nos résultats, il est impossible de conclure hors de tout doute que le phénotype épileptique observé dans nos familles n'est pas causé par une variation avec un fort effet. En effet, plusieurs variations coségrègent bien avec le phénotype. De plus, comme discuté plus haut, plusieurs mécanismes génétiques n'ont pas été investigués. Toutefois, nous avons également identifié d'autres variations avec des coségrégations partielles. Comme la plupart des épilepsies génétiques généralisées suivent un mode de transmission complexe, celui-ci pourrait expliquer les causes génétiques de nos familles. En effet, une étude à grande échelle a investigué les régions codantes de 118 cas avec JME ou AE et de 242 individus contrôles. Suite à l'identification de tous près de 4000 variations, celles-ci ont été interrogées dans une cohorte additionnelle de 878 patients GGE et 1830 contrôles. Les auteurs ont démontré qu'aucune d'entre elles n'était associée spécifiquement à la maladie. Ainsi, cette étude met l'accent sur l'hétérogénéité génétique des épilepsies et suggère que l'effet individuel de chacune de ces variations est faible ³⁹⁰. Ce genre d'étude supporte l'hypothèse d'une transmission complexe dans l'épilepsie. Même si individuellement, les mécanismes décrits aux **sections 6.2.2 et 6.2.3** sont des approches prometteuses, on pourrait penser que le phénotype épileptique est causé par l'effet combinatoire de plusieurs d'entre eux. D'autres méthodes, comme le WGS, pourront, dans le futur, fournir des pistes additionnelles dans la découverte des mécanismes causatifs.

Chapitre 7 : Conclusions

L'épilepsie est une maladie neurologique très hétérogène qui peut être associée à d'autres pathologies. En effet, l'épilepsie peut être associée à des maladies métaboliques, inflammatoires et immunitaires, ce qui suggère que des mécanismes physiopathologiques différents sous-tendent la maladie. De la même façon, l'épilepsie est également une manifestation clinique des syndromes neurocutanés. Plus de trente gènes ont été associés à l'épilepsie, et ce, principalement

grâce aux études de familles et du clonage positionnel. Toutefois, cette approche présente des limitations, en particulier lorsque les régions candidates contiennent un grand nombre de gènes. Dans cette thèse, nous avons montré qu'une approche de séquençage à haut débit est utile afin d'identifier les causes génétiques de maladies rares. L'étude des maladies rares contribue à une meilleure compréhension des maladies plus communes qui présentent une symptomatologie similaire. Une utilisation plus répandue du WES dans le futur permettrait d'associer des pathologies phénotypiquement différentes, mais ayant une cause génétique commune. Ainsi, le WES peut grandement contribuer au diagnostic génétique des maladies. En revanche, bien que les succès de cette approche dans les maladies rares soient indéniables, nos travaux sur les épilepsies génétiques généralisées montrent les limitations de celles-ci pour l'étude des traits génétiques complexes. Comme décrit dans les **sections 6.2.2 et 6.2.3**, d'autres approches devront être utilisées afin d'expliquer l'étiologie génétique des épilepsies généralisées.

Références

1. Wolf, P. History of epilepsy: nosological concepts and classification. *Epileptic Disord* **16**, 261–269 (2014).
2. Fisher, R. S. *et al.* Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* **46**, 470–472 (2005).
3. Fisher, R. S. *et al.* ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* **55**, 475–482 (2014).
4. Berg, A. T. *et al.* Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia* **51**, 676–685 (2010).
5. Engel, J., Birbeck, G. L., Diop, A. G., Jain, S. & Palmmini, A. *Epilepsy: Global Issues For The Practicing Neurologist. Seminars in Clinical Neurology* **2**, (Demos Medical Publishing, 2005).
6. Scheffer, I. E. *et al.* The Organization of the Epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology Ingrid. 6–10
7. Shorvon, S. D. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia* **52**, 1052–1057 (2011).
8. Schwartzkroin, P. A., Roper, S. N. & Wenzel, H. J. Cortical dysplasia and epilepsy: animal models. *Adv. Exp. Med. Biol.* **548**, 145–74 (2004).
9. Papetti, L. *et al.* Metabolic epilepsy: An update. *Brain Dev.* **35**, 827–841 (2013).
10. Lancaster, E. & Dalmau, J. Neuronal autoantigens--pathogenesis, associated disorders and antibody testing. *Nat. Rev. Neurol.* **8**, 380–90 (2012).
11. Brenner, T. *et al.* Prevalence of neurologic autoantibodies in cohorts of patients with new and established epilepsy. *Epilepsia* **54**, 1028–1035 (2013).
12. Vezzani, A. *et al.* Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathol.* **131**, 211–234 (2015).
13. Löscher, W. & Brandt, C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol. Rev.* **62**, 668–700 (2010).
14. Löscher, W., Klitgaard, H., Twyman, R. E. & Schmidt, D. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 757–76 (2013).
15. Sillanpää, M. & Schmidt, D. Natural history of treated childhood-onset epilepsy: prospective, long-term population-based study. *Brain* **129**, 617–24 (2006).
16. Kwan, P. *et al.* Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* **51**, 1069–77 (2010).
17. Kwan, P. & Brodie, M. J. Early identification of refractory epilepsy. *N. Engl. J. Med.*

- 342, 314–9 (2000).
18. Salinsky, M. C. Vagus Nerve Stimulation As Treatment for Epileptic Seizures. *Curr Treat Options Neurol* **5**, 111–120 (2003).
 19. Freeman, J. M. *et al.* A blinded, crossover study of the efficacy of the ketogenic diet. *Epilepsia* **50**, 322–325 (2009).
 20. Miller, J. W. & Hakimian, S. Surgical treatment of epilepsy. *Continuum (Minneap. Minn)*. **19**, 730–42 (2013).
 21. Merwick, A., O'Brien, M. & Delanty, N. Complex single gene disorders and epilepsy. *Epilepsia* **53**, 81–91 (2012).
 22. Freitag, C. M., May, T. W., Pfäfflin, M. & König, S. Incidence of Epilepsies and Epileptic Syndromes in Children and Adolescents : A Population-Based Prospective Study in Germany. *Epilepsia* **42**, 979–985 (2001).
 23. Andrade, D. M. & Minassian, B. A. Genetics of epilepsies. *Expert Rev. Neurother.* **7**, 727–34 (2007).
 24. Scheffer, I. E. *et al.* Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. A distinctive clinical disorder. *Brain* **118** (Pt 1), 61–73 (1995).
 25. Picard, F. & Scheffer, I. E. in *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence* (eds. Roger, J., Dravet, C., Genton, P., Tassinari, C. & Wolf, P.) 519–35 (John Libbey Eurotext, 2005).
 26. Magnusson, A., Stordal, E., Brodtkorb, E. & Steinlein, O. Schizophrenia, psychotic illness and other psychiatric symptoms in families with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy caused by different mutations. *Psychiatr. Genet.* **13**, 91–95 (2003).
 27. Khatami, R., Neumann, M., Schulz, H. & Kölmel, H. W. A family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy and mental retardation. *J. Neurol.* **245**, 809–10 (1998).
 28. Cho, Y.-W. *et al.* A Korean kindred with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy and mental retardation. *Arch. Neurol.* **60**, 1625–32 (2003).
 29. Miyajima, T., Kumada, T., Saito, K. & Fujii, T. Autism in siblings with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Brain Dev.* **35**, 155–157 (2013).
 30. Scheffer, I. E. *et al.* Familial partial epilepsy with variable foci: a new partial epilepsy syndrome with suggestion of linkage to chromosome 2. *Ann. Neurol.* **44**, 890–9 (1998).
 31. Klein, K. M. *et al.* Familial focal epilepsy with variable foci mapped to chromosome 22q12: expansion of the phenotypic spectrum. *Epilepsia* **53**, e151-5 (2012).
 32. Xiong, L. *et al.* Mapping of a gene determining familial partial epilepsy with variable foci to chromosome 22q11-q12. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 1698–1710 (1999).
 33. Berkovic, S. F. *et al.* Familial partial epilepsy with variable foci: Clinical features and linkage to chromosome 22q12. *Epilepsia* **45**, 1054–1060 (2004).
 34. Callenbach, P. M. C. *et al.* Familial Partial Epilepsy with Variable Foci in a Dutch

- Family: Clinical Characteristics and Confirmation of Linkage to Chromosome 22q. *Epilepsia* **44**, 1298–1305 (2003).
35. Picard, F. *et al.* Dominant partial epilepsies. A clinical, electrophysiological and genetic study of 19 European families. *Brain* **123** (Pt 6, 1247–62 (2000).
 36. Martin, C. *et al.* A recurrent mutation in DEPDC5 predisposes to focal epilepsies in the French-Canadian population. *Clin. Genet.* 1–5 (2013). doi:10.1111/cge.12311
 37. Ottman, R. *et al.* Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat. Genet.* **10**, 56–60 (1995).
 38. Winawer, M. R., Ottman, R., Hauser, W. A. & Pedley, T. A. Autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: defining the phenotype. *Neurology* **54**, 2173–6 (2000).
 39. Michelucci, R., Pasini, E. & Nobile, C. Lateral temporal lobe epilepsies: clinical and genetic features. *Epilepsia* **50 Suppl 5**, 52–4 (2009).
 40. Psenka, T. M. & Holden, K. R. Benign familial neonatal convulsions; psychosocial adjustment to the threat of recurrent seizures. *Seizure* **5**, 243–5 (1996).
 41. Borgatti, R. *et al.* A novel mutation in KCNQ2 associated with BFNC, drug resistant epilepsy, and mental retardation. *Neurology* **63**, 57–65 (2004).
 42. Steinlein, O. K., Conrad, C. & Weidner, B. Benign familial neonatal convulsions: Always benign? *Epilepsy Res.* **73**, 245–249 (2007).
 43. Berkovic, S. F. *et al.* Benign Familial Neonatal-Infantile Seizures: Characterization of a New Sodium Channelopathy. *Ann. Neurol.* **55**, 550–557 (2004).
 44. Kaplan, R. E. & Lacey, D. J. Benign familial neonatal-infantile seizures. *Am. J. Med. Genet.* **16**, 595–9 (1983).
 45. Vigevano, F. *et al.* Benign infantile familial convulsions. *Eur. J. Pediatr.* **151**, 608–12 (1992).
 46. Scheffer, I. E. & Berkovic, S. F. Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain* **120**, 479–490 (1997).
 47. Singh, R., Scheffer, I. E., Crossland, K. & Berkovic, S. F. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a common childhood-onset genetic epilepsy syndrome. *Ann. Neurol.* **45**, 75–81 (1999).
 48. Weber, Y. G. & Lerche, H. Genetic mechanisms in idiopathic epilepsies. *Dev. Med. Child Neurol.* **50**, 648–654 (2008).
 49. Singh, R. *et al.* Severe myoclonic epilepsy of infancy: Extended spectrum of GEFS+? *Epilepsia* **42**, 837–844 (2001).
 50. Hurst, D. L. Severe myoclonic epilepsy of infancy. *Pediatr. Neurol.* **3**, 269–72 (1987).
 51. Jansen, F. E. *et al.* Severe myoclonic epilepsy of infancy (Dravet syndrome): recognition and diagnosis in adults. *Neurology* **67**, 2224–6 (2006).
 52. Fujiwara, T. *et al.* Mutations of sodium channel ?? subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain* **126**, 531–546

- (2003).
53. Berg, A. T., Shinnar, S., Levy, S. R. & Testa, F. M. Newly diagnosed epilepsy in children: presentation at diagnosis. *Epilepsia* **40**, 445–452 (1999).
 54. Callenbach, P. M. C. *et al.* Long-term outcome of childhood absence epilepsy: Dutch Study of Epilepsy in Childhood. *Epilepsy Res.* **83**, 249–56 (2009).
 55. Wolf, P. *et al.* Juvenile myoclonic epilepsy: A system disorder of the brain. *Epilepsy Res.* **114**, 2–12 (2015).
 56. Berkovic, S. F., Cochiuș, J., Andermann, E. & Andermann, F. Progressive myoclonus epilepsies: clinical and genetic aspects. *Epilepsia* **34 Suppl 3**, S19–S30 (1993).
 57. Kälviäinen, R. Progressive Myoclonus Epilepsies. *Semin Neurol* **35**, 293–299 (2015).
 58. Malek, N., Stewart, W. & Greene, J. The progressive myoclonic epilepsies. *Pract. Neurol.* 1–8 (2015). doi:10.1136/practneurol-2014-000994
 59. Ramachandran, N., Girard, J. M., Turnbull, J. & Minassian, B. a. The autosomal recessively inherited progressive myoclonus epilepsies and their genes. *Epilepsia* **50**, 29–36 (2009).
 60. Kälviäinen, R. *et al.* Clinical picture of EPM1-Unverricht-Lundborg disease. *Epilepsia* **49**, 549–556 (2008).
 61. DiMauro, S. Mitochondrial diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1658**, 80–88 (2004).
 62. Park, J. K. *et al.* Myoclonic epilepsy in Gaucher disease: genotype-phenotype insights from a rare patient subgroup. *Pediatr. Res.* **53**, 387–95 (2003).
 63. Tsuji, S. *Dentatorubral-pallidoluysian atrophy*. *Handbook of clinical neurology* **103**, (2012).
 64. Badhwar, A. *et al.* Action myoclonus-renal failure syndrome: characterization of a unique cerebro-renal disorder. *Brain* **127**, 2173–82 (2004).
 65. Dibbens, L. M. *et al.* SCARB2 mutations in progressive myoclonus epilepsy (PME) without renal failure. *Ann. Neurol.* **66**, 532–6 (2009).
 66. Siintola, E., Lehesjoki, A. E. & Mole, S. E. Molecular genetics of the NCLs - status and perspectives. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1762**, 857–864 (2006).
 67. Mole, S. E. & Cotman, S. L. Genetics of the neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease). *Biochim. Biophys. Acta* **1852**, 2237–41 (2015).
 68. Schulz, A., Kohlschütter, A., Mink, J., Simonati, A. & Williams, R. NCL diseases - clinical perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 1801–6 (2013).
 69. Barbagallo, J. S., Kolodzieh, M. S., Silverberg, N. B. & Weinberg, J. M. Neurocutaneous disorders. *Dermatol. Clin.* **20**, 547–560 (2002).
 70. Cross, J. H. Neurocutaneous syndromes and epilepsy-issues in diagnosis and management. *Epilepsia* **46 Suppl 1**, 17–23 (2005).

71. Crino, P. B., Nathanson, K. L. & Henske, E. P. The tuberous sclerosis complex. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1345–56 (2006).
72. Thiele, E. A. Managing epilepsy in tuberous sclerosis complex. *J. Child Neurol.* **19**, 680–6 (2004).
73. Curatolo, P., Seri, S., Verdecchia, M. & Bombardieri, R. Infantile spasms in tuberous sclerosis complex. *Brain Dev.* **23**, 502–7 (2001).
74. Prather, P. & de Vries, P. J. Behavioral and cognitive aspects of tuberous sclerosis complex. *J. Child Neurol.* **19**, 666–74 (2004).
75. Smalley, S. L. Autism and tuberous sclerosis. *J. Autism Dev. Disord.* **28**, 407–14 (1998).
76. Webb, D. W., Fryer, A. E. & Osborne, J. P. Morbidity associated with tuberous sclerosis: a population study. *Dev. Med. Child Neurol.* **38**, 146–55 (1996).
77. Koh, S. *et al.* Epilepsy surgery in children with tuberous sclerosis complex: presurgical evaluation and outcome. *Epilepsia* **41**, 1206–13 (2000).
78. Jansen, F. E., Van Huffelen, A. C., Algra, †§Ale & Van Nieuwenhuizen, O. Epilepsy Surgery in Tuberous Sclerosis: A Systematic Review. *Epilepsia* **48**, 1477–1484 (2007).
79. Friedman, J., Gutmann, D. H., McCollin, M. & Riccardi, V. *Neurofibromatosis. Phenotype, natural history and pathogenesis.* (Johns Hopkins University Press, 1999).
80. Evans, D. G. *et al.* Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: Estimates from a UK family genetic register service. *Am. J. Med. Genet. Part A* **152**, 327–332 (2010).
81. Huson, S. M. & Hughes, R. A. . *The Neurofibromatoses: A Pathogenetic and Clinical Review.* (1994).
82. Arun, D. & Gutmann, D. H. Recent advances in neurofibromatosis type 1. *Curr. Opin. Neurol.* **17**, 101–105 (2004).
83. Ostendorf, A. P., Gutmann, D. H. & Weisenberg, J. L. Z. Epilepsy in individuals with neurofibromatosis type 1. *Epilepsia* **54**, 1810–1814 (2013).
84. Pascual-Castroviejo, I., Pascual-Pascual, S., Velazquez-Fragua, R. & Viaño, J. Sturge-Weber syndrome: study of 55 patients. *Can J Neurol Sci.* **35**, 301–7 (2008).
85. Sudarsanam, A. & Ardern-Holmes, S. L. Sturge-Weber syndrome: From the past to the present. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **18**, 1–10 (2013).
86. SJOGREN, T. Oligophrenia combined with congenital ichthyosiform erythrodermia, spastic syndrome and macularretinal degeneration; a clinical and genetic study. *Acta Genet. Stat. Med.* **6**, 80–91 (1956).
87. SJOGREN, T. & LARSSON, T. Oligophrenia in combination with congenital ichthyosis and spastic disorders; a clinical and genetic study. *Acta Psychiatr. Neurol. Scand. Suppl.* **113**, 1–112 (1957).
88. Jagell, S. & Lidén, S. Ichthyosis in the Sjögren-Larsson syndrome. *Clin. Genet.* **21**, 243–52 (1982).

89. Jagell, S. & Heijbel, J. Sjögren-Larsson syndrome: physical and neurological features. A survey of 35 patients. *Helv. Paediatr. Acta* **37**, 519–30 (1982).
90. Rizzo, W. in *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease* (eds. Scriver, C., Beckman, K., Small, G. & Valle, D.) 2239–2258 (McGraw-Hill, 2001).
91. Rizzo, W. B. Sjögren-Larsson syndrome: explaining the skin-brain connection. *Neurology* **52**, 1307–8 (1999).
92. Gånemo, A., Jagell, S. & Vahlquist, A. Sjögren-Larsson syndrome: A study of clinical symptoms and dermatological treatment in 34 Swedish patients. *Acta Derm. Venereol.* **89**, 68–73 (2009).
93. Aicardi, J. & Goutières, F. A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis. *Ann. Neurol.* **15**, 49–54 (1984).
94. Ramantani, G. *et al.* Expanding the phenotypic spectrum of lupus erythematosus in aicardi-goutières syndrome. *Arthritis Rheum.* **62**, 1469–1477 (2010).
95. Allen, A. S. *et al.* De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature* **501**, 217–21 (2013).
96. Ohba, C. *et al.* Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo SCN8A mutations. *Epilepsia* **55**, 994–1000 (2014).
97. Syrbe, S. *et al.* De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy. *Nat. Genet.* **47**, 393–9 (2015).
98. Ruggieri, M. & Praticò, A. D. Mosaic Neurocutaneous Disorders and Their Causes. *Semin. Pediatr. Neurol.* **22**, 207–233 (2015).
99. Temple, G. *et al.* The completion of the Mammalian Gene Collection. *Genome Res.* **19**, 2324–2333 (2009).
100. Botstein, D. & Risch, N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat. Genet.* **33 Suppl**, 228–37 (2003).
101. Spillane, J., Kullmann, D. M. & Hanna, M. G. Genetic neurological channelopathies: molecular genetics and clinical phenotypes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 37–48 (2015). doi:10.1136/jnnp-2015-311233
102. Ryan, D. P. & Ptáček, L. J. Episodic neurological channelopathies. *Neuron* **68**, 282–292 (2010).
103. Wallace, R. H. *et al.* Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel β 1 subunit gene SCN1B. **19**, 2–6 (1998).
104. Escayg, A. *et al.* Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat. Genet.* **24**, 343–5 (2000).
105. Charlier, C. *et al.* A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat. Genet.* **18**, 53–55 (1998).

106. Hirose, S. *et al.* A novel mutation of KCNQ3 (c.925T-->C) in a Japanese family with benign familial neonatal convulsions. *Ann. Neurol.* **47**, 822–6 (2000).
107. Singh, N. A. *et al.* KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain* **126**, 2726–37 (2003).
108. Biervert, C. *et al.* A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* **279**, 403–6 (1998).
109. Steinlein, O. K. *et al.* A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* **11**, 201–203 (1995).
110. Baulac, S. *et al.* First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat. Genet.* **28**, 46–8 (2001).
111. Kalachikov, S. *et al.* Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat. Genet.* **30**, 335–41 (2002).
112. Morante-Redolat, J. M. *et al.* Mutations in the LGI1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1119–28 (2002).
113. Boillot, M. & Baulac, S. Genetic models of focal epilepsies. *J. Neurosci. Methods* 1–12 (2015). doi:10.1016/j.jneumeth.2015.06.003
114. Dibbens, L. M. *et al.* Mutations in DEPDC5 cause familial focal epilepsy with variable foci. *Nat. Genet.* **45**, 546–551 (2013).
115. Ishida, S. *et al.* Mutations of DEPDC5 cause autosomal dominant focal epilepsies. *Nat. Genet.* **45**, 552–555 (2013).
116. Kaur, a. Novel DEPDC5 mutations causing familial focal epilepsy with variable foci identified. *Clin. Genet.* **84**, 341–342 (2013).
117. Picard, F. *et al.* DEPDC5 mutations in families presenting as autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Neurology* **82**, 2101–6 (2014).
118. Lal, D. *et al.* DEPDC5 mutations in genetic focal epilepsies of childhood. *Ann. Neurol.* **75**, 788–92 (2014).
119. Sim, J. C. *et al.* Familial cortical dysplasia caused by mutation in the mTOR regulator NPRL3. *Ann. Neurol.* 1–6 (2015). doi:10.1002/ana.24502
120. Ricos, M. G. *et al.* Mutations in the mammalian target of rapamycin pathway regulators NPRL2 and NPRL3 cause focal epilepsy. *Ann. Neurol.* **79**, 120–31 (2016).
121. European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* **75**, 1305–15 (1993).
122. Kandt, R. S. *et al.* Linkage of an important gene locus for tuberous sclerosis to a chromosome 16 marker for polycystic kidney disease. *Nat. Genet.* **2**, 37–41 (1992).
123. van Slegtenhorst, M. *et al.* Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on

- chromosome 9q34. *Science* **277**, 805–8 (1997).
124. Steinlein, O. K. *et al.* An insertion mutation of the CHRNA4 gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 943–7 (1997).
 125. Leniger, T. *et al.* A new Chrna4 mutation with low penetrance in nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsia* **44**, 981–5 (2003).
 126. Chen, Y. *et al.* A novel mutation of the nicotinic acetylcholine receptor gene CHRNA4 in sporadic nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* **83**, 152–6 (2009).
 127. Wang, M., Liu, X., Wang, J. & Wu, L. A novel mutation of the nicotinic acetylcholine receptor gene CHRNA4 in a Chinese patient with non-familial nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* **108**, 1927–31 (2014).
 128. Hirose, S. *et al.* A novel mutation of CHRNA4 responsible for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Neurology* **53**, 1749–53 (1999).
 129. De Fusco, M. *et al.* The nicotinic receptor beta 2 subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat. Genet.* **26**, 275–6 (2000).
 130. Phillips, H. a *et al.* CHRNB2 is the second acetylcholine receptor subunit associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 225–31 (2001).
 131. Bertrand, D. *et al.* The CHRNB2 mutation I312M is associated with epilepsy and distinct memory deficits. *Neurobiol. Dis.* **20**, 799–804 (2005).
 132. Hoda, J.-C. *et al.* Human nocturnal frontal lobe epilepsy: pharmacogenomic profiles of pathogenic nicotinic acetylcholine receptor beta-subunit mutations outside the ion channel pore. *Mol. Pharmacol.* **74**, 379–91 (2008).
 133. Liu, H. *et al.* The identification of a novel mutation of nicotinic acetylcholine receptor gene CHRNB2 in a Chinese patient: Its possible implication in non-familial nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* **95**, 94–9 (2011).
 134. Aridon, P. *et al.* Increased sensitivity of the neuronal nicotinic receptor alpha 2 subunit causes familial epilepsy with nocturnal wandering and ictal fear. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 342–50 (2006).
 135. Conti, V. *et al.* Nocturnal frontal lobe epilepsy with paroxysmal arousals due to CHRNA2 loss of function. *Neurology* **84**, 1520–8 (2015).
 136. Trivisano, M. *et al.* Mutation of CHRNA2 in a family with benign familial infantile seizures: Potential role of nicotinic acetylcholine receptor in various phenotypes of epilepsy. *Epilepsia* **56**, e53-7 (2015).
 137. Singh, N. a *et al.* A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat. Genet.* **18**, 25–29 (1998).
 138. Bassi, M. T. *et al.* Functional analysis of novel KCNQ2 and KCNQ3 gene variants found in a large pedigree with benign familial neonatal convulsions (BFNC). *Neurogenetics* **6**, 185–93 (2005).
 139. Coppola, G. *et al.* A novel KCNQ2 K⁺ channel mutation in benign neonatal convulsions

- and centrotemporal spikes. *Neurology* **61**, 131–4 (2003).
140. Dedek, K. *et al.* Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12272–7 (2001).
 141. Hunter, J. *et al.* Subthreshold changes of voltage-dependent activation of the KV7.2 channel in neonatal epilepsy. *Neurobiol. Dis.* **24**, 194–201 (2006).
 142. Richards, M. C. *et al.* Novel mutations in the KCNQ2 gene link epilepsy to a dysfunction of the KCNQ2-calmodulin interaction. *J. Med. Genet.* **41**, e35 (2004).
 143. Lee, I.-C., Chen, J.-Y., Chen, Y.-J., Yu, J.-S. & Su, P.-H. Benign familial neonatal convulsions: novel mutation in a newborn. *Pediatr. Neurol.* **40**, 387–91 (2009).
 144. Lerche, H. *et al.* A reduced K⁺ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. *Ann. Neurol.* **46**, 305–12 (1999).
 145. Miraglia del Giudice, E. *et al.* Benign familial neonatal convulsions (BFNC) resulting from mutation of the KCNQ2 voltage sensor. *Eur. J. Hum. Genet.* **8**, 994–7 (2000).
 146. Neubauer, B. KCNQ2 and KCNQ3 mutations contribute to different idiopathic epilepsy syndromes. *Neurology* **71**, 177–183 (2008).
 147. Li, H. *et al.* A novel mutation of KCNQ3 gene in a Chinese family with benign familial neonatal convulsions. *Epilepsy Res.* **79**, 1–5 (2008).
 148. Lemke, J. R. *et al.* Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders. *Epilepsia* **53**, 1387–98 (2012).
 149. Zara, F. *et al.* Genetic testing in benign familial epilepsies of the first year of life: clinical and diagnostic significance. *Epilepsia* **54**, 425–36 (2013).
 150. Soldovieri, M. V. *et al.* Novel KCNQ2 and KCNQ3 mutations in a large cohort of families with benign neonatal epilepsy: first evidence for an altered channel regulation by syntaxin-1A. *Hum. Mutat.* **35**, 356–67 (2014).
 151. Fusco, C., Frattini, D. & Bassi, M. T. A novel KCNQ3 gene mutation in a child with infantile convulsions and partial epilepsy with centrotemporal spikes. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **19**, 102–103 (2015).
 152. Miceli, F. *et al.* A novel KCNQ3 mutation in familial epilepsy with focal seizures and intellectual disability. *Epilepsia* **56**, e15-20 (2015).
 153. Heron, S. Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene KCNT1 cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat. Genet.* **44**, 1188–1190 (2012).
 154. Barcia, G. *et al.* De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nat. Genet.* **44**, 1255–1259 (2012).
 155. McTague, A. *et al.* Migrating partial seizures of infancy: expansion of the electroclinical, radiological and pathological disease spectrum. *Brain* **136**, 1578–91 (2013).
 156. Martin, H. C. *et al.* Clinical whole-genome sequencing in severe early-onset epilepsy reveals new genes and improves molecular diagnosis. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3200–11

- (2014).
157. Ohba, C. *et al.* De novo *KCNT1* mutations in early-onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia* n/a-n/a (2015). doi:10.1111/epi.13072
 158. Ishii, A. *et al.* A recurrent *KCNT1* mutation in two sporadic cases with malignant migrating partial seizures in infancy. *Gene* **531**, 467–71 (2013).
 159. Vanderver, A. *et al.* Identification of a novel de novo p.Phe932Ile *KCNT1* mutation in a patient with leukoencephalopathy and severe epilepsy. *Pediatr. Neurol.* **50**, 112–4 (2014).
 160. Singh, B. *et al.* A Kv4.2 truncation mutation in a patient with temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* **24**, 245–53 (2006).
 161. Lee, H., Lin, M. A., Kornblum, H. I., Papazian, D. M. & Nelson, S. F. Exome sequencing identifies de novo gain of function missense mutation in *KCND2* in identical twins with autism and seizures that slows potassium channel inactivation. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3481–9 (2014).
 162. Bockenbauer, D. *et al.* Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and *KCNJ10* mutations. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1960–70 (2009).
 163. Reichold, M. *et al.* *KCNJ10* gene mutations causing EAST syndrome (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy) disrupt channel function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14490–5 (2010).
 164. Freudenthal, B. *et al.* *KCNJ10* mutations disrupt function in patients with EAST syndrome. *Nephron. Physiol.* **119**, p40-8 (2011).
 165. Cossette, P. *et al.* Mutation of *GABRA1* in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat. Genet.* **31**, 184–189 (2002).
 166. Lachance-Touchette, P. *et al.* Novel $\alpha 1$ and $\gamma 2$ GABAA receptor subunit mutations in families with idiopathic generalized epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* **34**, 237–249 (2011).
 167. Klassen, T. *et al.* Exome sequencing of ion channel genes reveals complex profiles confounding personal risk assessment in epilepsy. *Cell* **145**, 1036–1048 (2011).
 168. Carvill, G. L. *et al.* *GABRA1* and *STXBP1*: Novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology* **82**, 1245–1253 (2014).
 169. Allen, A. S. *et al.* De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature* **501**, 217–21 (2013).
 170. Maljevic, S. *et al.* A mutation in the GABA(A) receptor alpha(1)-subunit is associated with absence epilepsy. *Ann. Neurol.* **59**, 983–7 (2006).
 171. Koder, H. *et al.* De novo *GABRA1* mutations in Ohtahara and West syndromes. *Epilepsia* (2016). doi:10.1111/epi.13344
 172. Wallace, R. H. *et al.* Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat. Genet.* **28**, 49–52 (2001).
 173. Harkin, L. A. *et al.* Truncation of the GABA(A)-receptor gamma2 subunit in a family

- with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 530–6 (2002).
174. Kananura, C. *et al.* A splice-site mutation in GABRG2 associated with childhood absence epilepsy and febrile convulsions. *Arch. Neurol.* **59**, 1137–41 (2002).
 175. Hirose, S. A new paradigm of channelopathy in epilepsy syndromes: intracellular trafficking abnormality of channel molecules. *Epilepsy Res.* **70 Suppl 1**, S206-17 (2006).
 176. Audenaert, D. *et al.* A novel GABRG2 mutation associated with febrile seizures. *Neurology* **67**, 687–90 (2006).
 177. Sun, H. *et al.* SCN1A, SCN1B, and GABRG2 gene mutation analysis in Chinese families with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *J. Hum. Genet.* **53**, 769–74 (2008).
 178. Tian, M. *et al.* Impaired surface $\alpha\beta\gamma$ GABA(A) receptor expression in familial epilepsy due to a GABRG2 frameshift mutation. *Neurobiol. Dis.* **50**, 135–41 (2013).
 179. Johnston, A. J. *et al.* A novel GABRG2 mutation, p.R136*, in a family with GEFS+ and extended phenotypes. *Neurobiol. Dis.* **64**, 131–41 (2014).
 180. Shi, X. *et al.* Mutational analysis of GABRG2 in a Japanese cohort with childhood epilepsies. *J. Hum. Genet.* **55**, 375–8 (2010).
 181. Tanaka, M. *et al.* Hyperglycosylation and reduced GABA currents of mutated GABRB3 polypeptide in remitting childhood absence epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 1249–61 (2008).
 182. Dibbens, L. M. *et al.* GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1315–9 (2004).
 183. Claes, L. R. *et al.* The SCN1A variant database: a novel research and diagnostic tool. *Hum. Mutat.* **30**, E904–E920 (2009).
 184. Audenaert, D. *et al.* A deletion in SCN1B is associated with febrile seizures and early-onset absence epilepsy. *Neurology* **61**, 854–6 (2003).
 185. Scheffer, I. E. *et al.* Temporal lobe epilepsy and GEFS+ phenotypes associated with SCN1B mutations. *Brain* **130**, 100–9 (2007).
 186. Orrico, A. *et al.* Mutational analysis of the SCN1A, SCN1B and GABRG2 genes in 150 Italian patients with idiopathic childhood epilepsies. *Clin. Genet.* **75**, 579–581 (2009).
 187. Patino, G. A. *et al.* A functional null mutation of SCN1B in a patient with Dravet syndrome. *J. Neurosci.* **29**, 10764–78 (2009).
 188. Ogiwara, I. *et al.* A homozygous mutation of voltage-gated sodium channel β (I) gene SCN1B in a patient with Dravet syndrome. *Epilepsia* **53**, e200-3 (2012).
 189. Fendri-Kriaa, N. *et al.* New mutation c.374C>T and a putative disease-associated haplotype within SCN1B gene in Tunisian families with febrile seizures. *Eur. J. Neurol.* **18**, 695–702 (2011).
 190. Sugawara, T. *et al.* A missense mutation of the Na⁺ channel alpha II subunit gene

- Na(v)1.2 in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6384–9 (2001).
191. Heron, S. E. *et al.* Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. *Lancet* **360**, 851–852 (2002).
 192. Kamiya, K. *et al.* A nonsense mutation of the sodium channel gene SCN2A in a patient with intractable epilepsy and mental decline. *J. Neurosci.* **24**, 2690–8 (2004).
 193. Striano, P. *et al.* A novel SCN2A mutation in family with benign familial infantile seizures. *Epilepsia* **47**, 218–20 (2006).
 194. Herlenius, E. *et al.* SCN2A mutations and benign familial neonatal-infantile seizures: the phenotypic spectrum. *Epilepsia* **48**, 1138–42 (2007).
 195. Shi, X. *et al.* Missense mutation of the sodium channel gene SCN2A causes Dravet syndrome. *Brain Dev.* **31**, 758–62 (2009).
 196. Ogiwara, I. *et al.* De novo mutations of voltage-gated sodium channel alphaII gene SCN2A in intractable epilepsies. *Neurology* **73**, 1046–53 (2009).
 197. Liao, Y. *et al.* SCN2A mutation associated with neonatal epilepsy, late-onset episodic ataxia, myoclonus, and pain. *Neurology* **75**, 1454–8 (2010).
 198. Zara, F. *et al.* Genetic testing in benign familial epilepsies of the first year of life: Clinical and diagnostic significance. *Epilepsia* **54**, 425–436 (2013).
 199. Kodera, H. *et al.* Targeted capture and sequencing for detection of mutations causing early onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia* **54**, 1262–1269 (2013).
 200. Lauxmann, S. *et al.* An SCN2A mutation in a family with infantile seizures from Madagascar reveals an increased subthreshold Na(+) current. *Epilepsia* **54**, e117-21 (2013).
 201. Nakamura, K. *et al.* Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology* **81**, 992–8 (2013).
 202. Baasch, A.-L. *et al.* Exome sequencing identifies a de novo SCN2A mutation in a patient with intractable seizures, severe intellectual disability, optic atrophy, muscular hypotonia, and brain abnormalities. *Epilepsia* **55**, e25-9 (2014).
 203. Vanoye, C. G., Gurnett, C. A., Holland, K. D., George, A. L. & Kearney, J. A. Novel SCN3A variants associated with focal epilepsy in children. *Neurobiol. Dis.* **62**, 313–22 (2014).
 204. Holland, K. D. *et al.* Mutation of sodium channel SCN3A in a patient with cryptogenic pediatric partial epilepsy. *Neurosci. Lett.* **433**, 65–70 (2008).
 205. Veeramah, K. R. *et al.* De novo pathogenic SCN8A mutation identified by whole-genome sequencing of a family quartet affected by infantile epileptic encephalopathy and SUDEP. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 502–10 (2012).
 206. Vaher, U. *et al.* De novo SCN8A mutation identified by whole-exome sequencing in a boy with neonatal epileptic encephalopathy, multiple congenital anomalies, and movement disorders. *J. Child Neurol.* **29**, NP202-6 (2014).

207. Rauch, A. *et al.* Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet (London, England)* **380**, 1674–82 (2012).
208. Larsen, J. *et al.* The phenotypic spectrum of SCN8A encephalopathy. *Neurology* **84**, 480–9 (2015).
209. Jouvenceau, A. *et al.* Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet (London, England)* **358**, 801–7 (2001).
210. Kors, E. E. *et al.* Childhood epilepsy, familial hemiplegic migraine, cerebellar ataxia, and a new CACNA1A mutation. *Neurology* **63**, 1136–7 (2004).
211. Imbrici, P. *et al.* Dysfunction of the brain calcium channel CaV2.1 in absence epilepsy and episodic ataxia. *Brain* **127**, 2682–92 (2004).
212. Chen, Y. *et al.* Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann. Neurol.* **54**, 239–43 (2003).
213. Heron, S. E. *et al.* Genetic variation of CACNA1H in idiopathic generalized epilepsy. *Ann. Neurol.* **55**, 595–6 (2004).
214. Heron, S. E. *et al.* Extended spectrum of idiopathic generalized epilepsies associated with CACNA1H functional variants. *Ann. Neurol.* **62**, 560–8 (2007).
215. Escayg, A. *et al.* Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 1531–9 (2000).
216. Edvardson, S. *et al.* Early infantile epileptic encephalopathy associated with a high voltage gated calcium channelopathy. *J. Med. Genet.* **50**, 118–23 (2013).
217. Pippucci, T. *et al.* A novel null homozygous mutation confirms CACNA2D2 as a gene mutated in epileptic encephalopathy. *PLoS One* **8**, e82154 (2013).
218. Baulac, S. *et al.* Familial focal epilepsy with focal cortical dysplasia due to DEPDC5 mutations. *Ann. Neurol.* **77**, 675–683 (2015).
219. Korenke, G. *et al.* Nocturnal frontal lobe epilepsy caused by a mutation in the GATOR1 complex gene NPRL3. 8–11 (2016). doi:10.1111/epi.13307
220. Suzuki, T. *et al.* Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat. Genet.* **36**, 842–849 (2004).
221. Stogmann, E. *et al.* Idiopathic generalized epilepsy phenotypes associated with different EFHC1 mutations. *Neurology* **67**, 2029–31 (2006).
222. Annesi, F. *et al.* Mutational analysis of EFHC1 gene in Italian families with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia* **48**, 1686–90 (2007).
223. Medina, M. T. *et al.* Novel mutations in Myoclonin1/EFHC1 in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology* **70**, 2137–44 (2008).
224. Jara-Prado, A. *et al.* Novel Myoclonin1/EFHC1 mutations in Mexican patients with juvenile myoclonic epilepsy. *Seizure* **21**, 550–4 (2012).

225. Vesa, J. *et al.* Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nature* **376**, 584–587 (1995).
226. Doggett, N. A. *et al.* Isolation of a novel gene underlying Batten disease, CLN3. The International Batten Disease Consortium. *Cell* **82**, 949–957 (1995).
227. Sleat, D. E. *et al.* Association of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Science* **277**, 1802–5 (1997).
228. Savukoski, M. *et al.* CLN5, a novel gene encoding a putative transmembrane protein mutated in Finnish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nat. Genet.* **19**, 286–8 (1998).
229. Wheeler, R. B. *et al.* The gene mutated in variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN6) and in *nclf* mutant mice encodes a novel predicted transmembrane protein. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 537–42 (2002).
230. Siintola, E. *et al.* The Novel Neuronal Ceroid Lipofuscinosis Gene MFSD8 Encodes a Putative Lysosomal Transporter. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 136–146 (2007).
231. Ranta, S. *et al.* The neuronal ceroid lipofuscinoses in human EPMR and *mnd* mutant mice are associated with mutations in CLN8. *Nat. Genet.* **23**, 233–6 (1999).
232. Siintola, E. *et al.* Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain* **129**, 1438–45 (2006).
233. Smith, K. R. *et al.* Strikingly different clinicopathological phenotypes determined by progranulin-mutation dosage. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 1102–1107 (2012).
234. Bras, J., Verloes, A., Schneider, S. A., Mole, S. E. & Guerreiro, R. J. Mutation of the parkinsonism gene ATP13A2 causes neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 2646–2650 (2012).
235. Smith, K. R. *et al.* Cathepsin F mutations cause Type B Kufs disease, an adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1417–23 (2013).
236. Staropoli, J. F. *et al.* A homozygous mutation in KCTD7 links neuronal ceroid lipofuscinosis to the ubiquitin-proteasome system. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 202–8 (2012).
237. Cadieux-Dion, M. *et al.* Recurrent mutations in DNAJC5 cause autosomal dominant Kufs disease. *Clin. Genet.* **83**, 571–575 (2013).
238. Lafrenière, R. G. *et al.* Unstable insertion in the 5' flanking region of the cystatin B gene is the most common mutation in progressive myoclonus epilepsy type 1, EPM1. *Nat. Genet.* **15**, 298–302 (1997).
239. Lalioti, M. D. *et al.* Dodecamer repeat expansion in cystatin B gene in progressive myoclonus epilepsy. *Nature* **386**, 847–51 (1997).
240. Virtaneva, K. *et al.* Progressive myoclonus epilepsy EPM1 locus maps to a 175-kb interval in distal 21q. *Am. J. Hum. Genet.* **58**, 1247–53 (1996).
241. Pennacchio, L. A. *et al.* Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science* **271**, 1731–4 (1996).

242. Bespalova, I. N., Pranzatelli, M. & Burmeister, M. G to C transversion at a splice acceptor site causes exon skipping in the cystatin B gene. *Mutat Res* **382**, 67–74 (1997).
243. Joensuu, T. *et al.* Cystatin B: mutation detection, alternative splicing and expression in progressive myoclonus epilepsy of Unverricht-Lundborg type (EPM1) patients. *Eur. J. Hum. Genet.* **15**, 185–93 (2007).
244. Kagitani-Shimono, K., Imai, K., Okamoto, N., Ono, J. & Okada, S. Unverricht-Lundborg disease with cystatin B gene abnormalities. *Pediatr. Neurol.* **26**, 55–60 (2002).
245. de Haan, G.-J. *et al.* Unverricht-Lundborg disease: underdiagnosed in the Netherlands. *Epilepsia* **45**, 1061–3 (2004).
246. Canafoglia, L. *et al.* Electroclinical presentation and genotype-phenotype relationships in patients with Unverricht-Lundborg disease carrying compound heterozygous CSTB point and indel mutations. *Epilepsia* **53**, 2120–7 (2012).
247. Pinto, E. *et al.* Unverricht-Lundborg disease: homozygosity for a new splicing mutation in the cystatin B gene. *Epilepsy Res.* **99**, 187–90 (2012).
248. Singh, S. & Ganesh, S. Lafora progressive myoclonus epilepsy: a meta-analysis of reported mutations in the first decade following the discovery of the EPM2A and NHLRC1 genes. *Hum. Mutat.* **30**, 715–23 (2009).
249. Kecmanović, M. *et al.* Clinical and genetic data on Lafora disease patients of Serbian/Montenegrin origin. *Clin. Genet.* (2015). doi:10.1111/cge.12570
250. Jara-Prado, A. *et al.* Late onset Lafora disease and novel EPM2A mutations: breaking paradigms. *Epilepsy Res.* **108**, 1501–10 (2014).
251. Poyrazolu, H. G. *et al.* Three Patients With Lafora Disease: Different Clinical Presentations and a Novel Mutation. *J. Child Neurol.* **30**, 777–781 (2015).
252. Salar, S. *et al.* Four novel and two recurrent NHLRC1 (EPM2B) and EPM2A gene mutations leading to Lafora disease in six Turkish families. *Epilepsy Res.* **98**, 273–6 (2012).
253. Ferlazzo, E. *et al.* Mild Lafora disease: Clinical, neurophysiologic, and genetic findings. *Epilepsia* 1–5 (2014). doi:10.1111/epi.12806
254. Brackmann, F. A., Kiefer, A., Agaimy, A., Gencik, M. & Trollmann, R. Rapidly Progressive Phenotype of Lafora Disease Associated With a Novel NHLRC1 Mutation. *Pediatr. Neurol.* **44**, 475–477 (2011).
255. Couarch, P. *et al.* Lafora progressive myoclonus epilepsy: NHLRC1 mutations affect glycogen metabolism. *J. Mol. Med. (Berl)*. **89**, 915–25 (2011).
256. Traoré, M. *et al.* Novel mutation in the NHLRC1 gene in a Malian family with a severe phenotype of Lafora disease. *Neurogenetics* **10**, 319–23 (2009).
257. Seyrantepe, V. *et al.* Molecular pathology of NEU1 gene in sialidosis. *Hum. Mutat.* **22**, 343–52 (2003).
258. Sekijima, Y. *et al.* Clinical and serial MRI findings of a sialidosis type I patient with a novel missense mutation in the NEU1 gene. *Intern. Med.* **52**, 119–24 (2013).

259. Lee, Y.-J., Son, S.-K., Park, J.-H., Song, J.-S. & Cheon, C.-K. NEU1 mutation in a Korean infant with type 2 sialidosis presenting as isolated fetal ascites. *Pediatr. Neonatol.* **56**, 68–9 (2015).
260. Noer, A. S. *et al.* A tRNA(Lys) mutation in the mtDNA is the causal genetic lesion underlying myoclonic epilepsy and ragged-red fiber (MERRF) syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **49**, 715–22 (1991).
261. Hahn, A. *et al.* MERRF-like phenotype associated with a rare mitochondrial trnaile mutation (m.4284 G>A). *Neuropediatrics* **42**, 148–51 (2011).
262. Ikeuchi, T. *et al.* Dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA): close correlation of CAG repeat expansions with the wide spectrum of clinical presentations and prominent anticipation. *Semin. Cell Biol.* **6**, 37–44 (1995).
263. Berkovic, S. F. *et al.* Array-Based Gene Discovery with Three Unrelated Subjects Shows SCARB2/LIMP-2 Deficiency Causes Myoclonus Epilepsy and Glomerulosclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 673–684 (2008).
264. He, M. *et al.* Using a combination of whole-exome sequencing and homozygosity mapping to identify a novel mutation of SCARB2. *Clin. Genet.* **86**, 598–600 (2014).
265. Zeigler, M. *et al.* A novel SCARB2 mutation in progressive myoclonus epilepsy indicated by reduced β -glucocerebrosidase activity. *J. Neurol. Sci.* **339**, 210–3 (2014).
266. Balreira, A. *et al.* A nonsense mutation in the LIMP-2 gene associated with progressive myoclonic epilepsy and nephrotic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2238–2243 (2008).
267. Dibbens, L. M. *et al.* Mutation of SCARB2 in a patient with progressive myoclonus epilepsy and demyelinating peripheral neuropathy. *Arch. Neurol.* **68**, 812–3 (2011).
268. Hopfner, F. *et al.* Novel SCARB2 mutation in action myoclonus-renal failure syndrome and evaluation of SCARB2 mutations in isolated AMRF features. *BMC Neurol.* **11**, 134 (2011).
269. Perandones, C. *et al.* A case of severe hearing loss in action myoclonus renal failure syndrome resulting from mutation in SCARB2. *Mov. Disord.* **27**, 1200–1 (2012).
270. Higashiyama, Y. *et al.* A novel SCARB2 mutation causing late-onset progressive myoclonus epilepsy. *Mov. Disord.* **28**, 552–3 (2013).
271. Bassuk, A. G. *et al.* A Homozygous Mutation in Human PRICKLE1 Causes an Autosomal-Recessive Progressive Myoclonus Epilepsy-Ataxia Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 572–581 (2008).
272. Corbett, M. A. *et al.* A Mutation in the Golgi Qb-SNARE Gene GOSR2 Causes Progressive Myoclonus Epilepsy with Early Ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 657–663 (2011).
273. Muona, M. *et al.* A recurrent de novo mutation in KCNC1 causes progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Genet.* **47**, 39–46 (2014).
274. Sun, Y. *et al.* Autosomal recessive spinocerebellar ataxia 7 (SCAR7) is caused by variants in TPP1, the gene involved in classic late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis

- 2 disease (CLN2 disease). *Hum. Mutat.* **34**, 706–13 (2013).
275. Wang, F. *et al.* Next generation sequencing-based molecular diagnosis of retinitis pigmentosa: identification of a novel genotype-phenotype correlation and clinical refinements. *Hum. Genet.* **133**, 331–45 (2014).
276. Cortese, A. *et al.* Novel CLN3 mutation causing autophagic vacuolar myopathy. *Neurology* **82**, 2072–6 (2014).
277. Van Bogaert, P. *et al.* Mutation of a potassium channel-related gene in progressive myoclonic epilepsy. *Ann. Neurol.* **61**, 579–86 (2007).
278. Kousi, M. *et al.* Novel mutations consolidate KCTD7 as a progressive myoclonus epilepsy gene. *J. Med. Genet.* **49**, 391–399 (2012).
279. Blumkin, L. *et al.* A compound heterozygous missense mutation and a large deletion in the KCTD7 gene presenting as an opsoclonus-myoclonus ataxia-like syndrome. *J. Neurol.* **259**, 2590–2598 (2012).
280. Sleat, D. E. *et al.* Mass spectrometry-based protein profiling to determine the cause of lysosomal storage diseases of unknown etiology. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 1708–1718 (2009).
281. Rizzo, W. B. & Carney, G. Sjögren-Larsson syndrome: diversity of mutations and polymorphisms in the fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH3A2). *Hum. Mutat.* **26**, 1–10 (2005).
282. De Laurenzi, V. *et al.* Sjögren-Larsson syndrome is caused by a common mutation in northern European and Swedish patients. *J. Invest. Dermatol.* **109**, 79–83 (1997).
283. Sillén, A., Jagell, S. & Wadelius, C. A missense mutation in the FALDH gene identified in Sjögren-Larsson syndrome patients originating from the northern part of Sweden. *Hum. Genet.* **100**, 201–3 (1997).
284. Rizzo, W. B., Carney, G. & De Laurenzi, V. A common deletion mutation in European patients with Sjögren-Larsson syndrome. *Biochem. Mol. Med.* **62**, 178–81 (1997).
285. Sillén, A. *et al.* Spectrum of mutations and sequence variants in the FALDH gene in patients with Sjögren-Larsson syndrome. *Hum. Mutat.* **12**, 377–84 (1998).
286. Kraus, C., Braun-Quentin, C., Ballhausen, W. G. & Pfeiffer, R. A. RNA-based mutation screening in German families with Sjögren-Larsson syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **8**, 299–306 (2000).
287. Auada, M. P. *et al.* Sjögren-Larsson syndrome in Brazil is caused by a common c.1108-1G-->C splice-site mutation in the ALDH3A2 gene. *Br. J. Dermatol.* **154**, 770–3 (2006).
288. Rizzo, W. B., Carney, G. & Lin, Z. The molecular basis of Sjögren-Larsson syndrome: mutation analysis of the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 1547–60 (1999).
289. Aldahmesh, M. a *et al.* Recessive mutations in ELOVL4 cause ichthyosis, intellectual disability, and spastic quadriplegia. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 745–50 (2011).
290. Crow, Y. J. *et al.* Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1

- cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nat. Genet.* **38**, 917–920 (2006).
291. Crow, Y. J. *et al.* Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat. Genet.* **38**, 910–6 (2006).
 292. Rice, G. I. *et al.* Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response. *Nat. Genet.* **41**, 829–32 (2009).
 293. Rice, G. I. *et al.* Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature. *Nat. Genet.* **44**, 1243–8 (2012).
 294. Rice, G. I. *et al.* Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nat. Genet.* **46**, 503–9 (2014).
 295. Rice, G. I., Rodero, M. P. & Crow, Y. J. Human disease phenotypes associated with mutations in TREX1. *J. Clin. Immunol.* **35**, 235–43 (2015).
 296. Lee-Kirsch, M. A. *et al.* Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* **39**, 1065–1067 (2007).
 297. Rice, G. *et al.* Heterozygous mutations in TREX1 cause familial chilblain lupus and dominant Aicardi-Goutieres syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 811–815 (2007).
 298. Richards, A. *et al.* C-terminal truncations in human 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause autosomal dominant retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy. *Nat. Genet.* **39**, 1068–70 (2007).
 299. Abe, J. *et al.* Heterozygous TREX1 p.Asp18Asn mutation can cause variable neurological symptoms in a family with Aicardi-Goutières syndrome/familial Chilblain lupus. *Rheumatol. (United Kingdom)* **52**, 406–408 (2013).
 300. Shirley, M. D. *et al.* Sturge-Weber Syndrome and Port-Wine Stains Caused by Somatic Mutation in GNAQ. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1971–1979 (2013).
 301. Zuberi, S. M. *et al.* Genotype-phenotype associations in SCN1A-related epilepsies. *Neurology* **76**, 594–600 (2011).
 302. Olson, H. *et al.* Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy. *Ann. Neurol.* **75**, 943–958 (2014).
 303. De Kovel, C. G. F. *et al.* Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies. *Brain* **133**, 23–32 (2010).
 304. Dibbens, L. M. *et al.* Familial and sporadic 15q13.3 microdeletions in idiopathic generalized epilepsy: Precedent for disorders with complex inheritance. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 3626–3631 (2009).
 305. Ottman, R., Hauser, W. A., Barker-Cummings, C., Lee, J. H. & Risch, N. Segregation analysis of cryptogenic epilepsy and an empirical test of the validity of the results. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 667–75 (1997).
 306. Ottman, R. Analysis of genetically complex epilepsies. *Epilepsia* **46**, 7–14 (2005).

307. Manolio, T. A. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *N. Engl. J. Med.* **363**, 166–176 (2010).
308. Kasperaviciute, D. *et al.* Epilepsy, hippocampal sclerosis and febrile seizures linked by common genetic variation around SCN1A. *Brain* **136**, 3140–50 (2013).
309. Steffens, M. *et al.* Genome-wide association analysis of genetic generalized epilepsies implicates susceptibility loci at 1q43, 2p16.1, 2q22.3 and 17q21.32. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 5359–5372 (2012).
310. Margulies, M. *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376–80 (2005).
311. Check Hayden, E. Is the \$1,000 genome for real? *Nature* (2014). doi:10.1038/nature.2014.14530
312. Bao, R. *et al.* Review of Current Methods, Applications, and Data Management for the Bioinformatics Analysis of Whole Exome Sequencing. *Lib. Acad.* **13**, 67–82 (2014).
313. Toydemir, R. M. *et al.* Mutations in embryonic myosin heavy chain (MYH3) cause Freeman-Sheldon syndrome and Sheldon-Hall syndrome. *Nat. Genet.* **38**, 561–5 (2006).
314. Ng, S. B. *et al.* Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* **461**, 272–6 (2009).
315. Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G. & Veltman, J. A. Unlocking Mendelian disease using exome sequencing. *Genome Biol.* **12**, 228 (2011).
316. Chambers, C., Jansen, L. A. & Dhamija, R. Review of Commercially Available Epilepsy Genetic Panels. *J. Genet. Couns.* (2015). doi:10.1007/s10897-015-9906-9
317. Mole, S. E. & Williams, R. E. in *GeneReviews [Internet]* (eds. Pagon, R. *et al.*) (2013).
318. Arsov, T. *et al.* Kufs disease, the major adult form of neuronal ceroid lipofuscinosis, caused by mutations in CLN6. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 566–73 (2011).
319. Boehme, D. H., Cottrell, J. C., Leonberg, S. C. & Zeman, W. A dominant form of neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain* **94**, 745–60 (1971).
320. Burneo, J. G. *et al.* Adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis (Kufs disease) with autosomal dominant inheritance in Alabama. *Epilepsia* **44**, 841–6 (2003).
321. Nosková, L. *et al.* Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 241–52 (2011).
322. Velinov, M. *et al.* Mutations in the gene DNAJC5 cause autosomal dominant Kufs disease in a proportion of cases: study of the Parry family and 8 other families. *PLoS One* **7**, e29729 (2012).
323. Mastrogiacomo, A. *et al.* Cysteine string proteins: a potential link between synaptic vesicles and presynaptic Ca²⁺ channels. *Science* **263**, 981–2 (1994).
324. Blondeau, F. *et al.* Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**,

- 3833–8 (2004).
325. Greaves, J. & Chamberlain, L. H. Dual role of the cysteine-string domain in membrane binding and palmitoylation-dependent sorting of the molecular chaperone cysteine-string protein. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4748–59 (2006).
 326. Chandra, S., Gallardo, G., Fernández-Chacón, R., Schlüter, O. M. & Südhof, T. C. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* **123**, 383–96 (2005).
 327. Sharma, M., Burré, J. & Südhof, T. C. CSP α promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nat. Cell Biol.* **13**, 30–9 (2011).
 328. Fernández-Chacón, R. *et al.* The synaptic vesicle protein CSP α prevents presynaptic degeneration. *Neuron* **42**, 237–251 (2004).
 329. Schmitz, F. *et al.* CSPalpha-deficiency causes massive and rapid photoreceptor degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2926–31 (2006).
 330. García-Junco-Clemente, P. *et al.* Cysteine string protein-alpha prevents activity-dependent degeneration in GABAergic synapses. *J. Neurosci.* **30**, 7377–91 (2010).
 331. Edvardson, S. *et al.* A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PLoS One* **7**, e36458 (2012).
 332. Selkoe, D. J. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1054–61 (2004).
 333. Johnson, J. N., Ahrendt, E. & Braun, J. E. A. CSPalpha: the neuroprotective J protein. *Biochem. Cell Biol.* **88**, 157–65 (2010).
 334. Cagnoli, C. *et al.* SCA28, a novel form of autosomal dominant cerebellar ataxia on chromosome 18p11.22-q11.2. *Brain* **129**, 235–42 (2006).
 335. Lee, Y.-C. *et al.* Mutations in KCND3 cause spinocerebellar ataxia type 22. *Ann. Neurol.* **72**, 859–69 (2012).
 336. Giroux, J. M. & Barbeau, A. Erythrokeratoderma with ataxia. *Arch. Dermatol.* **106**, 183–8 (1972).
 337. Scott, C. A., Tattersall, D., O'Toole, E. A. & Kelsell, D. P. Connexins in epidermal homeostasis and skin disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 1952–61 (2012).
 338. López-Bigas, N. *et al.* Connexin 31 (GJB3) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 947–52 (2001).
 339. Montpetit, A. *et al.* Disruption of AP1S1, causing a novel neurocutaneous syndrome, perturbs development of the skin and spinal cord. *PLoS Genet.* **4**, e1000296 (2008).
 340. Caramins, M. *et al.* Exome sequencing identification of a GJB1 missense mutation in a kindred with X-linked spinocerebellar ataxia (SCA-X1). *Hum. Mol. Genet.* **22**, 4329–38 (2013).

341. Richard, G. *et al.* Linkage studies in erythrokeratodermias: fine mapping, genetic heterogeneity and analysis of candidate genes. *J. Invest. Dermatol.* **109**, 666–71 (1997).
342. Seidel, K. *et al.* Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathol.* **124**, 1–21 (2012).
343. Kinirons, P. *et al.* A novel locus for idiopathic generalized epilepsy in French-Canadian families maps to 10p11. *Am. J. Med. Genet. A* **146A**, 578–84 (2008).
344. Saillour, Y. *et al.* Detection of exonic copy-number changes using a highly efficient oligonucleotide-based comparative genomic hybridization-array method. *Hum. Mutat.* **29**, 1083–90 (2008).
345. van de Leemput, J. *et al.* Deletion at ITPR1 underlies ataxia in mice and spinocerebellar ataxia 15 in humans. *PLoS Genet.* **3**, e108 (2007).
346. Sharp, A. J. *et al.* A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat. Genet.* **40**, 322–8 (2008).
347. McKenna, A. *et al.* The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–303 (2010).
348. Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **38**, e164 (2010).
349. McMahan, A., Butovich, I. A. & Kedzierski, W. Epidermal expression of an Elovl4 transgene rescues neonatal lethality of homozygous Stargardt disease-3 mice. *J. Lipid Res.* **52**, 1128–38 (2011).
350. Molday, R. S. & Zhang, K. Defective lipid transport and biosynthesis in recessive and dominant Stargardt macular degeneration. *Prog. Lipid Res.* **49**, 476–92 (2010).
351. Grayson, C. & Molday, R. S. Dominant negative mechanism underlies autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy linked to mutations in ELOVL4. *J. Biol. Chem.* **280**, 32521–30 (2005).
352. Agbaga, M.-P. *et al.* Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 12843–8 (2008).
353. Verheijden, S. *et al.* Peroxisomal multifunctional protein-2 deficiency causes neuroinflammation and degeneration of Purkinje cells independent of very long chain fatty acid accumulation. *Neurobiol. Dis.* **58**, 258–69 (2013).
354. Rissmann, R. *et al.* New insights into ultrastructure, lipid composition and organization of vernix caseosa. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1823–33 (2006).
355. Li, W. *et al.* Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *Int. J. Biol. Sci.* **3**, 120–8 (2007).
356. Mageri, A. *et al.* A novel mutation in the ELOVL4 gene causes autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 4263–7 (2004).
357. Bernstein, P. S. *et al.* Diverse macular dystrophy phenotype caused by a novel complex

- mutation in the ELOVL4 gene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 3331–6 (2001).
358. Zhang, K. *et al.* A 5-bp deletion in ELOVL4 is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy. *Nat. Genet.* **27**, 89–93 (2001).
359. Harkewicz, R. *et al.* Essential role of ELOVL4 protein in very long chain fatty acid synthesis and retinal function. *J. Biol. Chem.* **287**, 11469–80 (2012).
360. Choi, Y., Sims, G. E., Murphy, S., Miller, J. R. & Chan, A. P. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One* **7**, e46688 (2012).
361. Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **7**, 248–9 (2010).
362. Barabas, P. *et al.* Role of ELOVL4 and very long-chain polyunsaturated fatty acids in mouse models of Stargardt type 3 retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 5181–6 (2013).
363. Lolin, Y., Razis, P. a, O’Gorman, P., Hjelm, M. & Wierzbicki, a S. Transient nephrotic syndrome after anaesthesia resulting from a familial cryofibrinogen precipitating at 35 degrees C. *J. Med. Genet.* **26**, 631–636 (1989).
364. van Geest, A. J., van Dooren-Greebe, R. J., Andriessen, M. P., Blomjous, C. E. & Go, I. H. Familial primary cryofibrinogenemia. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **12**, 47–50 (1999).
365. Wulffraat, N., Meyer, K. J., Zegers, B. J. & Kuis, W. Familial presence of primary cryofibrinogenemia, a report of three cases. *Br. J. Rheumatol.* **35**, 102–4 (1996).
366. Rabbani, B., Tekin, M. & Mahdieh, N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J. Hum. Genet.* **59**, 5–15 (2014).
367. Cadieux-Dion, M. *et al.* Expanding the clinical phenotype associated with ELOVL4 mutation: study of a large French-Canadian family with autosomal dominant spinocerebellar ataxia and erythrokeratoderma. *JAMA Neurol.* **71**, 470–5 (2014).
368. Casanova, J.-L., Conley, M. E., Seligman, S. J., Abel, L. & Notarangelo, L. D. Guidelines for genetic studies in single patients: lessons from primary immunodeficiencies. *J. Exp. Med.* **211**, 2137–49 (2014).
369. Millard, L. G. & Rowell, N. R. Chilblain lupus erythematosus (Hutchinson). A clinical and laboratory study of 17 patients. *Br. J. Dermatol.* **98**, 497–506 (1978).
370. Lee-Kirsch, M. A. *et al.* Familial chilblain lupus, a monogenic form of cutaneous lupus erythematosus, maps to chromosome 3p. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 731–737 (2006).
371. Su, W. P. D., Perniciaro, C., Rogers, R. S. & White, J. W. Chilblain lupus erythematosus (lupus pernio): Clinical review of the Mayo Clinic experience and proposal of diagnostic criteria. *Cutis* **54**, 395–399 (1994).
372. Hedrich, C. M. *et al.* Chilblain lupus erythematosus - A review of literature. *Clin. Rheumatol.* **27**, 949–954 (2008).
373. Begin, P. & Leclerc, G. Images in clinical medicine. Familial primary cryofibrinogenemia. *N. Engl. J. Med.* **369**, e10 (2013).

374. Toribara, N. W. *et al.* Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning. *J. Biol. Chem.* **268**, 5879–85 (1993).
375. Combaret, L. *et al.* USP19 is a ubiquitin-specific protease regulated in rat skeletal muscle during catabolic states. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288**, E693-700 (2005).
376. Fine, J.-D. *et al.* Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J. Am. Acad. Dermatol.* **70**, 1103–26 (2014).
377. Günther, C., Hillebrand, M., Brunk, J. & Lee-Kirsch, M. A. Systemic involvement in TREX1-associated familial chilblain lupus. *J. Am. Acad. Dermatol.* **69**, 179–181 (2013).
378. Dang, N. & Murrell, D. F. Mutation analysis and characterization of COL7A1 mutations in dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp. Dermatol.* **17**, 533–568 (2008).
379. Shinkuma, S. Dystrophic epidermolysis bullosa: a review. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **8**, 275–84 (2015).
380. Abe, J. *et al.* Heterozygous TREX1 p.Asp18Asn mutation can cause variable neurological symptoms in a family with Aicardi-Goutieres syndrome/familial chilblain lupus. *Rheumatology (Oxford)*. **52**, 406–8 (2013).
381. KORST, D. R. & KRATOCHVIL, C. H. Cryofibrinogen in a case of lung neoplasm associated with thrombophlebitis migrans. *Blood* **10**, 945–53 (1955).
382. Stathakis, N. E., Karamanolis, D., Koukoulis, G. & Tsianos, E. Characterization of cryofibrinogen isolated from patients plasma. *Haemostasis* **10**, 195–202 (1981).
383. Michaud, M. & Pourrat, J. Cryofibrinogenemia. *J. Clin. Rheumatol.* **19**, 142–8 (2013).
384. Saadoun, D. *et al.* Cryofibrinogenemia: New Insights into Clinical and Pathogenic Features. *Am. J. Med.* **122**, 1128–1135 (2009).
385. Amdo, T. D. & Welker, J. a. An approach to the diagnosis and treatment of cryofibrinogenemia. *Am. J. Med.* **116**, 332–337 (2004).
386. Soyfoo, M. S. *et al.* Clinical significance of Cryofibrinogenemia: possible pathophysiological link with Raynaud’s phenomenon. *J. Rheumatol.* **39**, 119–24 (2012).
387. Lee-Kirsch, M. A. *et al.* A mutation in TREX1 that impairs susceptibility to granzyme A-mediated cell death underlies familial chilblain lupus. *J. Mol. Med.* **85**, 531–537 (2007).
388. Bansal, S. & Goel, A. Chilblain lupus erythematosus in an adolescent girl. *Indian Dermatol. Online J.* **5**, S30-2 (2014).
389. Nicita, F. *et al.* The genetics of monogenic idiopathic epilepsies and epileptic encephalopathies. *Seizure* **21**, 3–11 (2012).
390. Heinzen, E. L. *et al.* Exome sequencing followed by large-scale genotyping fails to identify single rare variants of large effect in idiopathic generalized epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 293–302 (2012).
391. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–60 (2009).

392. Cingolani, P. *et al.* A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w 1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. **6**, 80–92 (2012).
393. Consortium, E. A. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *bioRxiv* (Cold Spring Harbor Labs Journals, 2015). doi:10.1101/030338
394. Petrovski, S., Gussow, A. B., Wang, Q. & Halvorsen, M. The Intolerance of Regulatory Sequence to Genetic Variation Predicts Gene Dosage Sensitivity. 1–25 (2015). doi:10.1371/journal.pgen.1005492
395. Ran, X. *et al.* EpilepsyGene: a genetic resource for genes and mutations related to epilepsy. *Nucleic Acids Res.* 1–7 (2014). doi:10.1093/nar/gku943
396. Bear, K. a *et al.* Pathogenic mutations in *GLI2* cause a specific phenotype that is distinct from holoprosencephaly. *J. Med. Genet.* 1–6 (2014). doi:10.1136/jmedgenet-2013-102249
397. Fischer, A., Zalvide, J., Faurobert, E., Albiges-Rizo, C. & Tournier-Lasserre, E. Cerebral cavernous malformations: From CCM genes to endothelial cell homeostasis. *Trends Mol. Med.* **19**, 302–308 (2013).
398. Hodge, J. C. *et al.* Disruption of *MBD5* contributes to a spectrum of psychopathology and neurodevelopmental abnormalities. *Mol. Psychiatry* **19**, 368–79 (2014).
399. Amir, R. E. *et al.* Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* **23**, 185–188 (1999).
400. Wang, X.-J. *et al.* Understanding cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptors. *J. Neurochem.* **131**, 699–711 (2014).
401. Boutin, C., Goffinet, A. M. & Tissir, F. *Celsr1-3* cadherins in PCP and brain development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **101**, 161–83 (2012).
402. Fenstermaker, A. G. *et al.* Wnt / Planar Cell Polarity Signaling Controls the Anterior – Posterior Organization of Monoaminergic Axons in the Brainstem. **30**, 16053–16064 (2010).
403. Zivony-Elboum, Y. *et al.* A founder mutation in *Vps37A* causes autosomal recessive complex hereditary spastic paraparesis. *J. Med. Genet.* **49**, 462–472 (2012).
404. Shima, Y., Kengaku, M., Hirano, T., Takeichi, M. & Uemura, T. Regulation of dendritic maintenance and growth by a mammalian 7-pass transmembrane cadherin. *Dev. Cell* **7**, 205–216 (2004).
405. Hussain, N. K., Hsin, H., Haganir, R. L. & Sheng, M. MINK and TNIK differentially act on Rap2-mediated signal transduction to regulate neuronal structure and AMPA receptor function. *J. Neurosci.* **30**, 14786–94 (2010).
406. Wang, Q. *et al.* The psychiatric disease risk factors *DISC1* and *TNIK* interact to regulate synapse composition and function. *Mol. Psychiatry* **16**, 1006–23 (2011).
407. Khosravani, H. *et al.* Gating Effects of Mutations in the *Cav3.2* T-type Calcium Channel Associated with Childhood Absence Epilepsy. *J. Biol. Chem.* **279**, 9681–9684 (2004).

408. Young, T. R. & Leamey, C. A. Teneurins: important regulators of neural circuitry. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 990–3 (2009).
409. Helbling-Leclerc, A. *et al.* Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **11**, 216–8 (1995).
410. Jones, K. J. *et al.* The expanding phenotype of laminin alpha2 chain (merosin) abnormalities: case series and review. *J. Med. Genet.* **38**, 649–57 (2001).
411. Becker, K. *et al.* De novo microdeletions of chromosome 6q14.1-q14.3 and 6q12.1-q14.1 in two patients with intellectual disability - further delineation of the 6q14 microdeletion syndrome and review of the literature. *Eur. J. Med. Genet.* **55**, 490–497 (2012).
412. Reid, C. a., Berkovic, S. F. & Petrou, S. Mechanisms of human inherited epilepsies. *Prog. Neurobiol.* **87**, 41–57 (2009).
413. Leung, C. L., Zheng, M., Prater, S. M. & Liem, R. K. The BPAG1 locus: Alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains, including predominant isoforms in neurons and muscles. *J. Cell Biol.* **154**, 691–7 (2001).
414. Turcotte-Gauthier, M. Étude clinique et génétique d'une nouvelle forme d'ataxie spinocérébelleuse pure associée à l'Érythrokratodermie. (Université de Montréal, 2010).
415. Rogozin, I. B. & Pavlov, Y. I. Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **544**, 65–85 (2003).
416. Bourassa, C. V *et al.* A New ELOVL4 Mutation in a Case of Spinocerebellar Ataxia With Erythrokratodermia. *JAMA Neurol.* **72**, 942–3 (2015).
417. Henderson, M. X. *et al.* Neuronal ceroid lipofuscinosis with DNAJC5/CSP?? mutation has PPT1 pathology and exhibit aberrant protein palmitoylation. *Acta Neuropathol.* 1–17 (2015). doi:10.1007/s00401-015-1512-2
418. Zinsmaier, K. E. Cysteine-String Protein's Neuroprotective Role. *J. Neurogenet.* **24**, 120–132 (2010).
419. Chamberlain, L. H. & Burgoyne, R. D. Cysteine-string protein: The chaperone at the synapse. *J. Neurochem.* **74**, 1781–1789 (2000).
420. Donnelier, J. & Braun, J. E. A. CSP α -chaperoning presynaptic proteins. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 1–6 (2014).
421. Miller, L. C. *et al.* Cysteine String Protein (CSP) Inhibition of N-type Calcium Channels Is Blocked by Mutant Huntingtin. *J. Biol. Chem.* **278**, 53072–53081 (2003).
422. Kohan, R. *et al.* Therapeutic approaches to the challenge of neuronal ceroid lipofuscinoses. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12**, 867–83 (2011).
423. Faller, K. M. E. *et al.* The neuronal ceroid lipofuscinoses: Opportunities from model systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1852**, 2267–2278 (2015).
424. Dimitriadi, M. & Hart, A. C. Neurodegenerative disorders: insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol. Dis.* **40**, 4–11 (2010).
425. Johnson, J. R., Jenn, R. C., Barclay, J. W., Burgoyne, R. D. & Morgan, A. *Caenorhabditis*

- elegans: a useful tool to decipher neurodegenerative pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 559–563 (2010).
426. Phillips, S. N. *et al.* Characterizing pathogenic processes in Batten disease: Use of small eukaryotic model systems. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1762**, 906–919 (2006).
 427. Kashyap, S. S. *et al.* Caenorhabditis elegans dnj-14, the orthologue of the DNAJC5 gene mutated in adult onset neuronal ceroid lipofuscinosis, provides a new platform for neuroprotective drug screening and identifies a SIR-2.1-independent action of resveratrol. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 5916–5927 (2014).
 428. Zinsmaier, K. E., Eberle, K. K., Buchner, E., Walter, N. & Benzer, S. Paralysis and early death in cysteine string protein mutants of Drosophila. *Science* **263**, 977–80 (1994).
 429. Di Gregorio, E. *et al.* ELOVL5 mutations cause spinocerebellar ataxia 38. *Am. J. Hum. Genet.* **95**, 209–217 (2014).
 430. Edwards, A. O., Donoso, L. A. & Ritter, R. A novel gene for autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy with homology to the SUR4 protein family. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 2652–63 (2001).
 431. Karan, G. *et al.* Lipofuscin accumulation, abnormal electrophysiology, and photoreceptor degeneration in mutant ELOVL4 transgenic mice: a model for macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4164–9 (2005).
 432. Mir, H. *et al.* A novel recessive mutation in the gene ELOVL4 causes a neuro-ichthyotic disorder with variable expressivity. *BMC Med. Genet.* **15**, 25 (2014).
 433. Ozaki, K. *et al.* A Novel Mutation in ELOVL4 Leading to Spinocerebellar Ataxia (SCA) With the Hot Cross Bun Sign but Lacking Erythrokeratodermia: A Broadened Spectrum of SCA34. *JAMA Neurol.* **72**, 797–805 (2015).
 434. Bertier, G., Joly, Y. & Héту, M. Unsolved challenges of clinical whole-exome sequencing: A systematic literature review of end-users' views. Accepted 07/28/2016. *BMC Med. Genomics* 1–12 (2016). doi:10.1186/s12920-016-0213-6
 435. Green, R. C. *et al.* ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet. Med.* **15**, 565–574 (2013).
 436. Jacob, H. J. *et al.* Genomics in clinical practice: lessons from the front lines. *Sci. Transl. Med.* **5**, 194cm5 (2013).
 437. Thevenon J *et al.* Diagnostic odyssey in severe neurodevelopmental disorders: Towards clinical whole-exome sequencing as a first-line diagnostic test. *Clin. Genet.* 700–707 (2016). doi:10.1111/cge.12732
 438. Vrijenhoek, T. *et al.* Next-generation sequencing-based genome diagnostics across clinical genetics centers: implementation choices and their effects. *Eur. J. Hum. Genet.* **23**, 1142–50 (2015).
 439. Need, A. C. *et al.* Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *J. Med. Genet.* **49**, 353–61 (2012).

440. Lines, M. A. *et al.* Haploinsufficiency of a spliceosomal GTPase encoded by EFTUD2 causes mandibulofacial dysostosis with microcephaly. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 369–77 (2012).
441. Milligan, C. J. *et al.* KCNT1 gain of function in 2 epilepsy phenotypes is reversed by quinidine. *Ann. Neurol.* **75**, 581–590 (2014).
442. Ottman, R. & Risch, N. *Genetic Epidemiology and Gene Discovery in Epilepsy. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (2012).
443. Glasscock, E., Qian, J., Yoo, J. W. & Noebels, J. L. Masking epilepsy by combining two epilepsy genes. *Nat. Neurosci.* **10**, 1554–1558 (2007).
444. Jostins, L. *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* **491**, 119–24 (2012).
445. Singh, T. *et al.* Characterization of expression quantitative trait loci in the human colon. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 251–6 (2015).
446. Ward, L. D. & Kellis, M. Interpreting noncoding genetic variation in complex traits and human disease. *Nat. Biotechnol.* **30**, 1095–106 (2012).
447. Jakovcevski, M. & Akbarian, S. Epigenetic mechanisms in neurological disease. *Nat. Med.* **18**, 1194–204 (2012).
448. Henshall, D. C. & Kobow, K. Epigenetics and Epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, 2–10 (2015).
449. O'Rawe, J. *et al.* Low concordance of multiple variant-calling pipelines: practical implications for exome and genome sequencing. *Genome Med.* **5**, 28 (2013).
450. Narzisi, G. & Schatz, M. C. The challenge of small-scale repeats for indel discovery. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, 8 (2015).
451. Wall, J. D. *et al.* Estimating genotype error rates from high-coverage next-generation sequence data. *Genome Res.* **24**, 1734–1739 (2014).
452. Meynert, A. M., Ansari, M., FitzPatrick, D. R. & Taylor, M. S. Variant detection sensitivity and biases in whole genome and exome sequencing. *BMC Bioinformatics* **15**, 247 (2014).
453. Alkan, C., Coe, B. P. & Eichler, E. E. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 363–376 (2011).

Annexe 1 : Curriculum vitae

EDUCATION

- Ph.D, Sciences neurologiques, Université de Montréal (2009-2016)
 - Superviseur: Patrick Cossette
- B.Sc, Sciences biologiques, Université de Montreal (2006-2009)

COMPÉTENCES

- **Bioinformatiques:** Analyse de données de séquençage exomique/génomique, Analyse de données GWAS
- **Interprétation des données de séquençage:** Bases de données de population (ExAC, ESP6500), Bases de données de maladie (HGMD, ClinVar), Bases de données génomiques (UCSC, Ensembl)
- **Langage de programmation:** Linux Bash, Python, R, Javascript
- **Laboratoire:** Western Blot, Clonage moléculaire, Mutagenèse dirigée, PCR, Génotypage, Analyse CNV, qRT-PCR, Extraction d'ADN

BOURSES ET PRIX

- Bourse d'excellence, Université de Montréal, 8000\$ (2015)
- Bourse de recherche, Centre de Recherche du CHUM, 1000\$ (2014)
- Bourse de recherche (2 as), Fonds de la recherche du Québec – Santé, 20000\$ (2014)
- Bourse de recherche (1 an), Fondation Savoy, 15000\$ (décliné) (2014)
- Meilleur dossier, Fondation Savoy, 1500\$ (décliné) (2014)
- Bourse de recherche (1 an), Réseau Médicale de Génétique Appliquée, 17850\$ (2012)
- Bourse de recherche (1 an), Fondation Go, 10000\$ (2012)
- Bourse d'excellence, Centre de Recherche du CHUM, 1000\$ (2012)
- Bourse de perfectionnement, Université de Montréal, 2250\$ (2012)

PUBLICATIONS

1. Cadieux-Dion M*, Begin P*, Paradis C, Meloche C, et al. *Clinical use of exome sequencing for Mendelian disorders : study of a large family with TREX1 mutation*. En préparation.
2. Cadieux-Dion M, Girard SL, Dobrzeniecka S, et al. *Exome sequencing in large multiplex families with genetic generalized epilepsy*. En préparation

3. Berkovic SF, Staropoli JF, Carpenter S, Oliver KL, Kmoch S, Anderson GW, Damiano JA, Hildebrand MS, Sims KB, Cotman SL, Bahlo M, Smith KR, Cadieux-Dion M, et al., *Diagnosis and misdiagnosis of adult neuronal ceroid lipofuscinosis (Kufs disease)*. *Neurology*. (2016)
4. Cadieux-Dion M, Turcotte-Gauthier M, Noreau A, et al. *Expanding the clinical phenotype associated with ELOVL4 mutation: study of a large French-Canadian family with autosomal dominant spinocerebellar ataxia and erythrokeratoderma (SCA34)*. *JAMA Neurology*. (2014)
5. Cadieux-Dion M, Andermann E, Lachance-Touchette P, et al. *Recurrent mutations in DNAJC5 cause autosomal dominant Kufs Disease*. *Clinical Genetics*. (2013)
6. Pickles S, Cadieux-Dion M, Alvarez JI, et al. Endo-MitoEGFP mice: A novel transgenic mouse with fluorescently marked mitochondria in microvascular endothelial cells. *PLoS One*. (2013)
7. Corradi A, Fadda M, Piton A, Patry L, Marte A, Rossi P, Cadieux-Dion M, et al. SYN2 is an autism predisposing gene: loss-of-function mutations alter synaptic vesicle cycling and axon outgrowth. *Human Molecular Genetics* (2013)

PRÉSENTATIONS (SÉLECTIONNÉES)

Oral (total: 6)

- Genetic Days, Network for Applied Medical Genetics, QC, CAN. (2014)
- Canadian Dermatology Association, QC, CAN. (2013)
- 13th International Conference on Neuronal Ceroid Lipofuscinoses, London, UK. (2013)
- Genetic Days, Network for Applied Medical Genetics, QC, CAN. (2012)

Affiche (total: 12)

- Genomic of Common Disease, Hinxton, UK. (2015)
- 67th American Epilepsy Society Annual Meeting, Washington, DC, USA. (2013)
- 12th International Congress on Human Genetics, Montreal, QC, CAN. (2011)
- 65th American Epilepsy Society Annual Meeting, Baltimore, MD, USA. (2011)

Annexe 2 : SYN2 is an autism predisposing gene: loss-of-function mutations alter synaptic vesicle cycling and axon outgrowth

Article publié dans Human Molecular Genetics

Anna Corradi^{1,†‡}, Manuela Fadda^{1,2,†‡}, Amélie Piton^{3,†‡}, Lysanne Patry³, Antonella Marte¹, Pia Rossi¹, Maxime Cadieux-Dion³, Julie Gauthier³, Line Lapointe³, Laurent Mottron³, Flavia Valtorta⁴, Guy A. Rouleau³, Anna Fassio^{1,2}, Fabio Benfenati^{1,2,†‡,*} and Patrick Cossette^{3,†‡}

1) Department of Experimental Medicine, University of Genova, Genova, Italy, 2) Department of Neuroscience and Brain Technologies, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Genova, Italy, 3) Centre of Excellence in Neuromics and CHUM Research Center, Université de Montréal, CHUM-Hôpital Notre-Dame, Montréal, QC, Canada

PMID: 23956174

Annexe 3 : Endo-MitoEGFP mice: a novel transgenic mouse with fluorescently marked mitochondria in microvascular endothelial cells

Article publié dans PLoS One

Sarah Pickles^{1,2}, Maxime Cadieux-Dion¹, Jorge I. Alvarez¹, Marc-André Lécuyer¹, Sarah L. Peyrard¹, Laurie Destroismaisons¹, Lydia St-Onge¹, Simone Terouz¹, Patrick Cossette^{1,3}, Alexandre Prat^{1,3}, Christine Vande Velde^{1,3*}

1) Centre d'Excellence en Neuromique de l'Université de Montréal, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada, 2) Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada, 3) Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada

PMID: 24019971

Annexe 4 : Diagnosis and misdiagnosis of adult neuronal ceroid lipofuscinosis (Kufs disease)

Article publié dans Neurology

Samuel F Berkovic¹, John F Staropoli², Stirling Carpenter³, Karen L Oliver¹, Stanislav Kmoch^{4,5}, Glenn W Anderson⁶, John A Damiano¹, Michael S Hildebrand¹, Katherine B Sims⁷, Susan L Cotman⁷, Melanie Bahlo^{8,9}, Katherine R Smith⁸, Maxime Cadieux-Dion¹⁰, Patrick Cossette¹⁰, Ivana Jedličková⁴, Anna Přistoupilová⁴, Sara E Mole¹¹ on behalf of the ANCL Gene Discovery Consortium

1) Epilepsy Research Centre, Department of Medicine, University of Melbourne, Austin Health, Heidelberg, Victoria, Australia, 2) Biogen, Inc., Cambridge, MA, USA, 3) Department of Pathology, Centro Hospitalar São João, Porto, Portugal, 4) Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic, 5) General University Hospital in Prague, Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2, Czech Republic, 6) Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust, London, UK, 7) Center for Human Genetic Research and Department of Neurology, Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital, 185 Cambridge Street, Boston, MA 02114, USA, 8) Population Health and Immunity Division, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Victoria, Australia, 9) Department of Mathematics and Statistics and Department of Medical Biology, University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia, 10) Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, 11) MRC Laboratory for Cell Biology, Department of Genetics, Evolution & Environment and UCL Institute of Child Health, University College London, Gower St, London, WC1E 6BT, UK.

PMID: 27412140