



HAL
open science

Étude fonctionnelle de mutations des canaux sodiques potentiel-dépendants Nav1.1 et Nav1.2 : corrélation phénotype/génotype et mise en évidence d'un mécanisme spécifique pour les troubles du spectre de l'autisme

Sandra Dhifallah

► **To cite this version:**

Sandra Dhifallah. Étude fonctionnelle de mutations des canaux sodiques potentiel-dépendants Nav1.1 et Nav1.2 : corrélation phénotype/génotype et mise en évidence d'un mécanisme spécifique pour les troubles du spectre de l'autisme. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2020. Français. NNT : 2020COAZ6004 . tel-03510363

HAL Id: tel-03510363

<https://theses.hal.science/tel-03510363>

Submitted on 4 Jan 2022

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

Etude fonctionnelle de mutations des
canaux sodiques potentiel-dépendants
 $Na_v1.1$ et $Na_v1.2$: corrélation phénotype-
génotype et mise en évidence d'un
mécanisme spécifique pour les troubles du
spectre de l'autisme

Sandra DHIFALLAH

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC)

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en** Sciences de la vie
d'Université Côte d'Azur
Dirigée par : Dr Massimo Mantegazza
Co-encadrée par : Dr Sandrine Cestèle
Soutenue le : 28 Mai 2020

Devant le jury, composé de :
Barbara Bardoni, DR INSERM, Université Côte
d'Azur
Philippe Lory, DR CNRS, Université de
Montpellier
Marco Canepari, CR CNRS/HDR, Université de
Grenoble
Rima Nabbout, Professeur, Hôpital Necker



Université Côte d'Azur, École Doctorale 85 Science de la Vie et de la Santé
Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, CNRS/UCA

Thèse de doctorat

Présentée en vue de l'obtention du titre de

Docteur en Sciences de la Vie

Spécialité : Interactions Moléculaires et Cellulaires

Etude fonctionnelle de mutations des canaux sodiques potentiel-dépendants $Na_v1.1$ et $Na_v1.2$: corrélation phénotype-génotype et mise en évidence d'un mécanisme spécifique pour les troubles du spectre de l'autisme

Soutenue par :

Sandra DHIFALLAH

Jury :

Présidente du jury

Dr Barbara BARDONI, DR INSERM, IPMC, Sophia-Antipolis

Rapporteurs

Dr Philippe LORY, DR CNRS, IGF, Montpellier

Dr Marco CANEPARI, CR CNRS/HDR, Grenoble

Examinatrice

Pr Rima NABBOUT, Professeur, Hôpital Necker

RESUMÉ

Les gènes codant pour les canaux sodiques dépendants du potentiel de membrane (Na_v) présents dans le système nerveux central sont la cible de nombreuses mutations conduisant à divers phénotypes. L'objectif de mon travail de thèse est de comprendre pourquoi des mutations d'un même gène peuvent conduire à des pathologies distinctes afin d'envisager le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Le gène *SCN1A* codant pour la sous-unité α du canal $\text{Na}_v1.1$ exprimé principalement dans les interneurons GABAergiques, est la cible de mutations responsables de syndromes épileptiques et de la migraine hémiplégique familiale (MHF-3), une forme rare de migraine avec aura. Il a été montré que les mutations responsables de l'épilepsie induisent une perte de fonction du canal, ce qui conduit à une hypoexcitabilité des neurones GABAergiques dont résulte une hyperexcitabilité du réseau neuronal. L'analyse fonctionnelle de mutations responsables de la MHF-3 a montré qu'elles induisent un gain de fonction du canal et une hyperexcitabilité des neurones GABAergiques pouvant être à l'origine d'une dépression corticale envahissante (DCE), un mécanisme pathologique de la migraine. En particulier, l'étude de la mutation L1649Q a montré qu'elle entraîne un défaut d'expression des canaux $\text{Na}_v1.1$ à la membrane. Ce défaut d'expression peut être restauré soit par l'incubation de ces cellules à 30°C, ce qui facilite l'adressage des canaux à la membrane, soit par l'expression de la mutation dans des neurones en culture. L'analyse des propriétés biophysiques des canaux mutés après récupération partielle de la densité de courant a mis en évidence que l'effet global de la mutation L1649Q correspond à un gain de fonction allant dans le sens d'une hyperexcitabilité des neurones GABAergiques (Cestèle et al. 2013 PNAS). Afin d'identifier si d'autres mutations MHF-3 possèdent le même mécanisme fonctionnel (perte/gain de fonction), la 1ère partie de ma thèse a consisté en la caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle mutation responsable de la MHF-3, L1670W. Cette mutation conduit à un défaut d'expression des canaux $\text{Na}_v1.1$ (perte de fonction) cependant, après récupération partielle de la densité de courant, la mutation induit un net gain de fonction des canaux $\text{Na}_v1.1$. Ces résultats ont permis de mettre en évidence que la mutation L1670W, comme la mutation L1649Q, induit un défaut d'expression des canaux à la membrane et un gain de fonction renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle ce mécanisme pourrait être généralisé à d'autres mutations induisant la MHF-3. Le gène *SCN2A* code pour la sous-unité α des canaux $\text{Na}_v1.2$ exprimés principalement dans les neurones excitateurs. Les mutations du gène *SCN2A* sont responsables de différentes pathologies telles que les

épilepsies bénignes, les encéphalopathies épileptiques néonatales et infantiles, la schizophrénie et les troubles du spectre de l'autisme (TSA) avec ou sans épilepsie associée. A ce jour, les mécanismes détaillés responsables de ces différentes pathologies restent flous. Dans le but d'élucider la relation génotype/phénotype, nous avons étudié les effets fonctionnels de 23 mutants *SCN2A* responsables de ces différentes pathologies avec des expériences de patch-clamp dans des neurones néocorticaux de souris en culture et des lignées cellulaires transfectés. Nos résultats montrent que toutes les mutations responsables de TSA sans épilepsie induisent une perte presque totale de densité de courant tandis que pour les autres pathologies les effets sont hétérogènes. Dans le but de reproduire les conditions pathophysiologiques hétérozygotes, nous avons étudié la co-expression des canaux sauvages avec chacun des 23 canaux mutés. Nos résultats ont mis en évidence une réduction de la densité de courant des canaux sauvages uniquement en présence de canaux porteurs de mutations responsables de TSA. Par conséquent, seules les mutations responsables du phénotype autistique induisent un phénomène de dominance négative sur les canaux sauvages. Afin de déterminer si ce mécanisme de dominance négative est dû à l'interaction de 2 sous-unités α , qui a été décrite récemment (Clatot et coll., 2018 Nat Commun), nous avons utilisé différentes stratégies pour inhiber cette interaction dans les neurones néocorticaux co-transfectés avec les canaux sauvages et les canaux mutés. Les résultats obtenus ont montré que l'effet de dominance négative des mutants responsables de TSA n'est plus observé lorsque l'interaction entre une sous-unité α d'un canal sauvage avec celle d'un canal muté est inhibée. Par conséquent, nos résultats permettent de décrire pour la 1^{ère} fois que les mutations des canaux Na^+ responsables de TSA agissent par un mécanisme de dominance négative, lequel est médié par l'interaction entre des canaux sauvages avec des canaux mutés.

Mots clés : Nav1.1, MHF-3, migraine, aura, Nav1.2, épilepsie, TSA, dominance négative

ABSTRACT

The genes encoding for the voltage-gated sodium channels (Na_v) expressed in the central nervous system are the target of numerous mutations leading to various phenotypes. The aim of my work is to understand why mutations in the same gene can lead to distinct pathologies in order to consider the development of new therapeutic approaches. The *SCN1A* gene encoding for the α subunit of $\text{Na}_v1.1$ channels, mainly expressed in GABAergic interneurons, is the target of mutations responsible for epileptic syndromes and familial hemiplegic migraine (MHF-3), a rare form of migraine with aura. The mutations responsible for epilepsy have been shown to cause a loss of function, which leads to hypoexcitability of GABAergic neurons and subsequently to the network hyperexcitability. At the opposite, the mutations responsible for MHF-3 showed a gain of function and hyperexcitability of GABAergic neurons which can lead to the cortical spreading depression (CSD), a pathological mechanism of headache. In particular, the functional study of the L1649Q mutation showed that the mutation leads to a defect in the $\text{Na}_v1.1$ channels expression at the membrane. This defect in expression can be restored either by incubating cells at 30 ° C, which facilitates the channels trafficking, either by the expression of the mutation in neurons in culture. Analysis of the biophysical properties of the mutated channels after partial recovery of the current density demonstrated that the overall effect of the L1649Q mutation corresponds to a gain of function, consistent with an hyperexcitability of GABAergic neurons (Cestele and al. 2013 PNAS). In order to identify if other MHF-3 mutations share the same mechanism (loss / gain of function), the first part of my thesis aimed to characterize a new mutation responsible for MHF-3, L1670W. This mutation leads to a defect in the $\text{Na}_v1.1$ channels expression at the membrane but after partial recovery of the current density, the mutation induces a clear gain of function of $\text{Na}_v1.1$ channels. These results showed that the L1670W mutation, like the L1649Q mutation, leads to a defect in the $\text{Na}_v1.1$ channels expression at the membrane and a gain in function, thus reinforcing the hypothesis that this mechanism could be generalized to other mutations responsible for MHF-3. The *SCN2A* gene encodes for the α subunit of $\text{Na}_v1.2$ channels mainly expressed in excitatory neurons. Mutations in the *SCN2A* gene are responsible for different pathologies such as benign epilepsies, neonatal and infantile epileptic encephalopathies, schizophrenia and Autism Spectrum Disorder (ASD) associated or not with epilepsy. To date, the detailed mechanisms responsible for these different pathologies remain unclear. In order to elucidate the genotype/phenotype relationship, we studied the functional effects of 23 *SCN2A* mutants responsible for these different pathologies with patch-clamp

experiments in primary culture of mice neocortical neurons and transfected cell lines. Our results show that all the mutations responsible for ASD without epilepsy induce an important decrease (almost complete) of the current density while for the other pathologies the effects are heterogeneous. In order to reproduce the heterozygous physiopathological conditions, we studied the co-expression of wild-type (WT) channels with each of the 23 mutated channels. Our results showed a reduction in the WT channels current density only in the presence of channels carrying mutations responsible for ASD. Consequently, only the mutations responsible for the autistic phenotype induce a phenomenon of negative dominance on WT channels. To determine whether this negative dominance mechanism is due to the interaction of α subunits, which has been described recently (Clatot et al., 2018 Nat Commun), we used different strategies to inhibit this interaction in neocortical neurons co-transfected with WT and mutated channels. The results obtained showed that the negative dominance effect of the mutants responsible for ASD is no longer observed when the interaction between the α subunits is inhibited. Therefore, our results allow us to describe for the first time that mutations in Na^+ channels responsible for ASD act by a negative dominance mechanism, which is mediated by the interaction between WT and mutated channels.

Keywords : Nav1.1, FHM-3, migraine, aura, Nav1.2, epilepsy, ASD, negative dominance

A mon frère et meilleur ami Sabri...

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mes directeurs de thèse le Dr Massimo Mantegazza et le Dr Sandrine Cestèle pour m'avoir encadré durant ces trois années. J'ai énormément appris à vos côtés et je vous en suis très reconnaissante.

Je remercie également le Dr Philippe Lory, le Dr Marco Canepari, le Pr Rima Nabbout et le Dr Barbara Bardoni qui me font l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse.

Mes remerciements vont également à mon comité de suivi de thèse, le Dr Laurent Aniksztejn et le Dr Saïd Bendahhou.

Merci à mes collègues grâce à qui j'ai passé trois années formidables.

Fabrizio, merci pour le soutien que tu m'as apporté au quotidien mais aussi pour toutes nos conversations plus inspirantes les unes que les autres. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta vie future professionnelle et personnelle.

Lara, ma bella ragazza... tu es arrivée il y a un an et j'ai déjà l'impression de te connaître depuis une éternité. Merci pour tous ces beaux moments que l'on a partagé que ce soit au labo ou à l'extérieur. Tu es une belle personne, je te souhaite toute la réussite que tu mérites.

Fabrice, merci pour toutes les conversations enrichissantes, pour ta gentillesse et ta bienveillance.

Je souhaite également remercier les autres personnes de la team MM : Magali, Emilie, Wendy et Isabelle ainsi que les personnes qui ne font plus partie de l'équipe mais que j'ai eu la chance de rencontrer, Sarah, Oana, Marion, Estelle, Alexandre et Fanny.

Merci aux filles Martin, Gwen, Marta et Marie et aux filles du R-1 Anais, Lila et Maria. Marta, merci pour tous les conseils en immuno et pour tout le soutien que tu m'as apporté pendant l'écriture du manuscrit.

Je remercie également la plateforme imagerie Fred, Sophie et Julie. Merci pour votre professionnalisme et votre implication dans nos projets.

Merci à mes amis qui sont présents depuis les années fac.

A Abde, qui m'a transmis sa passion pour les neurosciences et qui m'a toujours encouragé.

A Morgane, ma marseillaise avec qui j'ai passé mes plus belles années à l'université. Je te souhaite de faire une belle thèse et de réaliser ce projet qui te tient à cœur.

A Maya, mon amie depuis l'enfance avec qui j'ai partagé des moments inoubliables.

Je souhaite également remercier ma famille.

Ma mère, celle que j'admire et qui m'a tout appris de la vie. Je suis tellement fière de la femme que je suis devenue grâce à toi.

Mon père, qui m'a transmis sa joie de vivre et sa générosité. Merci d'être toujours là et de prendre soin de moi.

Merci à mes deux grands frères, Mehdi et Sabri pour tout l'amour qu'ils me portent. Merci d'être toujours présents dans les bons comme les mauvais moments.

Et pour finir je remercie mon mari Issam avec qui je partage ma vie depuis dix ans. Merci pour tout ce que tu fais pour moi au quotidien, pour toutes ces belles preuves d'amour.

Sommaire

I. INTRODUCTION GENERALE	21
1. Le cortex.....	23
1.1 Anatomie morpho-fonctionnelle.....	23
1.2 Les populations neuronales du cortex.....	24
1.3 Les canaux ioniques potentiel-dépendants et le potentiel d'action (PA).....	26
2. Les canaux sodiques potentiel-dépendants.....	28
2.1 Structure-Fonction	28
2.2 Les différents isoformes Nav1.1-Nav1.9.....	35
2.3 Les sous-unités auxiliaires β	37
2.4 Trafic cellulaire des canaux sodiques potentiel-dépendants.....	39
2.5 La dimérisation des canaux sodiques potentiel-dépendants	42
2.6 L'isoforme néonatal	46
3. Les canaux sodiques potentiel-dépendants $Na_v1.1$	47
3.1 Distribution neuronale et spatio-temporelle.....	47
3.2 Rôle des canaux $Na_v1.1$	49
3.3 Pathologies associées aux mutations du gène <i>SCN1A</i>	50
L'épilepsie généralisée avec convulsions fébriles plus (EGCF+).....	50
Le syndrome de Dravet	52
La migraine hémiplégique familiale (MHF)	53
Corrélation génotype-phénotype	60
4. Les canaux sodiques potentiel-dépendants $Na_v1.2$	66
4.1 Distribution neuronale et spatio-temporelle des canaux $Na_v1.2$	66
4.2 Rôle des canaux $Na_v1.2$	68
4.3 Pathologies associées aux mutations du gène <i>SCN2A</i>	69
L'Épilepsie Néonatale et Infantile Familiale Bénigne (ENIFB).....	69
Les encéphalopathies épileptiques	70
Les troubles du spectre de l'autisme (TSA)	77
La schizophrénie.....	79
II. OBJECTIFS.....	81
III. MATERIEL ET METHODES.....	89
1. Mutagenèse dirigée et clonage	91
2. Culture de neurones néocorticaux	94
3. Transfection des neurones néocorticaux en culture avec la Lipofectamine 2000.....	96
4. Transfection au phosphate de calcium des cellules tsA-201 et des neurones plus matures	98

5. Patch-clamp en configuration « cellule entière » des neurones néocorticaux en culture	100
6. Marquages immunocytochimiques	103
7. Tests statistiques.....	106
IV. RESULTATS.....	107
Partie 1	109
Synthèse de l'article	111
Article.....	113
Partie 2	115
1. Etude fonctionnelle de mutations <i>SCN2A</i> responsables de TSA	119
1.1 Les mutations <i>SCN2A</i> liées aux TSA conduisent à une perte de fonction des canaux $Na_v1.2$	119
1.2 Les mutations <i>SCN2A</i> responsables de TSA exercent un effet de dominance négative sur les canaux WT	124
1.3 La dominance négative est la conséquence d'une interaction α - α	126
1.4 Une mutation <i>SCN2A</i> responsable de TSA associés à une épilepsie conduit à une perte de fonction des canaux $Na_v1.2$ sans dominance négative	132
2. Les mutations <i>SCN2A</i> liées aux autres pathologies telles que les EE infantiles, la schizophrénie et les absences conduisent à une perte de fonction des canaux $Na_v1.2$ sans dominance négative.....	135
3. Les mutations <i>SCN2A</i> responsables du syndrome d'Ohtahara conduisent à un gain de fonction des canaux $Na_v1.2$	145
4. La récupération de la densité de courant des canaux $Na_v1.1$ présentant des défauts d'adressage à la surface cellulaire n'est pas la conséquence d'une interaction α - α	154
V. CONCLUSION GENERALE	157
VI. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	159
1. Le gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ présentant des défauts d'adressage à la surface cellulaire n'est pas la conséquence d'une interaction α - α	160
2. La dominance négative : un mécanisme spécifique des TSA sans épilepsie	160
3. La majorité des mutations <i>SCN2A</i> responsables d'EE infantiles conduisent à une perte de fonction des canaux $Nav1.2$, sans dominance négative.....	166
4. Les mutations <i>SCN2A</i> responsables du syndrome d'Ohtahara	167
5. Les mutations <i>SCN2A</i> liées aux autres pathologies	169
Références	171
Annexes	187

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du néocortex.....	24
Figure 2. Patron de décharge des cellules corticales.....	25
Figure 3.Représentation schématique d'un potentiel d'action	27
Figure 4. Représentation schématique d'un neurone.....	27
Figure 5. Les structures primaires des sous-unités des canaux sodiques potentiel-dépendants	29
Figure 6. Structure cryo-EM du canal NavAb au repos	31
Figure 7. Mécanisme d'inactivation du canal Na _v 1.4.....	33
Figure 8. Comparaison de l'identité des acides aminés pour les canaux sodiques de rat Na _v 1.1 - Na _v 1.9	36
Figure 9. Voies de maturation des canaux ioniques	40
Figure 10. Le segment initial de l'axone	41
Figure 11. Etapes de photoblanchiment de la GFP observées par des expériences SiMPull pour le canal sodique GFP-Na _v 1.5, le canal chlorure ClC-3-GFP connu pour former des dimères et le canal potassium K _v 4.3-GFP connu pour former des tétramères.	42
Figure 12. Représentation schématique de la région d'interaction entre les sous-unités α du canal cardiaque Na _v 1.5.....	43
Figure 13. Couplage des canaux Na _v 1.1 et Na _v 1.2 médié par la protéine 14.3.3	44
Figure 14. Localisation des canaux Na _v 1.1 au SIA des interneurons PV+ dans le néocortex en développement de souris à P14-P16	48
Figure 15. Niveau d'ARNm des canaux Na _v 1.1, Na _v 1.2 et Na _v 1.3 dans le cerveau du rat, au cours du développement.....	48
Figure 16. Régulation positive des canaux Na _v 1.3 dans les interneurons GABAergiques des souris hétérozygotes et homozygotes pour le gène <i>SCN1A</i>	49
Figure 17. Dépression corticale envahissante enregistrée pendant l'aura migraineuse d'un patient ...	54
Figure 18. Localisation des mutations du gène <i>SCN1A</i> responsables de la MHF-3.....	55
Figure 19. Lien entre le génotype et le phénotype des mutations du gène <i>SCN1A</i>	62
Figure 20. La DCE et la voie de la douleur.....	64
Figure 21. Localisation des canaux Na _v 1.2 au SIA des cellules granulaires de la rétine de rat à P2. ...	67
Figure 22. Distribution des canaux Na _v 1.2 et Na _v 1.6 dans le cortex préfrontal de rat adulte.	68
Figure 23. EEG de type « suppression-burst ».	72
Figure 24. Distribution des patients porteurs d'une mutation <i>SCN2A</i> selon le phénotype et l'âge au début des crises.	73
Figure 25. EEG de type hypsarrythmie	74
Figure 26. EEG de type slow and spike wave discharges.	75
Figure 27. Effets fonctionnels des mutations <i>SCN2A</i> responsables de l'autisme.....	78
Figure 28. Localisation des 23 mutations <i>SCN2A</i> étudiées.....	87
Figure 29. Principales étapes de la mutagenèse dirigée avec digestion du brin parental	91
Figure 30. Cerveau d'embryon de souris à E17	94
Figure 31. Principe de la lipofection	96
Figure 32. Transfection des cellules à la lipofectamine 2000	97
Figure 33. Transfection des cellules au phosphate de calcium.....	98
Figure 34. Représentation schématique d'une cellule en configuration cellule entière	100
Figure 35. Protocole d'enregistrement des neurones en configuration cellule entière.....	102
Figure 36: Localisation des 7 mutations <i>SCN2A</i> responsables de TSA	119
Figure 37 : Les canaux porteurs de mutations <i>SCN2A</i> responsables de TSA conduisent, dans la majorité des cas, à une réduction totale ou quasi-totale de la densité de courant des canaux sodiques potentiel-dépendants Na _v 1.2	121
Figure 38: Exemple de décharges enregistrées dans des neurones néocorticaux en culture à 10 jours in vitro, transfectés avec les canaux WT ou R379H.....	122
Figure 39 : Localisation des canaux Na _v 1.2 WT ou porteurs de la mutation C959X dans les cellules tsA-201. Le membrite marque la membrane des cellules tsA-201 et l'anticorps anti-HA marque les canaux WT-HA ou C959X-HA.....	123

Figure 40 : Courbes représentant la densité de courant enregistrée dans les neurones néocorticaux en culture transfectés avec 1, 1.5 ou 3µg d'ADN codant pour le canal Na _v 1.2	124
Figure 41: Les canaux porteurs de mutations <i>SCN2A</i> responsables de TSA exercent un effet de dominance négative sur les canaux WT)	125
Figure 42 : Représentation schématique de la région d'interaction entre les sous-unités α-II humaine	127
Figure 43 : La difopéine et la mutation S487A n'ont aucun effet sur les canaux WT.	127
Figure 44 : La dominance négative des mutations <i>SCN2A</i> liées aux TSA est la conséquence d'une interaction entre les sous-unités α.	129
Figure 45 : Localisation de la mutation R1635Q responsable de TSA associés à l'épilepsie.....	132
Figure 46 : La mutation R1635Q conduit à une perte de fonction des canaux Nav1.2 dans les neurones néocorticaux en culture.....	133
Figure 47: La mutation R1635Q associée aux TSA et à l'épilepsie n'exerce pas de dominance négative sur les canaux WT	134
Figure 48 : Localisation des 5 mutations <i>SCN2A</i> responsables d'EE	135
Figure 49 : Effets fonctionnels des mutations <i>SCN2A</i> responsables d'EE infantiles dans les neurones néocorticaux en culture.....	137
Figure 50 : Localisation de 3 mutations <i>SCN2A</i> liées à la schizophrénie	138
Figure 51 : Effets fonctionnels des mutations <i>SCN2A</i> identifiées chez des patients souffrant de schizophrénie.....	139
Figure 52 : Localisation de la mutation G659D liée aux absences	140
Figure 53 : La mutation <i>SCN2A</i> liée aux absences conduit à une perte de fonction nette des canaux Na _v 1.2 dans les neurones néocorticaux en culture.....	141
Figure 54 : Les mutations <i>SCN2A</i> responsables d'EE, de schizophrénie ou d'absences n'exercent pas de dominance négative sur les canaux WT.....	142
Figure 55 : Localisation de 6 mutations du gène <i>SCN2A</i> responsables du syndrome d'Ohtahara.....	145
Figure 56 : Propriétés biophysiques des canaux porteurs de mutations <i>SCN2A</i> responsables du syndrome d'Ohtahara dans les neurones néocorticaux en culture.	147
Figure 57 : Courants Na ⁺ enregistrés en réponse à une décharge neuronale, dans les neurones exprimant les mutations <i>SCN2A</i> responsables du syndrome d'Ohtahara	149
Figure 58: Effets des mutations <i>SCN2A</i> responsables du syndrome d'Ohtahara sur les canaux WT .	151
Figure 59: Densités de courant des co-expressions Na _v 1.1 dans des cellules tsA-201 incubées à 37°C	155
Figure 60: La mutation R367H située sur le gène <i>SCN5A</i> conduit à une réduction totale du courant Na ⁺ et exerce une dominance négative sur les canaux WT.....	163

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des plasmides utilisés dans notre étude	93
Tableau 2. Quantités d'ADN utilisées pour les différentes conditions de transfection	99
Tableau 3. Anticorps utilisés pour les différents marquages immunocytochimiques.....	106
Tableau 4: Liste des mutations <i>SCN2A</i> dans les TSA.....	119
Tableau 5: Densités de courant des mutations <i>SCN2A</i> responsables de TSA et des différentes conditions de co-expressions.....	130
Tableau 6 : Potentiel de demi-activation (Vhalf) des mutations <i>SCN2A</i> responsables de TSA et des différentes conditions de co-expressions	130
Tableau 7: Potentiel de demi-inactivation (Vhalf) des mutations <i>SCN2A</i> responsables de TSA et des différentes conditions de co-expressions	131
Tableau 8: Liste des mutations <i>SCN2A</i> liées responsables d'EE	135
Tableau 9 : Propriétés biophysiques des mutations <i>SCN2A</i> liées aux EE, à la schizophrénie et aux absences.....	143
Tableau 10: Liste des mutations <i>SCN2A</i> liées au syndrome d'Ohtahara	145
Tableau 11 : Propriétés biophysiques des mutations <i>SCN2A</i> responsables du syndrome d'Ohtahara.....	153

Liste des abréviations

AHP : *afterhyperpolarisation*
ankG : ankyrine G
CGE : éminence ganglionnaire caudale
CGR : cellules ganglionnaires rétiniennes
CIM : classification internationale des maladies
Cryo-EM : la cryo- microscopie électronique
DCE : dépression corticale envahissante
DRG : ganglions spinaux de la racine dorsale
ECoG : électrocorticographie
EE : encéphalopathies épileptiques
EGCF+ : Epilepsie Généralisée avec Convulsions Fébriles Plus
EIFB : épilepsies infantiles familiales bénignes
EIFMS : *epilepsy of infancy with migrating focal seizures*
ENC : cluster négatif extracellulaire
ENFB : épilepsies néonatales familiales bénignes
ENIFB : épilepsie néonatale et infantile familiale bénigne
ERDB : *Elicited Repetitive Daily Blindness*/ cécité répétitive quotidienne provoquée
FS : febrile seizures/ crises fébriles
HCS : site de constriction hydrophobe
HEK293 : épithélium du rein *Human Embryonic Kidney*
IB : Intrinsic Bursting
INC : cluster négatif intracellulaire
LTS : Low Threshold Spiking
MAE : épilepsie myoclonique-astatique
MHF : migraine hémiplégique familiale
MGE : éminence ganglionnaire médiale
PA : potentiel d'action
PKA : protéines kinases A
PKC : protéines kinases C
POA : aire préoptique
PPSE : potentiels post-synaptiques excitateurs
PPSI : potentiels post-synaptiques inhibiteurs
RE : réticulum endoplasmique
RS : Regular Spiking
SD : syndrome de Dravet
SIA : segment initial de l'axone
SiMPull : Single Molecule Pull-down
SMEI : épilepsie myoclonique sévère de l'enfant
SNC : système nerveux central
SNP : système nerveux périphérique
SO : syndrome d'Ohtahara
SSN : noyau salivateur supérieur
SST+ : somatostatine
STX : saxitoxine
TG : ganglions du trijumeau
TNC : noyau trijumeau caudalis
TSA : Troubles du spectre de l'autisme
TTX : tétrodotoxine
VIP+ : *vasoactive intestinal peptide*
WT : Wild-type

I. INTRODUCTION GENERALE

Les canaux sodiques potentiel-dépendant $Na_v1.1$ et $Na_v1.2$ sont exprimés dans tout le cerveau. Cela implique que les mutations situées sur les gènes *SCN1A* et *SCN2A* responsables de la migraine, l'épilepsie ou encore l'autisme peuvent avoir un impact sur des structures cérébrales différentes. Le cortex est une structure cérébrale qui semble être impliquée dans toutes les pathologies liées aux mutations des gènes *SCN1A* et *SCN2A*.

1. Le cortex

1.1 Anatomie morpho-fonctionnelle

Chez l'Homme, le cortex cérébral permet des fonctions élaborées telles que le langage, la mémoire, la commande de mouvements volontaires ou encore la conscience.

Il existe 3 types de cortex qui se distinguent par leur structure et leur rôle : l'archicortex, le paléocortex et le néocortex. Le néocortex occupe la quasi-totalité de la surface des lobes des 2 hémisphères. Les lobes s'organisent sous la forme d'aires corticales primaires, chacune responsable d'un certain type d'activités. On distingue le lobe frontal, le lobe pariétal, le lobe temporal et le lobe occipital. Le lobe frontal, situé à la partie antérieure de l'hémisphère cérébral, est impliqué dans le comportement. Il contient l'aire motrice qui commande les mouvements volontaires. Le lobe pariétal, situé en arrière du lobe frontal, joue un rôle important dans l'intégration des informations sensorielles issues de la vision, du toucher et de l'audition et dans la perception de l'espace. Le cortex temporal, situé en dessous du cortex pariétal, est impliqué dans la mémoire, le langage, les émotions, l'audition ou encore l'olfaction. Le cortex occipital, qui se trouve en arrière de l'hémisphère, est impliqué dans la vision et contient l'aire visuelle qui reçoit et traite les informations venant de l'œil (Carpenter et Sutin, 1983).

D'une manière générale, l'hémisphère droit commande le côté gauche du corps et inversement.

Horizontalement, le néocortex se divise en 6 couches numérotées de I à VI de la surface vers la profondeur (**Figure 1**) : la couche I ou couche moléculaire contenant principalement des cellules gliales et des fibres nerveuses, la couche II ou couche granulaire externe, la couche III ou couche pyramidale externe, la couche IV ou couche granulaire interne, la couche V ou couche pyramidale interne qui contient essentiellement des neurones pyramidaux dont les dendrites apicaux se projettent soit dans la couche moléculaire (couche I) soit dans la couche granulaire interne (couche IV) et dont les axones se projettent à distance (striatum, tronc

cérébral, moelle épinière..), et enfin la couche VI ou polymorphe contenant des neurones qui se projettent sur la couche IV du cortex et qui reçoit des afférences provenant du thalamus, des régions somatosensorielles corticales et du claustrum (Thomson, 2010).

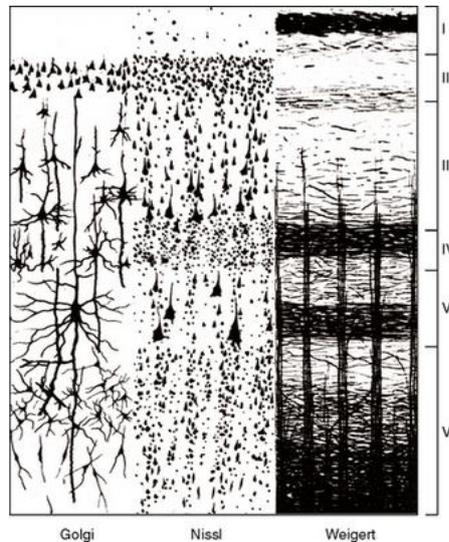


Figure 1 : Représentation schématique du néocortex. Colonne 1 : la coloration de Golgi permet de marquer l'ensemble du neurone ; Colonne 2 : la coloration de Nissl marque les corps cellulaires ; Colonne 3 : la coloration de Weigert marque les fibres nerveuses myélinisées et montre l'arrangement radial (en colonne) et horizontal (laminaire) des fibres nerveuses dans chaque couche (Carpenter et Sutin, J Human Neuroanatomy 1983).

1.2 Les populations neuronales du cortex

Le cortex cérébral est constitué à 80% de cellules excitatrices et à 20% de cellules inhibitrices qui sont nécessaires au maintien de l'excitabilité neuronale (Petilla Interneuron Nomenclature et coll., 2008).

Les cellules pyramidales ont pour neurotransmetteur le glutamate et représentent ainsi les cellules excitatrices.

Les cellules inhibitrices quant à elles ont pour neurotransmetteur le GABA et on les différencie par les protéines qu'elles expriment : les cellules en panier et en chandelier exprimant la parvalbumine (PV+) et situées au niveau des couches II, III, IV, V et VI, les cellules exprimant la somatostatine (SST+) situées majoritairement au niveau des couches II, III, V et VI et les cellules exprimant la reeline (reeline+) et le *vasoactif intestinal peptide* (VIP+) situées au niveau de la couche I à VI du cortex. Les interneurons PV+ et SST+ dérivent de l'éminence ganglionnaire médiale (MGE) et inhibent principalement les cellules

pyramidales (Contreras, 2004; Yamagata et coll., 2017). Les interneurones reeline+ et VIP+ sont dérivés de l'éminence ganglionnaire caudale (CGE) et inhibent principalement les neurones inhibiteurs. Ils jouent donc un rôle dans la désinhibition (Yamagata et coll, Biochem Biophys Res Commun 2017).

Les cellules constituant le cortex peuvent être différenciées par leur fonction ou le type de protéine qu'elles expriment mais pas seulement. En effet, on peut aussi classer les cellules du cortex en fonction de leur patron de décharge de potentiel d'action (PA).

Ainsi, on distingue les neurones de type *Regular Spiking (RS)* avec une décharge régulière (**Figure 2A**), les neurones de type *Intrinsic Bursting (IB)* générant des décharges en bouffées avec une fréquence de 200Hz, les neurones de type *Fast Rhythmic Bursting (FRB)* générant des décharges en bouffées rythmiques rapides avec une fréquence de décharge comprises entre 200 et 600Hz, les neurones de type *Fast Spiking (FS)* générant des décharges rapides avec une fréquence moyenne de 338Hz chez l'Homme (**Figure 2B**) et les neurones de type *Low Threshold Spiking (LTS)* générant des décharges à bas seuil (Contreras, 2004). Les cellules excitatrices génèrent principalement des décharges de type RS tandis que les interneurones génèrent principalement des décharges de type FS (Connors and Gutnick, 1990) (Markram et coll., 2004) (Wang et coll., 2016). La forme du PA ainsi que la fréquence de décharge dépendent du type de canaux ioniques sensibles au potentiel membranaire qui sont exprimés dans le neurone (Bean, 2007).

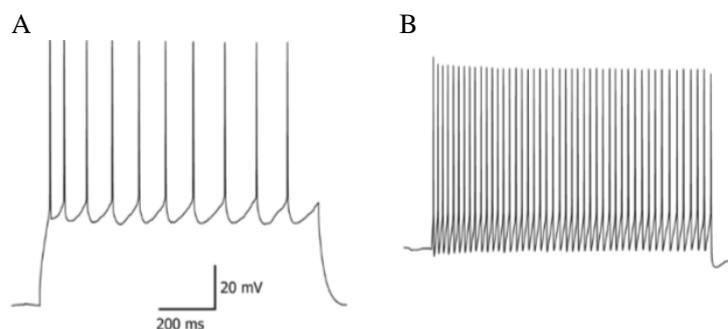


Figure 2. Patron de décharge des cellules corticales. Décharges de type Regular Spiking (A) et Fast Spiking (B) enregistrées dans des neurones corticaux de souris (Subkhankulova et coll., 2010)

1.3 Les canaux ioniques potentiel-dépendants et le potentiel d'action (PA)

La notion de pores sélectifs aux ions dépendants du potentiel membranaire est abordée pour la 1^{ère} fois dans les années 40 à l'université de Cambridge. A cette époque-là, Alan Hodgkin et Andrew Huxley travaillent sur l'axone géant de Calmar afin d'étudier les courants ioniques en fonction de la dépolarisation de la membrane plasmique. L'axone du Calmar fait 1mm de diamètre environ ce qui leur permet d'insérer des électrodes nécessaires pour imposer le voltage. Ainsi, ils montrent que les courants ioniques à l'origine du potentiel d'action (PA) sont dus à 1/ l'activation de la conduction au sodium Na^+ 2/ l'activation de la conductance au potassium K^+ et enfin 3/ l'inactivation de la conductance au sodium (Hodgkin and Huxley, 1945) (Hodgkin and Huxley, 1952). Ils obtiennent le prix Nobel en 1963 pour l'ensemble de leurs travaux.

Au repos, le potentiel membranaire du neurone est aux alentours de -70mV et la conductance membranaire au sodium (g_{Na}) est très faible car la plupart des canaux au sodium sont fermés. En réponse à une dépolarisation, les canaux sodiques potentiel-dépendants Na_v s'activent et les ions Na^+ rentrent massivement dans la cellule en raison de leur gradient électrochimique et augmente la dépolarisation. Cette 1^{ère} étape correspond à la phase ascendante du PA (**Figure 3**). Ensuite les canaux sodiques Na_v s'inactivent et les canaux potassiques potentiels dépendants K_v s'ouvrent. Les ions K^+ quittent alors la cellule et permettent la repolarisation de la membrane. Cette 2^{nde} étape correspond à la phase descendante du PA. Le potentiel de membrane retrouve ainsi sa valeur initiale. Toutefois les canaux au potassium n'étant pas inactivés au moment où la cellule retourne à son potentiel de repos, les ions potassium continuent à quitter la cellule et provoquent ainsi une légère hyperpolarisation, le temps que la perméabilité au potassium retrouve sa valeur de repos. Cette hyperpolarisation est appelée *afterhyperpolarisation* (AHP) et permet de contrôler la fréquence de décharge des neurones (Hodgkin and Huxley, 1952) (Bean, 2007).

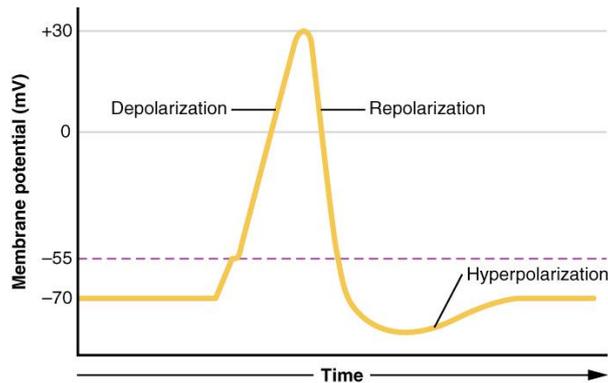


Figure 3. Représentation schématique d'un potentiel d'action. Les canaux Na_v s'ouvrent et dépolarisent la membrane (phase ascendante du PA). Ensuite les canaux Na_v s'inactivent et les canaux potassiques K_v s'ouvrent, ce qui a pour conséquence de repolariser la membrane (phase descendante du PA). Les ions K^+ continuent à quitter la cellule et provoquent l'hyperpolarisation (Grider et Glaubenskle, Physiology, Action Potential 2019)

In vivo, les neurotransmetteurs sont libérés par l'élément pré-synaptique. En se liant sur leurs récepteurs spécifiques postsynaptiques, ils induisent des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) dans l'élément postsynaptique (**Figure 4**). La sommation des PPSE permet d'atteindre la valeur seuil du potentiel nécessaire à l'ouverture des canaux sodiques potentiel-dépendants et donc à la génération des PA au niveau du segment initial de l'axone (Rasband, 2010). Le neurone reçoit également des potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSI). C'est donc la sommation à la fois des PPSE et des PPSI qui doit atteindre la valeur seuil (environ -40mV) permettant l'ouverture des canaux sodiques potentiel-dépendants, le neurone génère des PA au niveau du SIA.

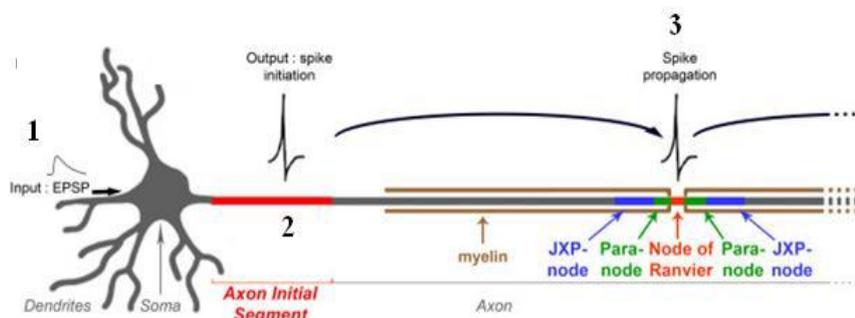


Figure 4. Représentation schématique d'un neurone. 1- les PPSE provenant du compartiment somatodendritique dépolarisent le neurone 2- les canaux sodiques potentiel-dépendants s'ouvrent, dépolarisent fortement les cellules et génèrent des PA 3-les PA se propagent le long de l'axone au niveau des nœuds de Ranvier (conduction saltatoire) Modifié d'après (Duflocq et coll., 2011).

2. Les canaux sodiques potentiel-dépendants

2.1 Structure-Fonction

En 1984, Hartshorne et Catterall purifient le canal sodium à partir du cerveau du rat. Ils identifient une sous-unité α de 260kDa et deux sous-unités β de 39kDa (β 1) et 37kDa (β 2) (Hartshorne and Catterall, 1984).

Par la suite, Noda et coll clonent et séquencent la structure d'ADN codant pour le canal sodique à partir de l'anguille électrique *Electrophorus electricus*. La sous-unité α des canaux sodiques est composée de 1820 acides aminés, formant 4 domaines transmembranaires homologues (DI à DIV). Chaque domaine est constitué de 6 segments transmembranaires organisés en hélice alpha (S1 à S6), connectés les uns aux autres par des boucles intra- et extracellulaires (**Figure 5**) (Noda et coll., 1984).

Les segments S1 à S3 sont hydrophobes et contiennent plusieurs résidus chargés. Les segments S4 jouent le rôle de senseur de potentiel et contiennent un résidu chargé positivement (principalement arginine R) toutes les 3 positions. Les segments S5 et S6 ainsi que la boucle extracellulaire réentrant P qui les relie constituent le pore du canal au centre des 4 domaines. Les segments S5 et S6 sont hydrophobes et ne contiennent pas de résidus chargés. Enfin la boucle intracellulaire reliant les segments S6 et S1 des domaines III et IV joue le rôle de « porte » d'inactivation du canal (Catterall, 2000).

Bien qu'elle soit associée à une ou deux protéines accessoires β jouant un rôle dans la modulation, la sous-unité α est suffisante pour la fonction des canaux sodiques.

Le pore du canal ou filtre sélectif

L'existence d'un pore perméable aux ions sodium a été mise en évidence grâce à des expériences de voltage-clamp et de mutagénèse dirigée ayant pour but d'étudier l'effet de neurotoxines, telles que la tétrodotoxine (TTX) et la saxitoxine (STX), sur la fonction des canaux sodiques potentiel-dépendants. La première étude montre que le remplacement d'un résidu d'acide glutamique, chargé négativement, en glutamine en position 387 (E387Q) de la sous-unité α -II du rat rend le canal insensible à la TTX et la STX et diminue sa conductance (Noda et coll., 1989).

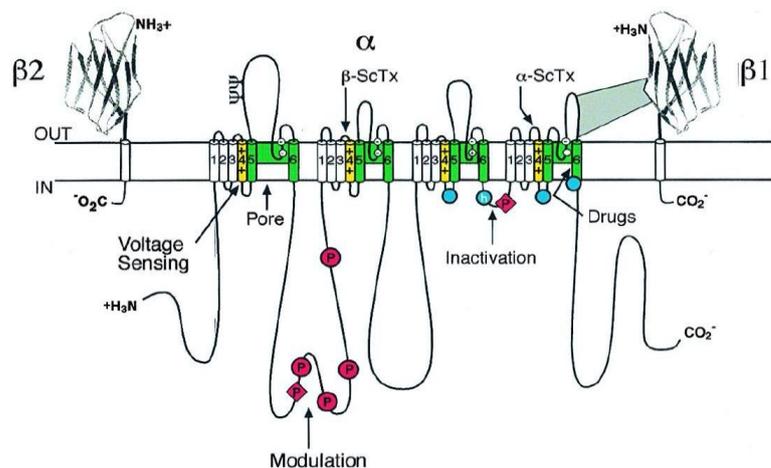


Figure 5. Les structures primaires des sous-unités des canaux sodiques potentiel-dépendants

Les cylindres représentent les segments α -hélicoïdaux transmembranaires reliés par les boucles intra- et extracellulaires. Les segments S4 sont les senseurs de potentiel (en jaune) et les segments S5 et S6 forment le pore du canal (vert) avec la boucle extracellulaire réentrante qui les relie. La boucle d'inactivation se situe au niveau de la boucle intracellulaire reliant DIII à DIV (cercle bleu h). Les sites impliqués dans la formation du récepteur de la porte d'inactivation sont représentés par des cercles bleus. Les motifs Ψ représentent les sites de N-glycosylation et les lettres P dans les cercles rouges représentent les sites de phosphorylation par les protéines kinases PKA (cercles) et PKC (diamants) ; les cercles blancs représentent les anneaux externe (EEDD) et interne (DEKA) des résidus formant le filtre de sélectivité ionique et le site de liaison de la tétrodontoxine. Les domaines extracellulaires des sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ sont représentés sous forme de plis de type immunoglobuline. Les sites de liaison des toxines de scorpions α et β et un site d'interaction entre les sous-unités α et $\beta 1$ sont également indiqués (Catterall, 2000).

La seconde étude démontre que le remplacement d'un résidu d'acide aspartique, chargé négativement, en asparagine en position 384 (D384N) élimine la quasi-totalité du courant sodium sans affecter la dépendance au potentiel nécessaire pour activer le canal sodique. Par conséquent, les auteurs concluent que ces résidus sont localisés au niveau du pore du canal (Pusch et coll., 1991).

Par la suite, des résidus chargés négativement pour la plupart sont identifiés sur chacun des 4 domaines du canal sodique à une position analogue. Ils forment des anneaux internes et externes, respectivement DEKA et EEDD, qui jouent le rôle de filtre sélectif aux ions sodium (Terlau et coll., 1991). L'anneau interne est formé par les résidus D384, E942, K1422 et A1714 et l'anneau externe, est formé par les résidus E387, E945, D1426 et D1717 (positions des résidus au niveau de la sous-unité α -II du rat).

L'analyse de la structure détaillée du complexe formé par la sous-unité α -II humaine et la sous-unité accessoire $\beta 1$ grâce à la cryo- microscopie électronique (Cryo-EM) montre que l'anneau interne de la sous-unité α -humaine est formé par les résidus D406, E761, K1244 et A1536, et l'anneau externe est formé par les résidus E409, E764, D1248 et D1539. Les résidus E764 (DII) et D1248 (DIII) sont alignés au-dessus des résidus E761 (DII) et K1244

(DIII) tandis que les résidus E409 (DI) et D1539 (IV) sont décalés d'environ 120°. Cette disposition spatiale crée une asymétrie supplémentaire à l'entrée du pore. La surface électronégative des boucles extracellulaires et de la partie externe du pore peut attirer les cations et repousser les anions. Une fois que les cations sont attirés vers la partie externe du pore, ils sont probablement conduits vers le site DEE en raison de l'attraction électrostatique. Le site DEE est formé par les groupes carboxylates des résidus D406 (DI), E761 (DII) et E764 (DII) qui se regroupent et constituent un site hautement électronégatif (Pan et coll., 2018).

Les segments S4 : senseur de potentiel et activation des canaux Na_v

Chacun des 4 domaines constituant le canal sodique possède un segment S4 transmembranaire hélicoïdal contenant des résidus chargés positivement et neutralisés par des résidus chargés négativement provenant des segments S2 et S3. Les charges positives du segment S4 sont principalement des résidus arginine (R) et il y en a entre 4 et 7 par segment (**Figure 6**). En réponse à une dépolarisation, les résidus chargés positivement situés sur les segments S4 se déplacent à travers la membrane vers le milieu extracellulaire selon le modèle de la « sliding helix » (Catterall, 1986) ou « crew helix » (Guy and Seetharamulu, 1986).

L'implication des segments S4 dans le processus d'activation a été confirmée avec des expériences de mutagenèse dirigée et de patch-clamp sur des oocytes de Xénope. Le remplacement d'un résidu arginine ou lysine par un résidu glutamine au niveau du S4 de DI altère la dépendance au voltage de l'activation du canal (Stuhmer et coll., 1989). L'effet est plus important lorsque deux mutations sont combinées sur un même segment S4.

De plus, en se liant à la boucle extracellulaire reliant le S3 au S4 de DII, la toxine CssIV issue du venin de scorpion *Centruroides suffusus suffusus* du Mexique entraîne un déplacement de la courbe d'activation vers des potentiels plus hyperpolarisés (Cestele et coll., 1998).

L'analyse structurale du canal sodique bactérien NavAb *Arcobacter butzleri* a permis d'identifier trois charges sur le segment S4, R1 à R3, exposées à la solution externe et interagissant avec des chaînes latérales d'acides aminés chargées négativement et hydrophiles situées au niveau des segments S1 à S3 (cluster négatif extracellulaire ou ENC). La quatrième charge R4 interagit avec les chaînes latérales d'acides aminés chargées négativement dans le cluster négatif intracellulaire (INC). Entre les 3^{ème} et 4^{ème} charges du segment S4, le site de constriction hydrophobe (HCS) hautement conservé bloque le passage de l'eau et des ions.

Dans le contexte du modèle de la « sliding helix », le segment S4 est supposé se déplacer dans le HCS en réponse aux changements de potentiel, transférer ses charges (R1 à R4) à travers le champ électrique transmembranaire et échanger des partenaires de paires d'ions entre le cluster négatif intracellulaire et le cluster négatif extracellulaire (Catterall and Zheng, 2015).

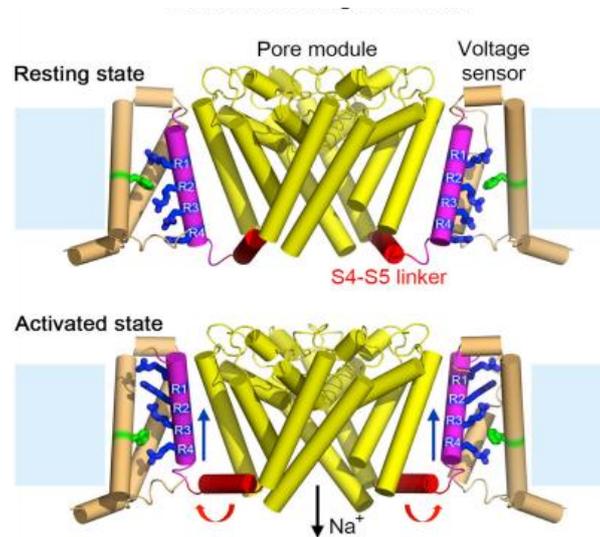


Figure 6. Structure cryo-EM du canal NavAb au repos. Le segment S4 est dessiné de manière intracellulaire, avec trois résidus chargés positivement passant à travers le champ électrique transmembranaire. Ce mouvement forme un coude au niveau de la boucle reliant les segments S4 et S5 et resserre le collier autour de la porte d'activation S6 empêchant son ouverture (Wisedchaisri et coll., 2019).

Plus récemment, la cryo- microscopie électronique (Cryo-EM) a permis d'étudier en détail la structure et le mécanisme d'activation du canal Na_vAb (**Figure 6**).

A l'état de repos, le senseur au potentiel se constitue d'une fente aqueuse extracellulaire se formant entre les hélices α des segments S1-S2 et S3-S4 (conformation en épingle à cheveux). L'hélice α du segment S4 est principalement tournée vers l'intérieur le long de son axe principal par rapport à la conformation activée, tandis que les hélices S1 et S2 conservent la même configuration dans les deux états (repos ou activé). En revanche, l'hélice α du segment S3 s'incline légèrement vers le segment S4 et la boucle reliant S3 et S4 est plus courte car la partie C-terminale de la boucle a changé conformation pour devenir le segment N-terminal de S4. Ce changement de conformation rétrécit la fente aqueuse extracellulaire et permet une translocation vers l'intérieur des charges du segment S4. Le segment S4 s'étend donc dans le cytoplasme et pour le relier au segment S5, la boucle intracellulaire remonte vers la membrane en adoptant une conformation angulaire qui prend la forme d'un «coude». Ces réarrangements resserrent le collier (boucles S4-S5 des 4 domaines) autour des segments S5 et

S6 et empêche l'ouverture du pore. La conformation en forme de « coude » de la boucle intracellulaire reliant S4 à S5 est à la fois essentielle pour stabiliser la conformation fermée du pore et pour déclencher son ouverture. En réponse à une dépolarisation, le segment S4 se déplace vers l'extérieur et tire le « coude » formé par la boucle extracellulaire vers l'intérieur de la membrane (**Figure 6**). Ainsi, le collier formé autour des segments S5 et S6 se desserre et le pore s'ouvre (Wisedchaisri et coll., 2019).

L'inactivation rapide

En réponse à une dépolarisation, le canal sodique s'active ce qui permet l'entrée d'ions sodium dans la cellule et donc la génération de potentiels d'action. Quelques millisecondes plus tard (1 à 2ms) le canal s'inactive, les ions sodium ne peuvent plus entrer à l'intérieur de la cellule évitant ainsi la génération de décharges répétitives (Hodgkin and Huxley, 1952). En 1988, le groupe de WA Catterall montre, en utilisant des anticorps dirigés contre différents peptides de la sous-unité α , que la boucle intracellulaire reliant le segment S6 de DIII au segment S1 de DIV est directement impliquée dans le processus d'inactivation rapide (Vassilev et coll., 1988). Ce résultat a été confirmé par la délétion de cette boucle intracellulaire qui a pour conséquence de réduire de manière drastique l'inactivation du canal (Stuhmer et coll., 1989). Les années suivantes, de nombreuses études visant à étudier les caractéristiques de l'inactivation rapide ont montré, grâce à des expériences de mutagenèse dirigée et de patch clamp, que 3 acides aminés hydrophobes jouent un rôle crucial dans ce processus : un résidu isoleucine en position 1488, un résidu phénylalanine en position 1489 et un résidu méthionine en position 1490. Ils constituent le motif IFM indispensable au maintien de la « porte » d'inactivation en position fermée (West et coll., 1992) (Eaholtz et coll., 1994) (Kellenberger et coll., 1997).

Le mécanisme d'inactivation rapide fonctionne selon une porte d'inactivation qui se fixe à un récepteur formé par plusieurs régions du canal pour obstruer le pore (**Figure 7**). Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier plusieurs résidus impliqués dans ce mécanisme. En 1997, Smith et Goldin montrent que la phénylalanine de la boucle d'inactivation (IMF) interagit avec une alanine en position 1329 de la sous-unité α -II du rat, située au niveau de la boucle intracellulaire reliant les segments S4 et S5 de DIII (Smith and Goldin, 1997). Il a été montré que pendant l'inactivation des canaux à l'état fermé, le motif IFM de la porte d'inactivation interagit avec un résidu phénylalanine en position 1651 et/ou

avec un résidu leucine, en position 1660 de la sous-unité α -II du rat, situés au niveau de la boucle intracellulaire reliant les segments S4 et S5 de DIV.

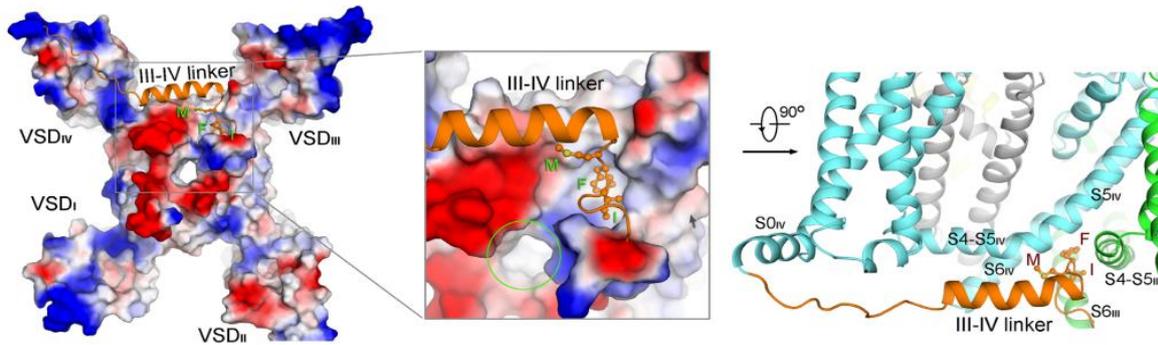


Figure 7. Mécanisme d'inactivation du canal $\text{Na}_v1.4$. Le motif IFM de la porte d'inactivation rapide s'insère dans une cavité hydrophobe fermée par les segments S5 et S6 des domaines III et IV. Une vue intracellulaire montre la cavité hydrophobe et le pore, indiqué par un cercle vert. Le résidu phénylalanine en position 1311 s'insère profondément dans la cavité tandis que les résidus isoleucine et méthionine en position 1310 et 1312 renforcent l'interaction en se liant aux bords de la cavité (Pan et coll., 2018).

Le résidu phénylalanine en position 1764 ainsi que le résidu valine en position 1774 situés dans le segment S6 du domaine IV jouent également un rôle important dans l'inactivation rapide du canal mais sans interagir directement avec le motif IMF comme c'est le cas pour les résidus décrits A1329, F1651 et L1660 (McPhee et coll., 1995).

Le mécanisme se précise grâce à la spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire) réalisée sur la « porte » d'inactivation isolée de la sous-unité α du rat et qui permet de visualiser sa structure avec une haute résolution (Rohl et coll., 1999). Ces études montrent que la boucle intracellulaire reliant le segment S6 de DIII au segment S1 de DIV est une structure stable en hélice α qui contient des résidus fonctionnellement impliqués dans l'inactivation. Les régions autour de la structure servent de charnières pour la porte d'inactivation. Le résidu phénylalanine en position 1489 est positionné de façon à interagir directement avec le pore et le résidu méthionine en position 1490 permettrait de positionner correctement la surface d'interaction de la « porte » lui permettant de se lier au pore. Ces deux résidus jouent donc un rôle crucial dans le blocage du pore, de manière directe (Phe 1489) ou indirecte (Met 1490). Le résidu isoleucine en position 1488 semble jouer un rôle en périphérie où il pourrait contribuer à l'environnement hydrophobe de la surface d'interaction. Enfin, un résidu thréonine en position 1491 s'ajoute au motif IMF permettant ainsi d'avoir une structure plus

précise du motif de verrouillage de la « porte » d'inactivation. Ces études ont été réalisées à partir de la sous-unité α du rat.

En 2018, Pan et coll utilisent la cryo- microscopie électronique (Cryo-EM) pour étudier la structure détaillée du complexe formé par la sous-unité α -IV humaine et la sous-unité accessoire β 1 (Pan et coll., 2018).

Une cavité hydrophobique est formée par 1/la boucle intracellulaire reliant S4 à S5 de DIII et DIV 2/ les segments S6 de DIII et DIV et 3/le segment S5 de DIV. En ce qui concerne le motif IMF, le résidu phénylalanine en position 1311 s'insère en profondeur dans cette cavité et les résidus isoleucine et méthionine, en position 1310 et 1312 respectivement, renforcent l'interaction aux bords de la cavité hydrophobique (**Figure 7**). Le résidu phénylalanine joue donc le rôle principal dans cette « porte » d'inactivation confirmant ainsi les données obtenues par le groupe de Catterall en 1992 qui montraient que la substitution du résidu phénylalanine par un résidu glutamine suffit à supprimer complètement l'inactivation contrairement aux substitutions des résidus méthionine et isoleucine qui ont pour conséquence ralentir l'inactivation et non de la supprimer (West et coll., 1992).

Le segment S4 du domaine IV joue un rôle important dans le processus d'inactivation rapide. Par exemple, la substitution d'un résidu arginine par un résidu cystéine ou histidine en position 1448 (S4 de DIV) de la sous-unité α humaine exprimée au niveau du muscle squelettique (hNav_v1.4) ralentit le développement et accélère la récupération de l'inactivation rapide du canal suggérant ainsi un rôle crucial du S4 de DIV dans le couplage entre l'activation et l'inactivation du canal sodique (Chahine et coll., 1994). En 2013, Capes et coll montrent que le mouvement du senseur au potentiel de DIV détermine la vitesse du développement et de la récupération de l'inactivation rapide. La substitution de 3 résidus arginine en glutamine du segment S4 de DIV altère à la fois la cinétique et la dépendance au voltage du développement ainsi que la cinétique de récupération de l'inactivation. En revanche, la substitution des mêmes résidus au niveau des domaines I à III n'altère que très peu la dépendance au potentiel de l'inactivation suggérant ainsi que l'activation du segment S4 seul est suffisante pour que l'inactivation rapide se produise. L'activation du segment S4 précède l'ouverture du pore, ce qui signifie qu'elle représente le mécanisme d'inactivation du canal à l'état fermé (Capes et coll., 2013).

L'inactivation lente

L'inactivation lente se développe pendant les trains de potentiels d'action qui durent des centaines de millisecondes. Des études de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier plusieurs régions de la sous-unité α impliquées dans ce mécanisme.

La substitution d'un résidu valine en isoleucine en position 754 (V754I) du canal $\text{Na}_v1.4$ humain ou en position 891 du canal $\text{Na}_v1.5$ humain altère la dépendance au potentiel de l'inactivation lente des canaux. Les résidus V754 et V891 sont localisés au niveau de la boucle intracellulaire rééminente (pore) reliant les segments S5 à S6 de DII suggérant ainsi un rôle important de cette boucle dans le contrôle de l'inactivation lente (Vilin et coll., 2001).

La substitution d'un résidu thréonine en méthionine en position 698 du canal $\text{Na}_v1.4$ du rat conduit à un déplacement de la courbe d'inactivation lente vers des potentiels plus dépolarisés (Cummins and Sigworth, 1996). Cette mutation correspond à la mutation humaine T704M située sur le S5 de DII et retrouvée chez un patient atteint de paralysie périodique hyperkaliémique (HYPP). L'HYPP est une canalopathie caractérisée par des accès de faiblesse musculaire associés à une concentration sanguine augmentée du potassium (hyperkaliémie). L'altération de l'inactivation lente pourrait accentuer la dépolarisation des membranes musculaires et la paralysie (Hayward et coll., 1997). Ces résultats indiquent que le segment S5 de DII joue un rôle important dans l'inactivation lente.

Le segment S4 de DII joue également un rôle dans l'inactivation lente. En effet, il a été montré, à partir d'enregistrements électrophysiologiques d'oocytes de Xénope, que la mutation K859Q localisée au niveau du segment S4 de DII ralentit le développement de l'inactivation lente du canal $\text{Na}_v1.2$ du rat (Fleig et coll., 1994).

En 2012, Payandeh et coll étudient la structure cristallographique du canal NavAb et montrent que l'inactivation lente du canal entraîne des réarrangements importants des hélices α des S6 tapissant les pores. Les 2 paires de segments S6 se sont déplacées. L'une s'est déplacée au centre du pore et l'autre vers l'extérieur. La partie intracellulaire du pore subit également des réarrangements. Ils conduisent à une asymétrie structurale globale plaçant le filtre de sélectivité ionique à l'extrémité extracellulaire du pore (Payandeh et coll., 2012).

2.2 Les différents isoformes Nav1.1-Nav1.9

Il existe 9 gènes différents codant pour les 9 isoformes de la sous-unité α des canaux sodiques dépendants du potentiel. Les gènes *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A* et *SCN8A* codent respectivement pour les canaux $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ et $\text{Na}_v1.6$ qui représentent les canaux sodiques

exprimés au niveau du système nerveux central. Le gène *SCN4A* code pour le canal $\text{Na}_v1.4$ exprimé au niveau du muscle squelettique et le gène *SCN5A* code pour le canal cardiaque $\text{Na}_v1.5$.

Enfin, les gènes *SCN9A*, *SCN10A* et *SCN11A* codent respectivement pour les canaux $\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$ et $\text{Na}_v1.9$ exprimés au niveau du système nerveux périphérique et impliqués dans la physiopathologie de la douleur (Goldin et coll., 2000).

Les canaux $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.6$ et $\text{Na}_v1.7$ sont sensibles à la TTX et ont une cinétique d'inactivation rapide tandis que les canaux $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.8$ et $\text{Na}_v1.9$ sont résistants à la TTX et ont une cinétique d'inactivation lente (Goldin, 2001).

Les canaux $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ et $\text{Na}_v1.7$ ont une séquence d'acides aminés identiques à environ 90% (**Figure 8**). Les gènes codant pour ces 4 canaux sont situés au niveau du chromosome 2 (locus 2q23-24), ce qui suggère une origine évolutive commune. Ces canaux ont une homologie de séquence de 84% avec les canaux $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.6$ et de 64% avec les canaux $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.8$ et $\text{Na}_v1.9$ (Catterall et coll., 2005).

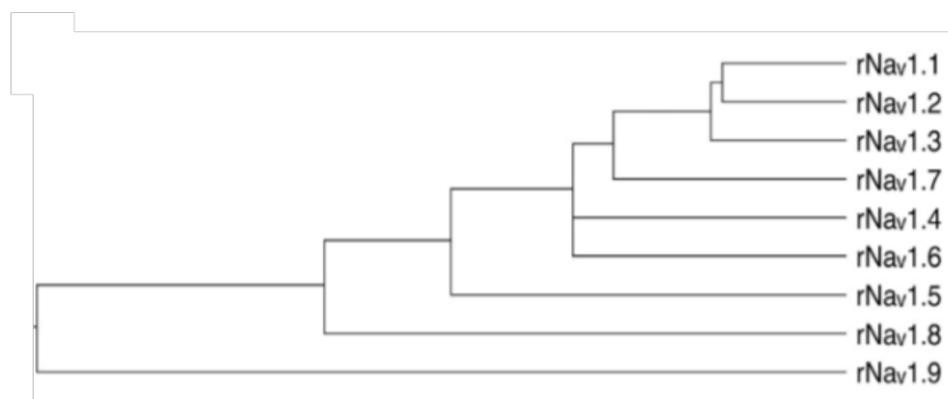


Figure 8. Comparaison de l'identité des acides aminés pour les canaux sodiques de rat $\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$. La comparaison a été effectuée avec Megalign dans le programme DNASTar (en utilisant la méthode Clustal) pour les quatre domaines et la boucle cytoplasmique reliant les domaines III et IV (Catterall et coll., 2005).

2.3 Les sous-unités auxiliaires β

Les canaux sodiques potentiel-dépendants sont associés à au moins deux sous-unités accessoires β . Ce sont des glycoprotéines de 30 à 40 kDa environ, constituées d'un seul segment transmembranaire d'une extrémité N-terminale extracellulaire possédant un domaine immunoglobuline-like et d'une extrémité C-terminale intracellulaire. Il existe 4 sous-unités β différentes, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ et $\beta 4$ codées respectivement par les gènes *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B* et *SCN4B* (Isom, 2001) (Brackenbury and Isom, 2011). La sous-unité $\beta 1$ possède deux isoformes, $\beta 1$ et $\beta 1b$. Les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ sont liées de manière non covalente à la sous-unité α tandis que les sous-unités $\beta 2$ et $\beta 4$ sont liées de manière covalente par des ponts disulfures.

Ces différentes sous-unités ont plusieurs rôles : 1/ elles modulent les propriétés électrophysiologiques et l'expression à la surface cellulaire des sous-unités α et 2/ elles jouent le rôle de molécules d'adhésion en interagissant avec la matrice extracellulaire et le cytosquelette.

Implication des sous-unités β dans la modulation des sous-unités α

La première étude mettant en évidence le rôle des sous-unités β dans la modulation des propriétés biophysiques des canaux sodiques potentiel-dépendants a été réalisée à partir d'oocytes de Xénope exprimant à la fois le canal $Na_v1.2$ de rat et la sous-unité $\beta 1$ (Isom et coll., 1992). La présence de cette dernière conduit à 1/ une augmentation du pic de courant sodium 2/ une accélération de l'inactivation, avec un courant inactivé à 90% au lieu de 50% après 10ms et 3/ un déplacement de la courbe d'inactivation qui se met en place à des potentiels plus hyperpolarisés. Le même groupe montre ensuite que la sous-unité $\beta 1$ augmente aussi l'expression des canaux $Na_v1.2$ à la surface cellulaire des oocytes et que cet effet est amplifié lorsque la sous-unité $\beta 2$ est co-exprimée avec la $\beta 1$ (Isom et coll., 1995). Les sous-unités $\beta 3$ et $\beta 4$ jouent également un rôle dans la modulation des sous-unités α .

En effet, la présence de la sous-unité $\beta 4$ dans des cellules tsA-201 transfectées avec soit le canal $Na_v1.2$ soit le canal $Na_v1.4$ entraîne un déplacement de la courbe d'activation des canaux vers des potentiels plus hyperpolarisés (Yu et coll., 2003). De plus, il a été montré que la co-expression des sous-unités $\beta 1$ ou $\beta 3$ avec le canal $Na_v1.7$ dans des cellules HEK293, conduit à la fois à une augmentation de la densité de courant des canaux $Na_v1.7$ mais aussi à une modification des propriétés biophysiques du canal. Les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ entraînent un déplacement de la courbe d'inactivation du canal vers des potentiels plus dépolarisés. La

sous-unité $\beta 3$ induit également un déplacement de la courbe d'activation vers des potentiels plus hyperpolarisés (Laedermann et coll., 2013).

L'utilisation de modèles de souris délétées pour un des gènes codant une sous-unité β a permis de révéler la fonction des sous-unités β *in vivo*. L'étude de la souris *SCN1B*^{-/-} dépourvue de la sous-unité $\beta 1$ et de son isoforme $\beta 1b$ est un modèle d'encéphalopathie épileptique infantile appelée syndrome de Dravet (voir pathologies associées aux mutations du gène *SCN1A*). Il a été montré que, chez ces souris *SCN1B*^{-/-}, le niveau d'expression des canaux $Na_v1.1$ diminue et que celui des canaux $Na_v1.3$ augmente (Chen et coll., 2004). De plus, des enregistrements sur tranches de neurones d'hippocampe et du cortex révèlent une hyperexcitabilité neuronale accompagnée d'une activité épileptiforme (Patino et coll., 2009). L'ensemble de ces résultats suggère une altération des niveaux d'expression des canaux sodiques potentiel-dépendants chez les souris dépourvues de la sous-unité $\beta 1$ confirmant ainsi son rôle dans la modulation de ces canaux.

Des études sur des modèles de souris *SCN2B*^{-/-} et *SCN4B*^{-/-} ont aussi montré que l'absence de la sous-unité $\beta 2$ ou $\beta 4$ suffisait à altérer la fonction des canaux sodiques et donc le maintien de l'excitabilité neuronale (Chen et coll., 2002) (Miyazaki et coll., 2014).

Les sous-unités β jouent aussi un rôle important dans la régulation de l'excitabilité cardiaque. Par exemple dans les cardiomyocytes isolés à partir du cœur des souris *SCN1B*^{-/-}, le niveau d'expression des canaux $Na_v1.5$ est augmenté et les courants sodiques transitoires et persistants sont 1.6 fois plus importants que ceux enregistrés dans les cardiomyocytes de souris contrôles. De plus, la repolarisation des PA générés par ces cardiomyocytes dépourvus de $\beta 1$ est plus lente, ce qui conduit à un intervalle QT plus long. Sur un électrocardiogramme, l'intervalle QT représente la durée entre le début de l'onde QRS et la fin de l'onde T qui correspondent respectivement à la dépolarisation et à la repolarisation des ventricules. L'allongement de cet intervalle est caractéristique du syndrome du QT long qui est une maladie cardiaque associée des arythmies ventriculaires pouvant conduire dans certains cas à une syncope ou une mort subite (Lopez-Santiago et coll., 2007).

Des molécules d'adhésion cellulaire...

Les sous-unités β se composent d'un unique segment transmembranaire avec un motif immunoglobuline-like en N-terminale ce qui les rend structurellement et fonctionnellement homologues aux molécules d'adhésion cellulaire, CAMs, de la famille des immunoglobulines. Ainsi les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ interagissent avec les ténascines R et C, des protéines de la

matrice extracellulaire secrétées par les oligodendrocytes, et l'ankyrine G qui est une protéine cytoplasmique permettant l'ancrage de protéines membranaires (Srinivasan et coll., 1998) (Malhotra et coll., 2002). Ce rôle des sous-unités β peut être important pour la localisation dense des canaux sodiques, au niveau du SIA et des nœuds de Ranvier, indispensable pour initier et propager les PA dans le neurone.

2.4 Trafic cellulaire des canaux sodiques potentiel-dépendants

Adressage à la surface

La traduction de l'ARNm codant les canaux ioniques commence dans le ribosome où le peptide naissant expose des séquences d'acides aminés spécifiques qui lui permettent d'être adressé au réticulum endoplasmique (RE) où la protéine est synthétisée. Le RE représente le point de contrôle des protéines mal repliées. Ces dernières sont soit dégradées par le protéasome soit retenues dans le RE en attendant d'être correctement repliées grâce à l'intervention de chaperonnes moléculaires. Après leur passage dans le RE, les canaux sont délivrés au Golgi via des vésicules spécifiques où ils poursuivent leur maturation avant l'étape finale qui est l'adressage à la surface cellulaire (**Figure 9**) (Terragni et coll., 2018).

Les modifications post-traductionnelles telles que les phosphorylations et les N-glycosylations jouent un rôle important dans cette dernière étape de maturation et d'adressage des canaux à la surface de la cellule. Par exemple, des études sur les canaux sodiques ont montré que la phosphorylation par les protéines kinases A et C (PKA et PKC) augmente le trafic à la surface cellulaire des canaux Nav1.2 mais diminue celui des canaux Nav1.5 (Onwuli and Beltran-Alvarez, 2016). On peut également citer l'exemple des canaux potassiques Kv1.4 qui sont adressés à la surface cellulaire en fonction de leur degré de glycosylation (Watanabe et coll., 2015).

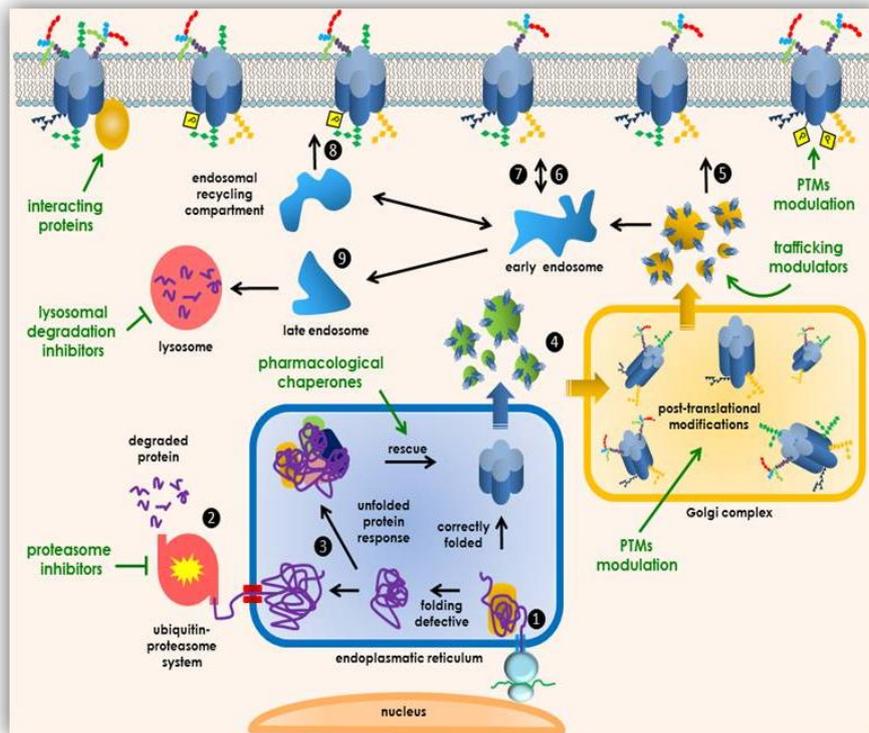


Figure 9. Voies de maturation des canaux ioniques. Les canaux ioniques naissants sont ciblés vers le RE (1) où se déroule le premier contrôle qualité. Les canaux mal repliés peuvent être dégradés par le protéasome (2) ou retenus dans le RE en attendant d’être correctement repliés grâce aux chaperonnes moléculaire (3). Les canaux correctement repliés sont exportés vers le complexe de Golgi pour leur maturation finale (4), puis ils sont acheminés vers la membrane plasmique par des vésicules de transport (5). Le niveau d’expression de surface des canaux ioniques est régulé par leur internalisation dans les endosomes précoces (6) et un recyclage rapide (7) ou lent, impliquant un compartiment de recyclage endosomal (8). Les canaux peuvent aussi être dégradés par les lysosomes (9) (Terragni et coll., 2018).

Adressage au SIA

Dans les neurones de mammifères, l’initiation du PA est assurée par l’accumulation dense et précise des canaux Na_v au SIA. Le groupe de Bénédicte Dargent a mené de nombreuses études visant à éclaircir l’ensemble des mécanismes d’adressage de ces canaux au SIA.

La sous-couche de la membrane plasmique est composée d’un complexe d’échafaudage ankyrine – spectrine qui définit l’identité et les fonctions du SIA (**Figure 10**). La famille des ankyrines est composée de trois gènes codant pour l’ankyrine R (ankR), d’abord identifiée dans les érythrocytes), l’ankyrine B (ankB, localisée dans le cerveau), et l’ankyrine G (ankG). Il existe des isoformes courts de l’ankG qui sont ubiquitaires et deux isoformes longs de 270 et 480 kDa qui sont trouvés uniquement dans les neurones, au niveau du SIA et des nœuds de Ranvier (Leterrier and Dargent, 2014).

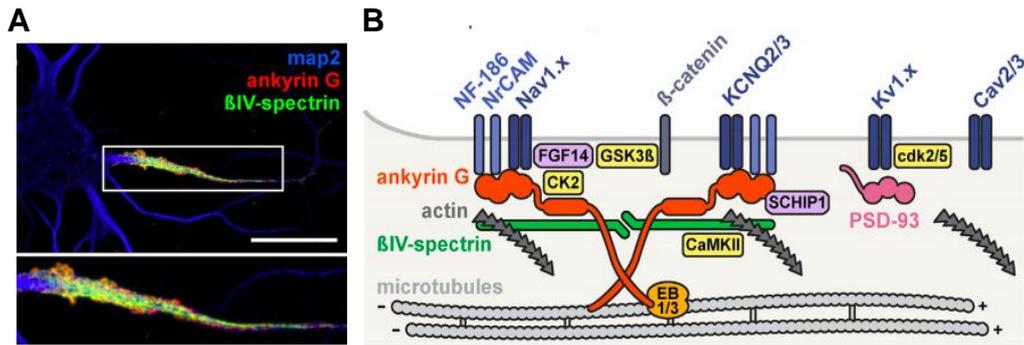


Figure 10. Le segment initial de l'axone . A/ SIA d'un neurone hippocampique en culture. L'ankyrine G (rouge) et la β IV-spectrine (vert) marque le SIA. MAP2 (bleu) marque le compartiment somatodendritique. Echelle 20 μ m. B/ Les composants de SIA. La protéine échafaudage principale du SIA est l'ankG (orange), lié à la spectrine IV (verte) qui à son tour se lie aux filaments d'actine (gris foncé). AnkG se lie aux canaux sodiques Na_v et potassiques $K_v7.2 / 7.3$ (bleu foncé), ainsi qu'aux protéines d'adhésion NF-186 et NrCAM (bleu). Les protéines EB1 / 3 (orange clair) relient l'ankG aux microtubules (Leterrier and Dargent, 2014).

Les canaux sodiques Na_v sont recrutés au SIA suite à l'apparition de l'ankyrine G (AnkG).

Les canaux Na_v possèdent un domaine de liaison à l'ankyrine G présent au niveau de la boucle cytoplasmique intracellulaire reliant les domaines DII et DIII (Garrido et coll., 2003). Cette boucle contient également une séquence d'internalisation de membrane qui élimine les canaux sodiques des compartiments autres que le SIA, renforçant ainsi la localisation spécifique des canaux au niveau des zones contenant l'ankyrine G (Fache et coll., 2004). Le site de liaison de l'AnkG localisé au niveau de la boucle DII-DIII des canaux Na_v permet aussi la liaison à l'ankyrine B qui est présente sur toute la longueur de l'axone et qui n'est donc pas spécifique du SIA. La localisation des canaux au SIA spécifiquement fait donc intervenir la protéine kinase CK2 spécifique du SIA et qui phosphoryle des résidus spécifiques situés au niveau de la boucle DII-DIII des canaux Nav. Le blocage de l'activité de CK2 perturbe la localisation du canal Na_v au SIA, suggérant ainsi que la phosphorylation joue un rôle important pour l'interaction des canaux Na_v avec l'AnkG (Brachet et coll., 2008). Dans les neurones d'hippocampe immatures de rat (4 jours *in vitro*), les canaux ioniques sont immobilisés par l'ankyrine G au SIA suggérant ainsi un rôle prépondérant de la protéine ankyrine G dans l'immobilisation des canaux très tôt au cours du développement. Cette immobilisation est régulée par la protéine kinase CK2 et pourrait permettre d'ajuster le niveau d'excitabilité du neurone (Brachet et coll., 2010).

2.5 La dimérisation des canaux sodiques potentiel-dépendants

Interaction α - α

Récemment, il a été montré que les canaux sodiques potentiel-dépendants peuvent s'assembler et former des dimères (Clatot et coll., 2017). En effet, en utilisant la technique du SiMPull, la dimérisation de 2 sous unités α des canaux sodiques a pu être mise *in vitro* (**Figure 11**). La technique du SiMPull pour *Single Molecule Pull-down* combine les principes de l'analyse pull-down classique avec la microscopie à fluorescence pour une molécule unique. A partir de lysat cellulaire, elle permet de visualiser des complexes de protéines cellulaires individuelles et peut ainsi révéler combien de protéines et quels types sont présents dans le complexe (Jain et coll., 2011).

Dans cette même étude, les auteurs montrent que cette dimérisation α - α se fait par l'intermédiaire de la protéine 14.3.3 (**Figure 12**). Les protéines 14.3.3 sont des protéines d'environ 30kDa conservées chez tous les eucaryotes. Elles sont exprimées de façon ubiquitaire et sont localisées au niveau du noyau, du cytoplasme, de l'appareil de Golgi et de la membrane. En se liant à diverses protéines, elles peuvent moduler leur activité, leur capacité d'interaction avec d'autres protéines ainsi que leur distribution. Cette liaison se fait sur des résidus phosphorylés sérine ou thréonine (Xiao et coll., 1995) (Mackintosh, 2004). La protéine 14.3.3 permet non seulement de relier les canaux entre eux à deux endroits différents sur leur chaîne polypeptidique, mais aussi de permettre une interaction directe des canaux entre eux.

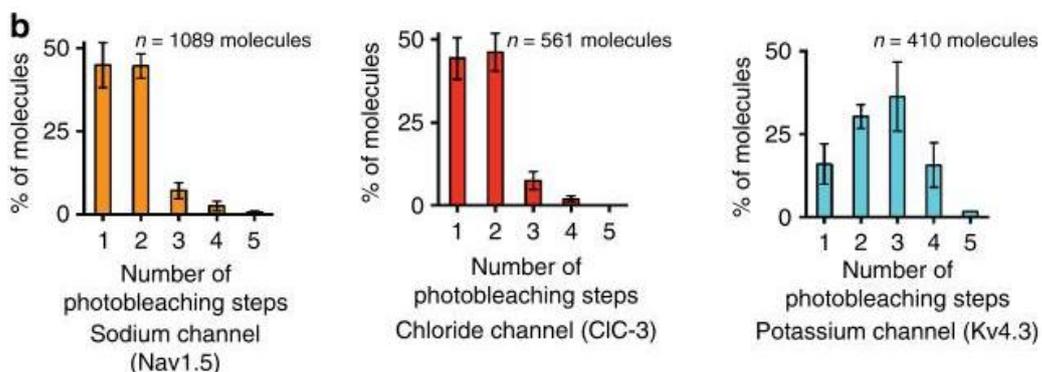


Figure 11. Etapes de photoblanchiment de la GFP observées par des expériences SiMPull pour le canal sodique GFP-Nav_v1.5, le canal chlorure ClC-3-GFP connu pour former des dimères et le canal potassium K_v4.3-GFP connu pour former des tétramères. Le nombre de molécules analysées (n) pour chaque canal est indiqué au-dessus de chaque graphique. Les canaux sodium et chlorure présentent tous deux une distribution de deux étapes de photoblanchiment comme on pourrait s'y attendre pour une protéine dimère alors qu'une distribution de quatre étapes de photoblanchiment a été observée pour le canal potassique tétramérique (Clatot et coll., 2017).

L'étude de Clatot et coll. a mis en évidence que l'interaction des sous-unités α des canaux sodiques peut être inhibée de différentes façons. Tout d'abord, il est possible d'agir directement sur la protéine 14.3.3 en la bloquant avec la difopéine. L'interaction entre 2 sous-unités α peut également être inhibée en insérant une mutation au niveau du site récepteur de la protéine 14.3.3 sur les canaux, ce qui va empêcher sa fixation. Cette mutation consiste à remplacer un résidu sérine en alanine en position 460 (position pour le canal $\text{Na}_v1.5$), au niveau de la boucle cytoplasmique reliant les domaines DI et DII (**Figure 12**).

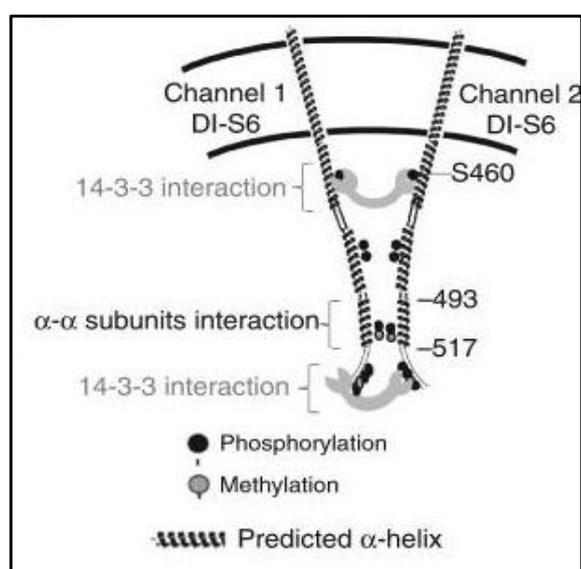


Figure 12. Représentation schématique de la région d'interaction entre les sous-unités α du canal cardiaque $\text{Na}_v1.5$. La protéine 14.3.3 se lie à deux endroits différents de la chaîne polypeptidique des canaux $\text{Na}_v1.5$ et elle leur permet d'interagir physiquement entre les résidus 493 et 517 au niveau de la boucle intracellulaire reliant les domaines DI et DII. (Clatot et coll., 2017).

Pour identifier la séquence des canaux leur permettant d'interagir physiquement, le groupe d'Isabelle Deschenes s'est appuyé sur une étude précédente visant à étudier un modèle transgénique de porc contenant la mutation tronquée E555X située sur le canal $\text{Na}_v1.5$ et rapportée chez un patient atteint du syndrome de Brugada (Brs), une pathologie du rythme cardiaque pouvant entraîner la mort (Park et coll., 2015). Les enregistrements électrophysiologiques des cardiomyocytes du porc montrent que la mutation E555X induit un effet de dominance négative sur les canaux endogènes, suggérant ainsi que l'interaction entre les canaux se fait avant le 555^{ème} acide aminé. Grâce à des enregistrements électrophysiologiques, le groupe d'Isabelle Deschenes a donc étudié l'effet de plusieurs

protéines tronquées sur le canal sauvage $Na_v1.5$. Ainsi ils montrent que 3 protéines tronquées 450X, 470X et 493X n'exercent aucun effet sur le courant sodium généré par le canal WT $Na_v1.5$ exprimé dans des cellules HEK. En revanche, les protéines tronquées 517X et 555X réduisent le courant de manière significative. En parallèle, les auteurs réalisent des expériences de co-immunoprécipitation et montrent que les protéines tronquées 493X, 517X et 555X interagissent avec le canal WT $Na_v1.5$. Contrairement aux protéines 517X et 555X, l'interaction de la protéine 493X avec le canal WT est très faible expliquant ainsi l'absence de dominance négative. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le site d'interaction principal entre deux sous-unités α réside entre les acides aminés 493 et 517 (position pour le canal cardiaque $Na_v1.5$).

Les auteurs enregistrent ensuite les courants unitaires générés par des cellules HEK exprimant les canaux $Na_v1.1$ ou $Na_v1.2$ ou $Na_v1.5$ en présence ou non de la difopéine (**Figure 13**). Ils relèvent le nombre d'ouverture des canaux à un niveau 1 (O1), correspondant à un courant d'environ 2pA, et à un niveau 2 (O2) correspondant à un courant d'environ 4pA c'est-à-dire le double. La majorité des événements enregistrés pour les 3 sous-unités α différentes ont un niveau d'ouverture O2 avec une amplitude de 4pA. A l'inverse, en présence de difopéine, la majorité des courants enregistrés ont un niveau d'ouverture O1 avec une amplitude d'environ 2pA. Ces résultats suggèrent que les dimères formés par les sous-unités α ont une ouverture et une fermeture simultanées.

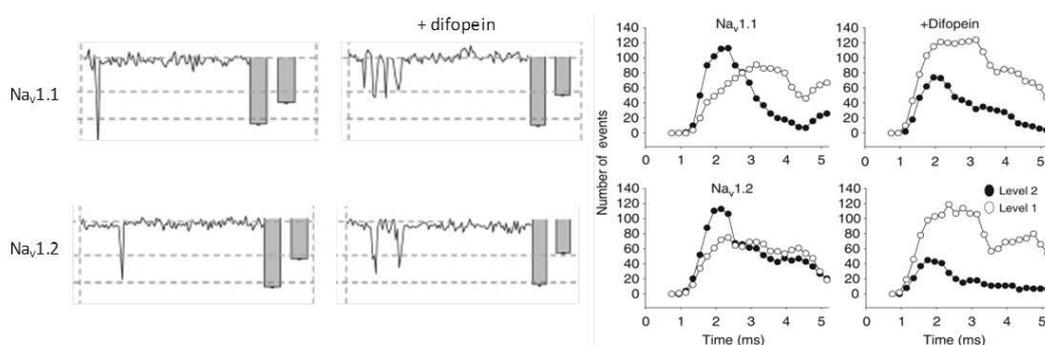


Figure 13. Couplage des canaux $Na_v1.1$ et $Na_v1.2$ médié par la protéine 14.3.3. A/ Traces représentatives d'enregistrements de courants unitaires à -40mV pour les canaux $Na_v1.1$ et $Na_v1.2$ exprimés dans des cellules HEK 293 avec ou sans difopéine. Les amplitudes globales pour les ouvertures simples et doubles sont représentées en moyenne \pm SEM dans les barres grises. Les lignes pointillées correspondent respectivement aux ouvertures à un niveau simple (O1) et double (O2). B/ Nombres d'ouvertures au niveau 1 (dimère simple ou non couplé) ou niveau 2 (dimère couplé) en fonction du temps dans les différentes conditions (Clatot et coll., 2017).

Interaction α - α et dominance négative

Bien que le rôle physiologique de la dimérisation des sous-unités α soit encore inconnu à ce jour, on sait qu'elle peut être problématique dans certaines conditions. En effet, certaines mutations situées sur les gènes codant pour des canaux ioniques peuvent conduire à la formation de canaux avec 1/ des défauts de repliement ou de trafic cellulaire conduisant à leur rétention dans le réticulum endoplasmique (RE) puis leur dégradation par le protéasome ou 2/ des propriétés biophysiques modifiées conduisant à une perte ou à un gain de fonction du canal à la surface cellulaire (Terragni et coll., 2018). Dans le cas des mutations hétérozygotes, les cellules contiennent 50% de canaux WT et 50% de canaux mutés ce qui signifie qu'un canal muté peut interagir avec un canal WT. Dans le cas où la mutation conduit à la rétention du canal au niveau du RE, l'interaction avec le canal WT va entraîner tout le dimère (canal muté + canal WT) à la dégradation par le protéasome. Par conséquent, le nombre de canaux WT à la surface cellulaire sera réduit. On dit que le mutant exerce un effet de dominance négative. Dans le cas où la mutation entraîne une modification des propriétés biophysiques du canal mutant exprimé à la surface cellulaire, l'interaction va conduire à la modification des propriétés biophysiques du canal WT. Ce dernier aura les mêmes propriétés que le canal muté (perte ou gain de fonction) et là aussi, on dit que le mutant exerce un effet de dominance négative sur le canal WT.

Jusqu'à aujourd'hui, la majorité des études sur la dominance négative concerne les canaux calciques et potassiques. En 2006, Jeng et coll montrent que deux mutations situées sur les canaux $Ca_v2.1$ et responsables d'ataxie épisodique de type 2 conduisent à des défauts de repliement du canal calcique. La co-expression des canaux $Ca_v2.1$ porteurs d'une de ces mutations avec les canaux $Ca_v2.1$ WT conduit à la réduction du nombre de canaux WT exprimés à la surface cellulaire (Jeng et coll., 2006). Deux ans plus tard, Mezghrani et coll montrent que cette réduction est due à l'interaction des canaux WT et mutés dans le RE. Les canaux mutés mal repliés interagissent avec les canaux WT avant d'être dégradés par le protéasome et par conséquent, des canaux WT sont détruits aussi. Ce mécanisme est appelé dominance négative (Mezghrani et coll., 2008). Les canaux potassiques $K_v1.1$ mutés et impliqués dans l'ataxie épisodique de type 1 exercent aussi ce type de dominance négative sur les canaux $K_v1.1$ WT (Chen et coll., 2016). De plus, lorsqu'ils sont adressés à la surface cellulaire, les canaux $K_v1.1$ mutés modifient les propriétés biophysiques des canaux WT. Il s'agit d'une autre forme de dominance négative.

En ce qui concerne les sous-unités α des canaux sodiques potentiel-dépendants, des mutations situées sur le canal $\text{Na}_v1.5$ responsables d'arythmies cardiaques ont montré les 2 types de dominance négative (Clatot et coll., 2018) (Sottas and Abriel, 2016).

2.6 L'isoforme néonatal

Il existe deux variants conservés issus de l'épissage alternatif des exons 5N et 5A des canaux sodiques potentiel-dépendants, appelés isoforme néonatal et isoforme adulte. La différence se fait au niveau de la boucle extracellulaire reliant le segment S3 au segment S4 de DI où un acide aminé neutre ou chargé positivement dans l'isoforme néonatal est remplacé par un résidu d'acide aspartique chargé négativement dans l'isoforme adulte (Noda et coll., 1986). La proportion de l'isoforme néonatal diminue pendant le développement au profit de l'isoforme adulte. Bien que ce dernier soit le plus étudié, quelques équipes se sont tout de même intéressées à la fonction de l'isoforme néonatal dans des conditions physiologiques ou pathologiques.

Des études *in vivo* dans un modèle de souris exprimant l'isoforme adulte seulement du canal $\text{Na}_v1.2$ suggèrent que le rôle physiologique de l'isoforme néonatal est de réduire l'excitabilité neuronale à un stade précoce du développement et que cet effet a un impact sur le long terme (Gazina et coll., 2015).

En 2010, l'équipe du Dr Holger Lerche étudie, via des enregistrements électrophysiologiques dans des cellules HEK, deux mutations identifiées chez des patients atteints d'épilepsie néonatale et infantile bénigne. Chaque mutation est insérée soit dans l'isoforme adulte soit dans l'isoforme néonatal (D209N) de la sous-unité α -II humaine des canaux sodiques. Une des mutations conduit à une augmentation du courant sodium persistant dans l'isoforme néonatal. Cet effet disparaît lorsque la mutation est insérée dans l'isoforme adulte ce qui pourrait expliquer d'une part l'hyperexcitabilité neuronale et les crises chez le patient tôt au cours du développement et d'autre part la rémission à un stade plus tardif (Liao et coll., 2010). En revanche la 2^{nde} mutation étudiée conduit à un gain de fonction du canal $\text{Na}_v1.2$ légèrement plus important dans l'isoforme adulte suggérant que d'autres mécanismes interviennent dans la rémission des crises chez ces patients.

Certaines mutations situées sur les canaux $\text{Na}_v1.7$ exprimés dans les neurones des ganglions spinaux de la racine dorsale (DRG) sont retrouvées chez des patients atteints d'érythromélalgie, un syndrome caractérisé par des crises de douleur et des sensations de

brûlures au niveau des extrémités (pieds, jambes, mains). L'étude d'une de ces mutations dans l'isoforme adulte des canaux $Na_v1.7$ montre qu'elle conduit à un gain de fonction des canaux $Na_v1.7$ ayant pour conséquence une hyperexcitabilité des neurones de DRG (diminution du seuil de déclenchement des PA, fréquence de décharge plus importante). En revanche, les neurones exprimant la même mutation mais insérée dans l'isoforme néonatal ne sont pas hyperexcitables et partagent les mêmes propriétés que les neurones WT (Choi et coll., 2010). Ces résultats sont donc en accord avec ceux obtenus plus tard *in vivo* suggérant que le rôle physiologique de l'isoforme néonatal est de réduire l'excitabilité neuronale très tôt au cours du développement (Gazina et coll., 2015). Il est donc important d'étudier l'isoforme néonatal afin de mieux comprendre les mécanismes associés aux pathologies apparaissant à un stade précoce du développement.

3. Les canaux sodiques potentiel-dépendants $Na_v1.1$

Le canal $Na_v1.1$ est codé par le gène *SCN1A* situé sur le chromosome 2.

3.1 Distribution neuronale et spatio-temporelle

Distribution neuronale des canaux $Na_v1.1$

Les canaux $Na_v1.1$ sont localisés au niveau des interneurones de l'hippocampe, du cortex, de la substance noire, du gyrus denté, des cellules cérébelleuses de Purkinje et des motoneurones de la moelle épinière (Westenbroek et coll., 1989) (Gong et coll., 1999). Ils sont majoritairement exprimés au niveau des interneurones GABAergiques. Plus précisément ils sont exprimés au niveau des neurones inhibiteurs positifs à la parvalbumine (PV+) et à la somatostatine (SST+) dérivés de l'éminence ganglionnaire médiale (Ogiwara et coll., 2007) et qui ont pour rôle principal de réduire l'excitabilité neuronale en agissant comme un « frein » sur les neurones excitateurs. Les canaux sodiques $Na_v1.1$ sont aussi localisés au niveau de quelques sous-populations de neurones excitateurs tels que les neurones pyramidaux de la couche V du néocortex ou encore les neurones de la voie perforante du cortex entorhinal (Ogiwara et coll., 2013).

Distribution spatio-temporelle des canaux $Na_v1.1$

Les canaux $Na_v1.1$ sont localisés au niveau du soma et de l'axone des interneurones GABAergiques (Westenbroek et coll., 1989) (Ogiwara et coll., 2007) et commencent à

apparaître 1 à 10 jours après la naissance (P1-P10) chez la souris jusqu'à atteindre leur niveau d'expression maximal entre la 2^{nde} et la 3^{eme} semaine post-natale (P14-P21). Des marquages immunohistochimiques montrent qu'à partir de P14-P16, les canaux $Na_v1.1$ sont majoritairement exprimés au niveau du SIA des interneurons PV+ du néocortex (**Figure 14**) et de l'hippocampe en développement (Ogiwara et coll., 2007).

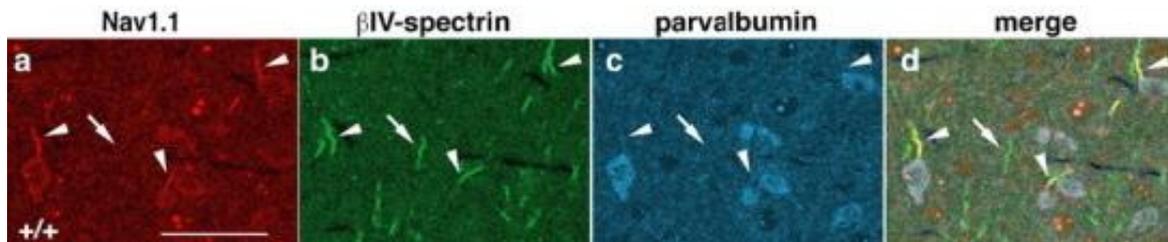


Figure 14. Localisation des canaux $Na_v1.1$ au SIA des interneurons PV+ dans le néocortex en développement de souris à P14-P16. Les canaux $Nav1.1$ (en rouge) co-localisent avec la βIV -spectrine qui marque le SIA (vert) dans les neurones PV+ (bleu) Echelle 50 μm (Ogiwara et coll., 2007).

L'expression des canaux $Na_v1.1$ semble être étroitement liée à celle des canaux $Na_v1.3$. En effet, chez le rat les canaux $Na_v1.3$ sont exprimés au niveau du corps cellulaire des neurones chez le fœtus et à la naissance mais ils disparaissent dans la quasi-totalité entre la 1^{ère} et la 2^{nde} semaine post-natale, période qui correspond à l'apparition des canaux $Na_v1.1$ (**Figure 15**) (Beckh et coll., 1989).

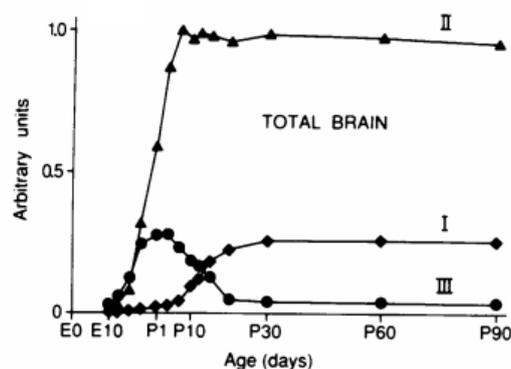


Figure 15. Niveau d'ARNm des canaux $Na_v1.1$, $Na_v1.2$ et $Na_v1.3$ dans le cerveau du rat, au cours du développement. Les niveaux d'ARNm des canaux $Na_v1.3$ sont détectables au stade embryonnaire et atteignent leur niveau maximal à la naissance (P1) et diminuent jusqu'à disparaître à P20. En parallèle, les niveaux d'ARNm des canaux $Na_v1.1$ augmentent entre P1 et P20 et persistent au cours du temps. Les niveaux d'ARNm des canaux $Na_v1.2$ sont détectables au stade embryonnaire et atteignent leur niveau maximal à P1 et ne diminuent pas au cours du développement (Beckh et coll., 1989).

Le lien entre les 2 isoformes a été confirmé dans des modèles de souris hétérozygote *SCN1A*^{+/-} ou homozygote *SCN1A*^{-/-} où la réduction partielle ou totale des canaux Na_v1.1 conduit à une augmentation du niveau d'expression des canaux Na_v1.3 dans les interneurones GABAergiques de l'hippocampe (**Figure 16**). Cette augmentation est observée à partir de marquages réalisés à P14, ce qui signifie que les canaux Na_v1.3 peuvent jouer un rôle plus tard dans le développement et compenser un déficit des canaux Na_v1.1.

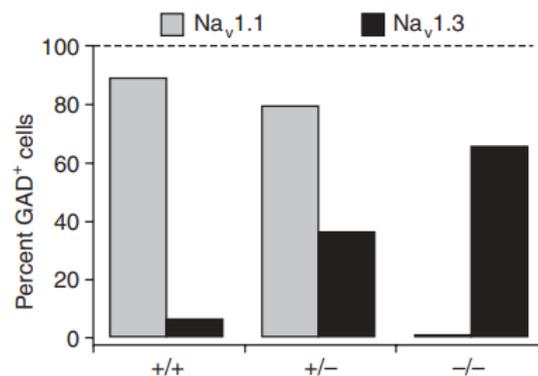


Figure 16. Régulation positive des canaux Na_v1.3 dans les interneurones GABAergiques des souris hétérozygotes et homozygotes pour le gène *SCN1A*. Graphique illustrant le pourcentage d'interneurones (GAD+) dans les neurones d'hippocampe de souris à P14 marqués avec un anticorps anti-Nav1.1 ou anti Nav1.3 chez les souris *SCN1A*^{+/-}, *SCN1A*^{+/-} ou *SCN1A*^{-/-} (Yu et coll., 2006).

3.2 Rôle des canaux Na_v1.1

Le rôle des canaux Na_v1.1 a été mis en évidence grâce à un modèle de souris délétée pour le gène *SCN1A*. Les souris hétérozygotes *SCN1A*^{+/-} font des crises spontanées entre la 3^{ème} et la 4^{ème} semaine post-natale (P21-P27). Le taux de mortalité chez ces souris augmente avec le début d'apparition des crises spontanées. Les souris homozygotes *SCN1A*^{-/-} font des crises dès le 9^{ème} jour de vie (P9) et ne sont pas viables au-delà de la 2^{ème} semaine post-natale (P15).

En 2006, Yu et coll montrent pour la première fois que les neurones GABAergiques des souris *SCN1A*^{+/-} et *SCN1A*^{-/-} ont une fréquence de décharge fortement réduite par rapport aux neurones des souris contrôles. Cette réduction de l'inhibition conduit à une hyperexcitabilité neuronale et à la génération d'un modèle d'encéphalopathie épileptique sévère de l'enfant (Yu et coll., 2006). La délétion des canaux Na_v1.1 dans les interneurones PV⁺ spécifiquement suffit à induire le phénotype d'épilepsie grave tandis que la délétion des canaux Na_v1.1 dans

les neurones excitateurs n'a aucun impact sur le comportement des souris confirmant ainsi un rôle principal des canaux Nav1.1 dans l'excitabilité des interneurons et la composante inhibitrice du réseau neuronal (Ogiwara et coll., 2013).

3.3 Pathologies associées aux mutations du gène *SCN1A*

Le gène *SCN1A* est « LE » gène de l'épilepsie. Les mutations situées sur ce gène sont à l'origine de différentes formes d'épilepsie plus ou moins sévères.

L'épilepsie généralisée avec convulsions fébriles plus (EGCF+)

Les convulsions fébriles touchent 3 à 5% des enfants. Elles apparaissent entre 1 et 5ans et on parle de crises fébriles plus lorsqu'elles persistent après l'âge de 6ans (Hamati-Haddad and Abou-Khalil, 1998).

En 1997, Scheffer et Berkovic analysent le phénotype épileptique de plusieurs membres ce qui leur permet d'identifier 6 phénotypes différents : 1/les convulsions fébriles, 2/ les convulsions fébriles plus, 3/ les absences avec convulsions fébriles plus, 4/ les crises myocloniques avec convulsions fébriles plus, 5/ les crises atoniques avec convulsions fébriles plus et 6/l'épilepsie myoclonique-astatique (MAE) qui est une forme plus sévère, associée à une déficience intellectuelle (Scheffer and Berkovic, 1997) (Escayg et coll., 2000). Ils regroupent l'ensemble de ces phénotypes et définissent un nouveau syndrome épileptique sous le terme de « Epilepsie Généralisée avec Convulsions Fébriles Plus » (EGCF+). Un an plus tard, Wallace et coll analysent le phénotype épileptique de 42 patients épileptiques issus d'une même famille dont 26 sont atteints d'EGCF+ et identifient une mutation (C121W) située sur le gène *SCN1B* codant pour la sous-unité accessoire $\beta 1$ des canaux sodiques potentiel-dépendants (Wallace et coll., 1998). Par la suite, 2 mutations situées sur le gène *SCN1A*, T875M et R1648H, sont identifiées dans deux familles différentes avec EGCF+ (Escayg et coll., 2000). Ces résultats permettent d'établir, pour la 1^{ère} fois, le lien entre les canaux sodiques potentiel-dépendants et les syndromes épileptiques avec un mode de transmission autosomique dominant. Il existe 3 types différents d'EGCF+, type 1 à 3, causés respectivement par les gènes *SCN1B*, *SCN1A* et *GABRG2* (Baulac et coll., 2001).

Le gène *SCN1A* et l'EGCF+

De 2000 à 2009, une quinzaine de mutations situées sur le gène *SCN1A* ont été identifiées chez des patients atteints d'EGCF+. La majorité des mutations sont héréditaires et transmises selon un mode autosomique dominant bien qu'il existe également des mutations *de novo* (Escayg et coll., 2000) (Escayg et coll., 2001) (Wallace et coll., 2001). Une de ces mutations a été étudiée à l'aide d'un modèle animal : il s'agit de la mutation R1648H située sur le segment S4 du domaine IV (Martin et coll., 2010).

Les souris homozygotes *SCN1A*^{R1648-/-} présentent des crises généralisées spontanées et meurent prématurément entre 16 et 26 jours après la naissance et les souris hétérozygotes *SCN1A*^{R1648+/-} présentent peu de crises généralisées spontanées et une diminution du seuil des crises induites par le flurothyle. Les souris hétérozygotes reproduisent donc le phénotype EGCF+ observé chez les patients et sont donc un bon modèle d'étude de la pathologie. En revanche, les souris homozygotes reproduisent un phénotype similaire à celui observé chez les patients atteints de l'épilepsie myoclonique sévère du nourrisson ou syndrome de Dravet.

Les enregistrements électrophysiologiques des neurones de cortex dissociés des souris *SCN1A*^{R1648H+/-} montrent que la mutation conduit, dans les interneurons GABAergiques spécifiquement, à une perte de fonction des canaux sodiques. Cette perte de fonction est due à une récupération plus lente de l'inactivation et à une réduction de la fréquence de décharge en réponse à une injection de courant. Ces résultats sont en accord avec ceux des autres études proposant une hypoexcitabilité des neurones inhibiteurs comme étant à l'origine de l'hyperexcitabilité corticale et des crises d'épilepsie chez les patients épileptiques porteurs de mutations *SCN1A* (Yu et coll., 2006) (Ogiwara et coll., 2013).

Récemment, notre équipe a montré que l'induction de crises, par hyperthermie ou avec le flurothyl (convulsivant volatil), transforme le phénotype moyen des souris hétérozygotes décrit ci-dessus en phénotype plus sévère, similaire à ce qui a été observé chez les souris homozygotes. Après induction des crises, les souris *SCN1A*^{R1648H+/-} présentent des crises spontanées plus fréquentes ainsi que des déficits cognitifs et comportementaux caractéristiques du syndrome de Dravet. Ces résultats montrent d'une part qu'il existe une interaction entre l'effet de la mutation *SCN1A* et les crises d'épilepsie et d'autre part que la mutation, associée à un phénotype moyen, peut conduire à un phénotype sévère dans certaines conditions (Salgueiro-Pereira et coll., 2019).

Le syndrome de Dravet

Le syndrome de Dravet (SD), aussi appelé épilepsie myoclonique sévère de l'enfant (SMEI), est décrit pour la première fois en 1978 par le Dr Charlotte Dravet (Dravet et coll., 2005). Les crises apparaissent à partir de l'âge d'un an environ et sont dans un premier temps déclenchées par la fièvre et évoluent au fil du temps en crises spontanées fréquentes. Elles sont de type clonique, myoclonique ou partiel et sont associées à un retard du développement mais aussi à des déficits cognitifs ou encore des problèmes de coordination de mouvements appelés ataxie (Harkin et coll., 2007). A l'âge adulte, les crises se font plus rares mais les troubles cognitifs persistent (Jansen et coll., 2006). Les anti-épileptiques ne permettent pas de réduire les crises chez l'enfant, ce qui signifie que le SD fait partie des encéphalopathies épileptiques pharmaco-résistantes. Bien qu'il soit lié à certains gènes tels que *SCN1B*, *GABRA1* ou *GABRG2* (Carvill et coll., 2014), le SD est dû à des mutations *de novo* hétérozygotes du gène *SCN1A* dans la majorité des cas (Mulley et coll., 2006). Les antécédents familiaux des patients atteints du SD révèlent un spectre phénotypique EGCF+, ce qui amène les scientifiques à définir le syndrome comme étant la forme la plus sévère du spectre EGCF+ (Singh et coll., 2001).

Le gène SCN1A et le syndrome de Dravet

Au vu des caractéristiques communes entre les patients atteints de EGCF+ porteurs de mutations situées sur le gène *SCN1A* et les patients atteints du syndrome de Dravet, Claes et coll analyse la séquence du gène *SCN1A* chez 7 patients atteints du SD (Claes et coll., 2001). L'analyse génétique leur permet d'identifier 7 mutations *SCN1A* hétérozygotes et donc pour la 1^{ère} fois, de mettre en évidence que le gène *SCN1A* est impliqué dans l'épilepsie sévère myoclonique de l'enfant. Contrairement à la majorité des mutations EGCF+ qui sont transmises selon un mode autosomique dominant, les mutations responsables du SD sont *de novo* dans plus de 90% des cas. En 2011, on comptait plus de 700 mutations du gène *SCN1A* identifiées chez les patients Dravet (Dravet et Guerrini, Montrouge 2011). L'effet fonctionnel de ces mutations sur les canaux $Na_v1.1$ a été montré dans un premier temps avec la mutation faux-sens L986F identifiée chez un patient atteint du SD (Claes et coll., 2001). Cette mutation induit une perte de fonction totale des canaux sodiques $Na_v1.1$ (Lossin et coll., 2003). Les souris hétérozygotes *SCN1A*^{+/-} reproduisent un phénotype similaire à celui observé chez les patients atteints du SD. Les souris font des crises spontanées et leur taux de mortalité

augmente dès la 3^{ème} semaine post-natale. Les enregistrements des neurones *in vitro* (sur tranches) montrent que les neurones GABAergiques de ces souris ont des courants sodiques réduits et génèrent moins de potentiels d'action que les souris contrôles en réponse à une injection de courant.

L'ensemble de ces résultats révèlent que la perte de fonction des canaux $Na_v1.1$, associée au SD, conduit à une réduction du courant sodium et à une hypoexcitabilité des interneurones GABAergiques PV^+ et SST^+ (Yu et coll., 2006) (Ogiwara et coll., 2007). Ces sous-populations d'interneurones ont pour rôle principal de réduire l'excitabilité neuronale en agissant comme un « frein » sur les neurones excitateurs, ce qui signifie que leur hypoexcitabilité entraîne une hyperexcitabilité de l'ensemble du réseau neuronal.

La migraine hémiplégique familiale (MHF)

La migraine est une céphalée qui évolue par des crises récurrentes, d'une durée allant de quelques heures à quelques jours, entre lesquelles le patient ne présente aucun problème de santé. La migraine hémiplégique familiale (MHF) est une forme de migraine avec aura c'est-à-dire que la céphalée est précédée ou accompagnée de troubles visuels, sensitifs, aphasiques mais surtout moteurs avec des hémiparésies (Ducros et coll., 2001) (Headache Classification Subcommittee of the International Headache, 2004).

La MHF est héréditaire et se transmet selon un mode autosomique dominant. Il existe 3 types de MHF qui diffèrent par leur origine génétique. Dans environ 50% des cas, la MHF est due à une mutation du gène *CACNA1A* (MHF-1) codant pour la sous-unité $\alpha1A$ des canaux calciques neuronaux $Ca_v2.1$ de type P/Q (Ophoff et coll., 1996) (Ducros et coll., 2001). L'étude fonctionnelle des neurones de souris porteuses d'une de ces mutations révèle un gain de fonction sur la densité de courant des courants calciques et à une augmentation de la libération des neurotransmetteurs (glutamate principalement) conduisant à une hyperexcitabilité corticale (van den Maagdenberg et coll., 2004). Chez ces souris, le seuil de déclenchement de la dépression corticale envahissante (DCE) est réduit et sa vitesse de propagation est augmentée. La DCE est une vague de dépolarisation intense qui se propage le long du cortex et qui est suivie par une phase de silence des neurones (Lauritzen, 1994) (**Figure17**).

L'aura des patients MHF est précédée par la DCE qui active les afférences trigéminales impliquées dans la douleur (Hadjikhani et coll., 2001) (Bolay et coll., 2002).

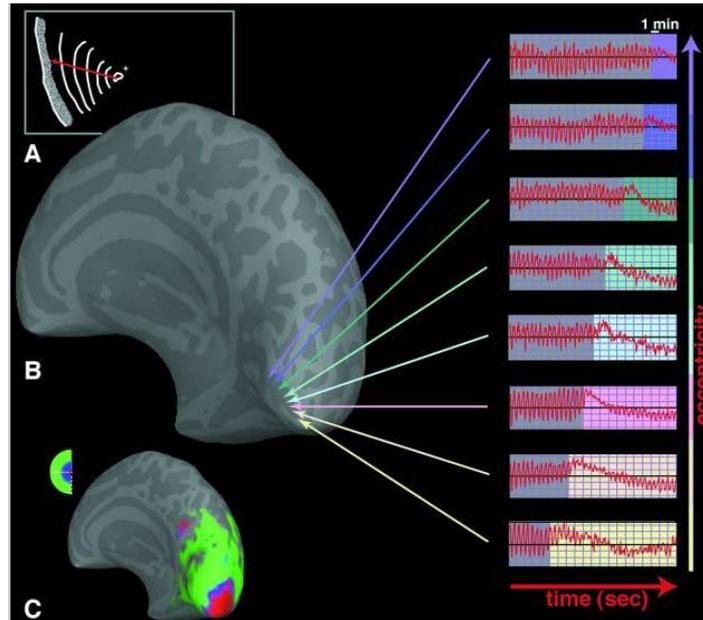


Figure 17. Dépression corticale envahissante enregistrée pendant l'aura migraineuse d'un patient. A/Progression des scintillations et du scotome (tâche visuelle) dans le champ visuel gauche d'un patient souffrant d'aura migraineuse. B/ Enregistrement simultané des signaux BOLD blood-oxygen-level dependent dans la surface médiale du lobe occipital droit, montrant la propagation rostrale d'une réponse diminuée. C/ Projection de la rétine sur le cortex occipital, telle que déterminée par la méthode BOLD. Les zones rouges, bleues et vertes représentent respectivement les projections rétinienne fovéale, parafovéale et périphérique (Hadjikhani et coll., 2001).

Dans 20% des cas, la MHF est due à une mutation située sur le gène *ATP1A2* (MHF-2) codant pour la sous-unité $\alpha 2$ d'une pompe Na^+/K^+ ATP dépendante (De Fusco et coll., 2003). Cette pompe utilise l'hydrolyse de l'ATP pour faire rentrer du K^+ dans la cellule en échange du Na^+ contre les gradients transmembranaires. Le maintien d'un fort gradient transmembranaire de sodium est essentiel pour le transport du glutamate par exemple. Chez l'adulte, cette pompe est exprimée principalement dans les astrocytes. Les mutations responsables de la MHF-2 conduisent à une perte de fonction de la pompe Na^+/K^+ et donc à une diminution de l'activité de pompage dans les cellules gliales avec une baisse de la recapture de glutamate et de K^+ dans la fente synaptique pouvant conduire à une excitabilité neuronale (Segall et coll., 2005).

Enfin, 5% des patients atteints de MHF ont une mutation située sur le gène *SCN1A* (MHF-3).

Le gène *SCN1A* et la MHF-3

En 2005, Dichigans et coll identifie la 1^{ère} mutation hétérozygote située sur le gène *SCN1A*, Q1489K, chez un patient atteint de MHF (Dichigans et coll., 2005). Aujourd'hui, on compte environ une dizaine de mutations identifiées dans des familles MHF-3 (**Figure 18**). La MHF-3 peut être pure ou associée à d'autres pathologies telles que l'épilepsie ou la cécité répétitive quotidienne provoquée *Elicited Repetitive Daily Blindness* (ERDB).

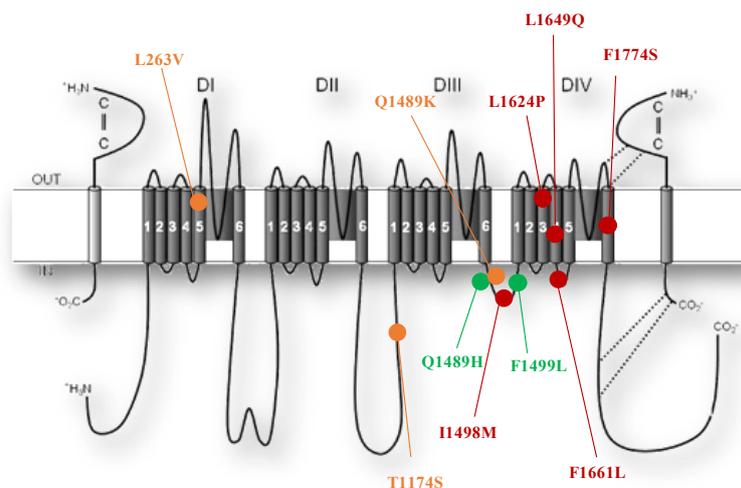


Figure 18. Localisation des mutations du gène *SCN1A* responsables de la MHF-3

La MHF-3 peut être pure (mutations en rouge) ou associée à l'épilepsie (mutations en orange) ou l'ERDB (mutations en vert).

- MHF-3 pure

Cinq mutations situées sur le gène *SCN1A* ont été identifiées dans des familles avec un phénotype de migraine hémiplésique pure (**Figure 18**). La mutation I1498M est située au niveau de la boucle intracellulaire reliant le domaine III au domaine IV (Weller et coll., 2014), la mutation L1624P est située sur le segment S3 de DIV (Fan et coll., 2016), la mutation L1649Q est située sur le segment S4 de DIV (Vanmolkot et coll., 2007), la mutation F1661L est située au niveau de la boucle intracellulaire reliant les segments S4 et S5 de DIV (Weller et coll., 2014) et enfin la mutation F1774S est localisée au niveau du segment S6 de DIV (Chastan et coll., 2016).

La mutation L1624P a été identifiée dans une famille allemande avec un phénotype de type FHM pure. Cinq membres issus de cette famille de 3 générations sont porteurs de cette mutation hétérozygote qui correspond à la substitution T-C du nucléotide 4871.

La comparaison des enregistrements électrophysiologiques de cellules tsA-201 exprimant soit le canal WT soit le canal muté révèle que la mutation L1624P conduit à un gain de fonction du canal $Na_v1.1$. L'effet le plus important est observé sur l'inactivation rapide (le canal passe d'un état fermé à un état inactif) avec un ralentissement de la cinétique d'inactivation, un déplacement vers des potentiels plus dépolarisés de la courbe d'inactivation (+10mV) et une récupération de cette inactivation deux fois plus rapide. Par conséquent, le courant sodium qui entre dans la cellule est plus important. La mutation induit aussi une augmentation du courant sodium persistant I_{NaP} (gain de fonction).

De plus, la mutation n'altère pas l'inactivation lente et permet au canal d'être plus disponible en réponse à des trains dépolarisants de haute fréquence (10, 50 ou 100 Hz) prédisant ainsi une entrée d'ions sodium massive et soutenue. La mutation L1624P conduit donc à un gain de fonction clair des canaux $Na_v1.1$ (Fan et coll., 2016).

La mutation F1774S a été identifiée chez une femme de 19 ans atteinte de migraine hémiparésie depuis l'âge de deux ans et demi. Contrairement aux autres mutations qui se transmettent selon un mode autosomique dominant, la mutation F1774S est une mutation *de novo*, ce qui signifie qu'elle n'est pas transmise par les parents (Chastan et coll., 2016). L'étude fonctionnelle de cette mutation dans des cellules HEK montre qu'elle entraîne un décalage positif de la courbe d'inactivation qui se met en place à des potentiels plus dépolarisés, une récupération plus rapide de cette inactivation, une augmentation du courant persistant I_{NaP} et une plus grande disponibilité du canal pendant une stimulation à haute fréquence c'est-à-dire en réponse à des dépolarisations répétées : 200 pulses de 5ms à 10mV (Bertelli et coll., 2019). La mutation F1774S conduit donc à un gain de fonction clair des canaux $Na_v1.1$.

La mutation L1649Q a été identifiée chez sept individus d'une même famille de quatre générations avec un phénotype de MHF pure (Vanmolkot et coll., 2007).

Elle conduit à une perte de fonction importante des canaux $Na_v1.1$ qui est la conséquence d'une réduction importante de la densité de courant de ces canaux. Cestèle et coll suggèrent que la mutation conduit à des défauts de repliement ou de trafic cellulaire des canaux et co-exprimant, avec le canal muté, des protéines d'interaction telles que les sous-unités β ou

encore la calmoduline qui, en interagissant avec le canal, peuvent stabiliser sa conformation et favoriser l'adressage des canaux mutés à la surface cellulaire. Les résultats obtenus lors de ces co-transfections montrent qu'une récupération partielle de la densité de courant des canaux mutés est possible et que les conséquences fonctionnelles de cette mutation sont un gain de fonction de la protéine canal. L'étude fonctionnelle de la mutation L1649Q dans des neurones néocorticaux transfectés permet non seulement d'obtenir une récupération partielle de la densité de courant sodique mais également un gain de fonction des neurones GABAergiques. L'expression des canaux mutés exprimés dans des neurones en culture suggère que ces derniers possèdent des protéines d'interaction endogènes permettant l'adressage des canaux mutés à la membrane plasmique (Cestele et coll., 2013b). Cette étude montre pour la première fois, que la perte de fonction des canaux mutés due à une diminution du nombre de canaux exprimés à la membrane plasmique peut être contrecarrée par le gain de fonction induit par les modifications des propriétés biophysiques du canal $Na_v1.1$ et suggère un nouveau mécanisme pour les mutations responsables de la MHF-3.

L'ensemble de ces études montre que les mutations du gène *SCN1A* responsables de la MHF-3 conduisent à un gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ et à une hyperexcitabilité des interneurons GABAergiques. Cette hyperexcitabilité pourrait conduire à une accumulation de potassium extracellulaire et des neurotransmetteurs tels que le glutamate et le GABA et donc à des dépolarisations neuronales. Ces dépolarisations neuronales seraient à l'origine de la DCE observée chez les patients MHF (Cestele et coll., 2008) (Hadjikhani et coll., 2001).

- MHF-3 et épilepsie

Les mutations L263V, T1174S et Q1489K ont été identifiées dans des familles avec un phénotype MHF-3 associé à l'épilepsie. La mutation L263V est située au niveau du segment S5 de DI, la mutation T1174S est située au niveau de la boucle intracellulaire reliant DII à DIII et la mutation Q1489K est localisée au niveau de la boucle intracellulaire reliant DIII à DIV (**Figure 18**).

La mutation L263V est la 1^{ère} mutation responsable de MHF-3 associée à l'épilepsie. Elle a été identifiée chez 5 membres d'une même famille de 3 générations (Castro et coll., 2009). Parmi les cinq individus, trois font des crises généralisées tonico-cloniques depuis leur enfance (apparition des crises entre 4 et 8ans).

L'étude fonctionnelle de la mutation dans des cellules HEK transfectées montre qu'elle conduit à des modifications des propriétés biophysiques ayant toutes pour conséquence un gain de fonction du canal $Na_v1.1$. Kahlig et coll observent un décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus hyperpolarisés, un décalage de la courbe d'inactivation rapide vers des potentiels plus dépolarisés, une augmentation du courant persistant I_{NaP} et enfin une décélération du développement et un décalage vers des potentiels plus dépolarisés de l'inactivation lente. Ils concluent donc que la mutation conduit à un gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ (Kahlig et coll., 2008).

La mutation T1174S a été identifiée dans une famille de 13 individus issus de 3 générations avec un phénotype MHF. Trois membres issus de cette famille ont une MHF associée à des crises fébriles (FS) et / ou une épilepsie occipitale focale et deux autres ont une MHF pure (Cestele et coll., 2013a).

Les enregistrements électrophysiologiques de cellules tsA-201 exprimant soit le canal sauvage soit le canal muté montrent que la mutation induit des effets fonctionnels divergents conduisant à la fois à une perte et un gain de fonction des canaux $Na_v1.1$. Le décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus dépolarisés ainsi que la décélération de la récupération après une inactivation rapide induisent une perte de fonction tandis que l'augmentation de l'amplitude du courant persistant I_{NaP} entraîne un gain de fonction (Cestele et coll., 2013a). L'effet observé sur le courant I_{NaP} n'est peut-être pas causé par la modification d'une propriété intrinsèque du canal muté mais plutôt par une modulation médiée par les protéines G (Mantegazza et coll., 2005).

Par conséquent, l'effet global de la mutation est régulé par l'augmentation du courant I_{NaP} et dépend de l'action de modulateurs susceptibles de faire passer l'effet de la mutation d'une perte de fonction à un gain de fonction. Ainsi, le mutant T1174S peut conduire soit à une hyperexcitabilité soit à une hypoexcitabilité des interneurons GABAergiques.

La mutation Q1489K a été identifiée, grâce au séquençage des 26 exons codant pour le gène *SCN1A*, dans 3 familles avec un phénotype de MHF. Dans deux familles sur trois, la MHF peut être associée à des convulsions fébriles bénignes ou à une épilepsie focale bénigne apparaissant durant l'enfance (Dichgans et coll., 2005).

L'étude fonctionnelle de la mutation dans des cellules HEK montre qu'elle conduit à une accélération du développement et de la récupération de l'inactivation du canal, à un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus dépolarisés et à une augmentation du

courant persistant I_{NaP} (Cestele et coll., 2008). L'effet observé sur le développement de l'inactivation suggère une perte de fonction du canal tandis que les effets observés sur la récupération de l'inactivation, la voltage dépendance et le courant I_{NaP} suggèrent un gain de fonction du canal $Na_v1.1$. L'étude de la mutation dans des neurones en culture transfectés montre des effets similaires à ceux observés dans les cellules HEK, c'est-à-dire des effets divergents qui entraînent à la fois une perte et un gain de fonction du canal $Na_v1.1$.

Les auteurs montrent également que l'effet global de la mutation est une capacité initiale accrue à soutenir les décharges neuronales à haute fréquence mais cette capacité est limitée car les effets de la mutation entraînant une perte de fonction du canal deviennent dominants pendant les décharges de longue durée. Ainsi, la mutation Q1489K induit une hyperexcitabilité neuronale limitée pouvant conduire à une hypoexcitabilité dans certaines conditions.

- MHF-3 et ERDB

Deux mutations *SCN1A* ont été identifiées dans deux familles avec un phénotype de migraine hémiparésie familiale associée à l'ERDB (**Figure 18**) (Vahedi et coll., 2009).

La 1^{ère} mutation, F1499L, est identifiée chez une femme de 18 ans souffrant, depuis l'âge de 6 ans, d'attaques récurrentes de migraine hémiparésie associées à une cécité transitoire bilatérale d'une durée maximale de 10 secondes pouvant se répéter jusqu'à 10 fois par jour. Pendant l'attaque, les pupilles sont dilatées et sans réflexes. Les symptômes visuels sont spontanés ou déclenchés par le frottement des yeux. La cécité survient indépendamment des crises de migraine hémiparésie. Les examens neurologiques, d'acuité visuelle, d'électrorétinogramme et de fond d'œil sont normaux en dehors des attaques. La mère, la sœur ainsi que le grand-père maternel de la patiente souffrent de migraine hémiparésie sans cécité. La 2^{ème} mutation, Q1489H, est identifiée chez 4 des 5 membres d'une même famille avec un phénotype de MHF-3 associée à une cécité quotidienne transitoire déclenchée par le frottement des yeux.

Les 2 mutations, Q1489H et F1499L, sont situées au niveau de la boucle intracellulaire reliant le segment S6 du domaine III au segment S1 du domaine IV. Cette boucle joue un rôle crucial dans l'inactivation du canal sodique. A ce jour, aucune étude fonctionnelle sur ces mutations n'a été réalisée.

Récemment, la mutation F1499L a été retrouvée dans deux familles avec un phénotype MHF pure sans cécité ou autres troubles visuels (Schubert et coll., 2018).

Corrélation génotype-phénotype

- Perte de fonction des canaux $Na_v1.1$ et épilepsie

L'ensemble des études réalisées permet d'établir que les mutations du gène *SCN1A* impliquées dans les différentes formes d'épilepsie plus ou moins sévères telles que les crises généralisées avec convulsions fébriles + (EGCF+) ou l'épilepsie myoclonique sévère de l'enfant conduisent à une perte de fonction des canaux $Na_v1.1$. Les canaux étant majoritairement exprimés dans les interneurons GABAergiques positifs à la parvalbumine (PV+) et à la somatostatine (SST+) (Ogiwara et coll., 2007) la perte de fonction des canaux $Na_v1.1$ conduit à une hypoexcitabilité des interneurons GABAergiques. La composante inhibitrice du réseau neuronal est donc fortement altérée ce qui entraîne une hyperexcitabilité corticale et la génération de crises d'épilepsie (Ogiwara et coll., 2007) (Yu et coll., 2006).

- Gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ et MHF

Les études fonctionnelles réalisées à partir de cellules HEK ou de neurones transfectés montrent que les mutations responsables de MHF-3 pure conduisent toutes à gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ tandis que l'effet peut varier entre une perte ou un gain de fonction pour les formes de MHF-3 associées à une épilepsie.

En 2008, Cestèle et coll proposent pour la 1^{ère} fois un mécanisme pathologique probable pour la MHF-3 (Cestele et coll., 2008). Le gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ conduit à une hyperexcitabilité des interneurons GABAergiques. Cette hyperexcitabilité entraîne une accumulation importante de potassium dans le milieu intracellulaire à laquelle s'ajoute une accumulation de neurotransmetteurs comme le glutamate et le GABA. Cela aurait pour conséquence de dépolariser fortement les neurones corticaux et de déclencher la dépression corticale envahissante (DCE).

Récemment, Jansen et coll ont étudié le 1^{er} modèle de souris transgénique exprimant une mutation du gène *SCN1A*, L263V, identifiée chez un patient atteint de MHF et conduisant à un gain de fonction des canaux Na_v1.1 (Castro et coll., 2009) (Kahlig et coll., 2008) (Jansen et coll., 2020). L'électrocorticographie (ECoG) réalisée sur ces souris révèle des DCE spontanées se propageant du cortex visuel au cortex moteur. Elles ne sont pas retrouvées chez les souris contrôles. De plus, le seuil de déclenchement de la DCE induite par une stimulation électrique est fortement réduit chez les souris *SCN1A*^{+L263V} par rapport aux souris contrôles. Cette étude permet d'établir un lien direct une mutation *SCN1A* responsable de MHF-3 et la DCE (Jansen et coll., 2020). L'ensemble de ces études sur les mutations du gène *SCN1A* responsables de l'épilepsie ou de la MHF-3 ont permis l'identification de deux mécanismes distincts (**Figure 19**).

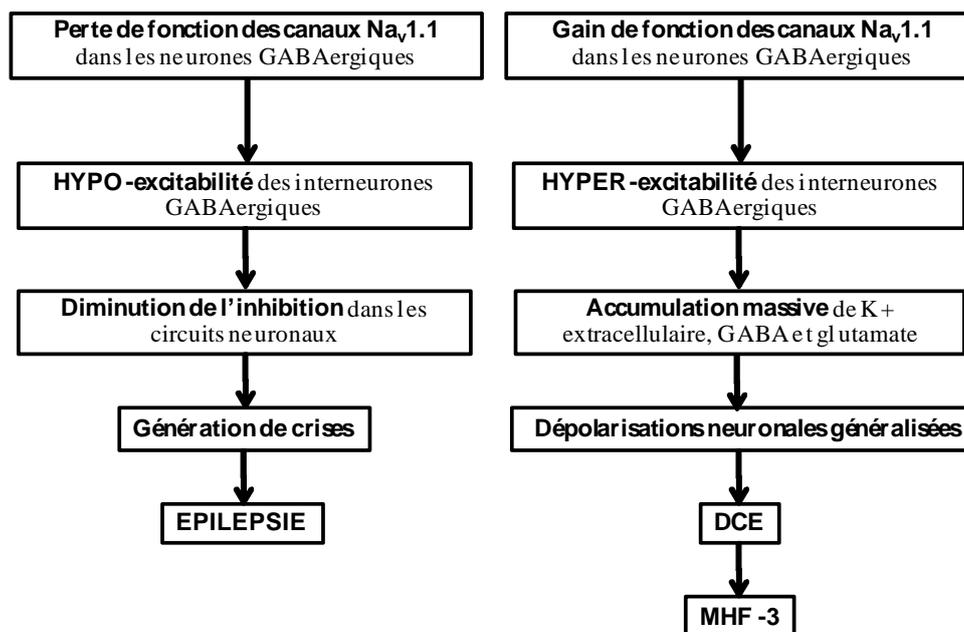


Figure 19. Lien entre le génotype et le phénotype des mutations du gène *SCN1A*

- Lien entre DCE et douleur de la migraine

En 2001, Hadjikhani et coll montrent grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) que l'aura de patients migraineux est déclenchée par la DCE (**Figure 20**) (Hadjikhani et coll., 2001). Elle se propage sur le cortex à vitesse lente, 3–4 mm/min, ce qui correspond au développement progressif des symptômes de l'aura. Elle libère ensuite des ions potassium et hydrogènes, des neurotransmetteurs et des métabolites tels que l'oxyde nitrique et l'adénosine dans l'espace extracellulaire et périvasculaire et provoque une hyperémie transitoire et une vasodilatation dans les vaisseaux du cortex et de la dure-mère. Ces molécules activent ou sensibilisent les afférences périvasculaires du trijumeau et transmettent les impulsions aux ganglions du trijumeau (TG) et au noyau trijumeau caudalis (TNC). Les impulsions du TNC sont transmises aux structures cérébrales impliquées dans la transmission et le traitement de la douleur. Les afférences du trijumeau dural sont soit directement activées soit stimulées indirectement et éventuellement sensibilisées par un œdème suite à la libération de neuropeptides vasoactifs (substance P, peptide apparenté au gène de la calcitonine, neurokinine A). L'activation du TNC ipsilatéral, à son tour, conduit à la stimulation du noyau salivateur supérieur (SSN) et des efférents parasympathiques via les ganglions sphéno-palatins. Les parasympathiques postganglionnaires favorisent la vasodilatation et augmentent le débit en libérant du polypeptide intestinal vasoactif (VIP), de l'oxyde nitrique ou de l'acétylcholine dans la dure-mère (Bolay et coll., 2002).

Ainsi, la DCE proposée comme mécanisme pathologique des mutations *SCN1A* conduisant à un gain de fonction des canaux $Na_v1.1$, pourrait être à l'origine de l'aura migraineuse et de la douleur de la migraine chez les patients atteints de MHF-3.

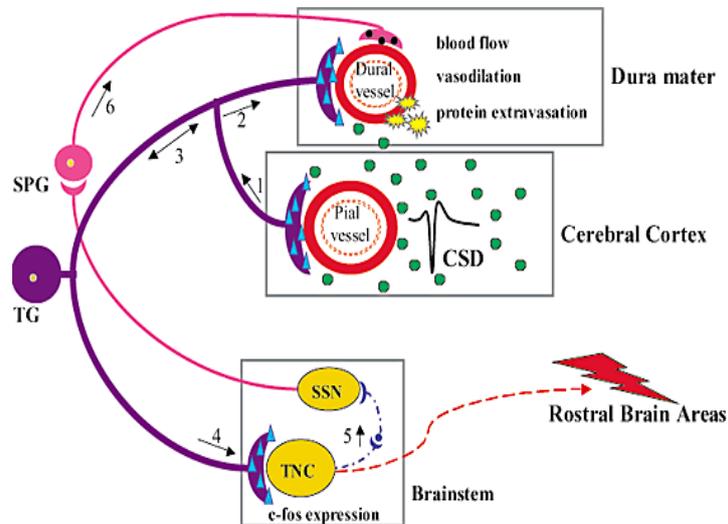


Figure 20. La DCE et la voie de la douleur

La DCE libère des ions, des neurotransmetteurs et des métabolites dans l'espace extracellulaire et périvasculaire et provoque une hyperémie transitoire et une vasodilatation dans les vaisseaux du cortex et de la dure-mère. Ces molécules activent ou sensibilisent les afférences périvasculaires du trijumeau (flèche 1) et transmettent les impulsions aux ganglions du trijumeau (TG) et au noyau trijumeau caudalis (TNC) (flèches 3 et 4). Les impulsions du TNC sont transmises aux structures cérébrales impliquées dans la transmission et le traitement de la douleur. Les afférences du trijumeau dural sont soit directement activées soit stimulées indirectement (flèche 2) et éventuellement sensibilisées par un œdème (étoiles jaunes) suite à la libération de neuropeptides vasoactifs (triangles bleus). L'activation du TNC ipsilatéral, à son tour, conduit à la stimulation du noyau salivateur supérieur (SSN ; flèche 5) et des efférents parasympathiques via les ganglions sphéno-palatins (flèche 6). Les parasympathiques postganglionnaires favorisent la vasodilatation et augmentent le débit en libérant du polypeptide intestinal vasoactif (VIP), de l'oxyde nitrique ou de l'acétylcholine (cercles noirs) dans la dure-mère (Bolay et coll., 2002).

4. Les canaux sodiques potentiel-dépendants $Na_v1.2$

Le canal $Na_v1.2$ est codé par le gène *SCN2A* situé sur le chromosome 2.

4.1 Distribution neuronale et spatio-temporelle des canaux $Na_v1.2$

Distribution neuronale des canaux $Na_v1.2$

Chez le rongeur comme chez l'Homme, les canaux $Na_v1.2$ sont principalement localisés au niveau des cellules pyramidales du cortex mais aussi au niveau de l'hippocampe, du cervelet, du striatum, du globus pallidus, du bulbe olfactif et de la moelle épinière (Gordon et coll., 1987) (Gong et coll., 1999) (Hu et coll., 2009) (Tian et coll., 2014) (Ogiwara et coll., 2018) (Nunes and Kuner, 2018). Ils sont majoritairement exprimés dans les neurones excitateurs mais on les retrouve également dans les neurones inhibiteurs dérivés de l'éminence ganglionnaire caudale (CGE) (Yamagata et coll., 2017). Pour rappel, les interneurones naissent dans le sous-pallium embryonnaire à partir de trois principales sources : l'éminence médiane ganglionnaire (MGE), l'éminence ganglionnaire caudale (CGE) et l'aire préoptique (POA) (Wonders and Anderson, 2006). Les canaux $Na_v1.2$ sont donc localisés au niveau des interneurones dérivés de la CGE et qui sont positifs au peptide vasoactif intestinal (VIP+) et à la reeline (reeline+) et négatifs à la somatostatine (SST-). En innervant les neurones inhibiteurs, ils jouent un rôle majeur dans la désinhibition.

Toutefois, il a été montré que les canaux $Na_v1.2$ sont également présents au niveau du SIA des neurones GABAergiques SST+ (Li et coll., 2014).

Distribution spatio-temporelle des canaux $Na_v1.2$

Les canaux $Na_v1.2$ sont localisés au niveau du soma, des dendrites et de l'axone démyélinisé ou en cours de myélinisation des neurones de mammifères (Westenbroek et coll., 1989) (Kaplan et coll., 2001). Très tôt dans le développement du SNC, ce sont les seuls canaux sodiques potentiels dépendants exprimés au niveau des nœuds de Ranvier, encore immatures ou en cours de maturation, et du SIA. En effet, des marquages immunohistochimiques ont permis de montrer que les canaux $Na_v1.2$ sont exprimés au niveau des nœuds de Ranvier démyélinisés des cellules ganglionnaires rétiniennes (CGR) du rat (Boiko et coll., 2001). Bien que la myélinisation de la rétine commence à se mettre en place à P6, les canaux $Na_v1.2$

restent majoritairement exprimés entre P9 et P10 dans les nœuds de Ranvier en cours de maturation. Ensuite ils sont graduellement remplacés par les canaux $Na_v1.6$. A P30, 50% des canaux $Na_v1.2$ sont toujours détectés au niveau des nœuds de Ranvier des CGR jusqu'à disparaître dans la quasi-totalité à P80. Cette distribution spatio-temporelle est retrouvée au niveau du système nerveux périphérique (SNP). Dans la même étude, les auteurs montrent qu'à P1 les canaux $Na_v1.2$ sont détectés au niveau des nœuds de Ranvier du nerf sciatique et qu'ils disparaissent à P7 (Boiko et coll., 2001). Cette disparition plus précoce est due au fait que la myélinisation dans le SNP se met en place plus tôt que dans le SNC. Par la suite, le même groupe montre la co-localisation des canaux $Na_v1.2$ avec l'ankyrine G au niveau du SIA des CGR (**Figure 21**). A P2, les canaux $Na_v1.2$ sont les seuls à être exprimés puis à P9 les canaux $Na_v1.6$ commencent à apparaître. En revanche, contrairement aux nœuds de Ranvier, les canaux $Na_v1.2$ ne disparaissent pas du SIA à l'âge adulte et avec l'apparition des canaux $Na_v1.6$ (Boiko et coll., 2003).

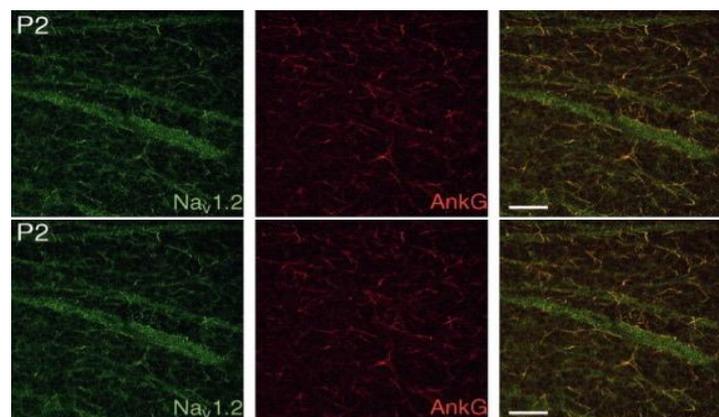


Figure 21. Localisation des canaux $Na_v1.2$ au SIA des cellules granulaires de la rétine de rat à P2. Les canaux (en vert) co-localisent avec l'ankyrine G (en rouge) qui marque le SIA (Boiko et coll., 2003).

Plus tard, Hu et coll étudient la distribution des canaux $Na_v1.2$ au SIA à partir de marquages sur les neurones pyramidaux de la couche 5 du cortex préfrontal de rat adulte (Hu et coll., 2009). Ainsi, ils montrent que les canaux $Na_v1.2$ co-localisent avec l'ankyrine G à environ $10\mu\text{m}$ du soma (**Figure 22A**), zone correspondant au SIA proximal tandis que les canaux $Na_v1.6$ sont localisés au niveau du soma distal (**Figure 22B**) c'est-à-dire à environ $30-50\mu\text{m}$ du soma où a lieu l'initiation des PA (Stuart et coll., 1997). Cette distribution distincte des

canaux $Na_v1.2$ et $Na_v1.6$ suggère que le rôle des canaux $Na_v1.2$ change au cours du développement car comme il a été décrit précédemment, à un stade très précoce le canal $Na_v1.2$ est le seul isoforme à être exprimé au niveau du SIA distal et à pouvoir initier et propager le PA (Boiko et coll., 2003).

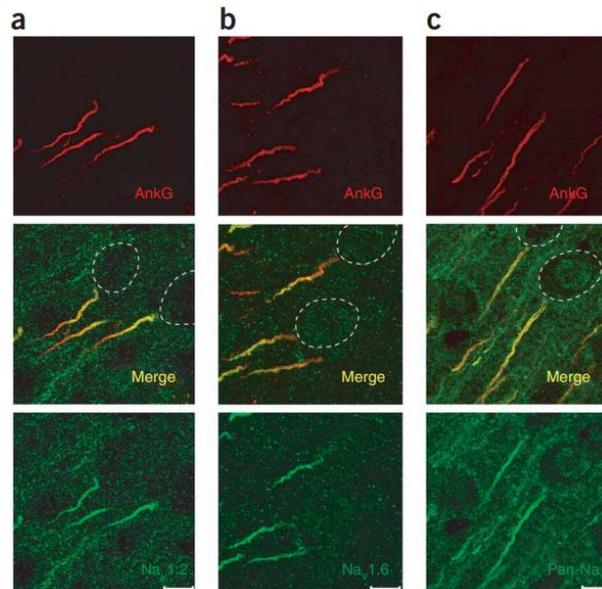


Figure 22. Distribution des canaux $Na_v1.2$ et $Na_v1.6$ dans le cortex préfrontal de rat adulte. Colocalisation des canaux $Na_v1.2$ (a) ou $Na_v1.6$ (b) ou Pan- Na_v (c) avec l'Ankyrine G. Les canaux sont représentés en vert et l'ankyrine G en rouge (Hu et coll., 2009).

4.2 Rôle des canaux $Na_v1.2$

A un stade précoce du développement, le rôle des canaux $Na_v1.2$ est de générer des PA au niveau du SIA distal puis de les propager le long de l'axone des neurones excitateurs. Après une semaine chez la souris (un an chez l'Homme), cette fonction est assurée par les canaux $Na_v1.6$ qui remplacent donc les canaux $Na_v1.2$ au SIA distal. Les canaux $Na_v1.2$ sont localisés au niveau du SIA proximal et jouent un rôle dans la rétropropagation des PA vers le soma et les dendrites (Boiko et coll., 2003) (Hu et coll., 2009). Le lien entre la distribution spatio-temporelle et la fonction des canaux $Na_v1.2$ a été récemment confirmé dans un modèle de souris hétérozygote $SCN2A^{+/-}$. Les neurones pyramidaux corticaux de ces souris ont une fréquence de décharge fortement réduite à P4 comparé aux neurones des souris WT. En revanche, cette réduction n'est pas retrouvée dans les neurones $SCN2A^{+/-}$ à P60 confirmant ainsi le rôle des canaux $Na_v1.2$ dans l'initiation et la propagation des PA à un stade précoce

du développement seulement. La rétropropagation des PA vers les dendrites ainsi que la fonction des synapses excitatrices des neurones matures sont également altérées chez ces souris. De plus, les épines dendritiques des neurones sont morphologiquement immatures (Spratt et coll., 2019). Dans le cerveau adulte, les canaux $\text{Na}_v1.2$ jouent donc un rôle important dans l'excitabilité dendritique et la fonction des synapses excitatrices. En ce qui concerne le comportement de ces souris $\text{SCN2A}^{+/-}$, les auteurs soulignent une différence entre les mâles et les femelles. En effet, les mâles montrent des déficits au niveau de l'apprentissage tandis que les femelles ont plutôt des déficits au niveau des préférences sociales. Des études récentes ont également montré que ces souris présentent des traits autistiques à l'adolescence tels que des déficits de la communication et de la mémoire s'atténuant à l'âge adulte (Lena and Mantegazza, 2019) ainsi que altérations au niveau de la mémoire et de l'apprentissage spatial (Shin et coll., 2019).

4.3 Pathologies associées aux mutations du gène *SCN2A*

L'Épilepsie Néonatale et Infantile Familiale Bénigne (ENIFB)

En 1998, Kaplan et Lacey décrivent pour la première fois chez une famille américaine, un phénotype intermédiaire entre les épilepsies néonatales familiales bénignes (ENFB) et les épilepsies infantiles familiales bénignes (EIFB) (Kaplan and Lacey, 1983).

Les ENFB sont causées par des mutations situées sur les gènes *KCNQ2* et *KCNQ3* codant respectivement pour les canaux potassiques $\text{K}_v7.2$ et $\text{K}_v7.3$ (Deprez et coll., 2009). Les crises apparaissent dès le 2^{ème} jour de vie et sont de type tonique ou clonique. Après quelques semaines, elles disparaissent dans la majorité des cas.

En ce qui concerne les EIFB, les crises apparaissent plus tard entre 4 et 8 mois. Elles peuvent être toniques, cloniques ou généralisées et disparaissent après un an.

Le phénotype décrit par Kaplan et Lacey est un intermédiaire entre ces deux épilepsies car le début des crises peut varier du 2^{ème} jour de vie à 3 mois et demi, d'où l'appellation d'épilepsie néonatale et infantile familiale bénigne (ENIFB). Les épilepsies sont dites bénignes car dans tous les cas l'enfant ne garde aucune séquelle.

Le gène SCN2A et l'ENIFB

En 2002, Héron et coll identifient chez deux familles différentes, deux mutations faux-sens, L1330F et L1563V, situées sur le gène *SCN2A* (Heron et coll., 2002). C'est la première fois que la sous-unité α -II des canaux sodiques potentiel-dépendants est directement liée à l'ENIFB. Deux ans plus tard, le même groupe identifie 6 autres mutations dont la mutation R1319Q qui est retrouvée dans 3 familles, ce qui renforce le lien établi entre le gène *SCN2A* et l'ENIFB (Berkovic et coll., 2004).

En 2006, Scalmani et coll étudient l'impact de 4 de ces mutations (L1330F, L1563V, R223Q et R1319Q) sur les propriétés biophysiques du canal sodique $\text{Na}_v1.2$ (Scalmani et coll., 2006). A partir de neurones pyramidaux en culture transfectés avec l'ADN codant soit pour le canal WT soit pour le canal porteur d'une des mutations, le groupe a montré que toutes les mutations conduisent à un gain de fonction des canaux $\text{Na}_v1.2$. Ainsi, les mutations responsables d'ENIFB entraînent une hyperexcitabilité des neurones pyramidaux pouvant être à l'origine des crises chez les patients. Ce pathomécanisme a été récemment confirmé par plusieurs études (Lauxmann et coll., 2013) (Liao et coll., 2010) (Xu et coll., 2007), dont une qui a montré grâce à des expériences de *dynamic-clamp* que la mutation L1563V conduit à une augmentation de la fréquence de décharge des neurones en réponse à un courant injecté (Berecki et coll., 2018).

Les encéphalopathies épileptiques

Les encéphalopathies épileptiques (EE) regroupent plusieurs syndromes épileptiques dans lesquels les crises entraînent un dysfonctionnement cérébral progressif (Scheffer et coll., 2017).

Parmi les plus connus, on retrouve le syndrome d'Ohtahara et l'épilepsie du nourrisson à crises focales migrantes (*EIFMS, epilepsy of infancy with migrating focal seizures*) qui se développe durant la période néonatale, les syndromes de Dravet (voir *SCN1A*) et West qui se développent avant l'âge d'un an et enfin le syndrome de Lennox-Gastaut qui apparaît plus tard entre 2 et 6 ans (Engel, 2001).

Dans le cas du syndrome d'Ohtahara et de l'épilepsie du nourrisson à crises focales migrantes, les crises apparaissent avant l'âge de 3 mois. On parle alors d'EE néonatales et infantiles précoces.

Dans le cas des syndromes de West et Lennox-Gastaut, les crises apparaissent après l'âge de 3 mois. Ils sont regroupés dans les EE infantiles.

Certaines EE, néonatales ou infantiles, ne sont pas classifiées.

Ces EE peuvent être causées par des mutations génétiques ou des altérations au niveau structural et/ou métabolique (Berg, 2004). L'origine de la pathologie reste inconnue dans un grand nombre de cas. Les EE ont pour caractéristique commune d'être pharmaco-résistantes.

- L'encéphalopathie épileptique chez le nouveau-né ou syndrome d'Ohtahara

Décrit pour la première fois en 1976, le syndrome d'Ohtahara (SO) est la forme la plus précoce des encéphalopathies épileptiques infantiles avec des crises qui apparaissent dès le 1^{er} jour de vie et au plus tard le 10^{ème} jour (Ohtahara et coll., 1976). Les patients présentent un retard psychomoteur très sévère et une espérance de vie faible. La moitié d'entre eux décèdent avant l'âge de 2 ans, les autres évoluent vers un syndrome de West puis Lennox-Gastaut.

Les patients atteints du SO ont un EEG spécifique de type « suppression-bursts » (**Figure 23**) constitué de bouffées d'activité paroxystique séparées par des phases de silence (Yamatogi and Ohtahara, 2002). De manière générale, les spasmes sont de type tonique ou tonico-cloniques et durent environ 10 secondes. Ils surviennent de manière isolée ou en groupe et peuvent être au nombre de 100 par jour. Parmi les autres symptômes chez le nouveau-né, on retrouve les mauvais réflexes de succion et l'hypotonie.

Ce syndrome est d'autant plus sévère que les crises sont pharmaco-résistantes. En effet, les anti-épileptiques tels que les benzodiazépines, le lévétiracétam ou encore le valproate sont très peu efficaces sur les patients. Le syndrome d'Ohtahara peut être causé par des malformations cérébrales, des troubles métaboliques ou des mutations génétiques. Le plus fréquemment, les mutations sont situées sur les gènes *KCNQ2* et *STXBPI* et représentent respectivement 20% et 7% des cas (Saitsu et coll., 2008) (Weckhuysen et coll., 2012).

Le gène *KCNQ2* code pour le canal potassique potentiel-dépendant $K_v7.2$ qui génère un courant potassique hyperpolarisant appelé I_m . Ce courant I_m s'active lentement avec la dépolarisation et ne s'inactive pas (Biervert et coll., 1998). Les mutations du gène *KCNQ2* conduisent toutes à une perte de fonction des canaux $K_v7.2$. Cette perte de fonction conduit à une réduction de l'inhibition au niveau du SIA et donc à une augmentation du nombre de PA générés par le neurone. Cette hyperexcitabilité serait donc à l'origine des crises chez le nouveau-né (Miceli et coll., 2013) (Orhan et coll., 2014) (Abidi et coll., 2015).

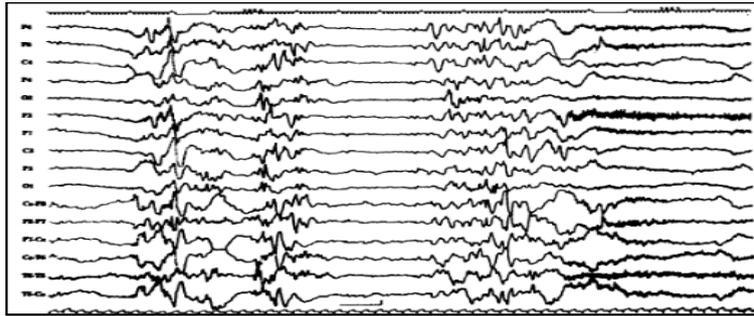


Figure 23. EEG de type « suppression-burst ». EEG enregistré chez un patient atteint du syndrome d'Ohtahara. L'amplitude des bursts est de 150 à 350 μ V et leur durée varie entre 1 et 3 secondes. Les phases de silence (tracé plat) durent 2 à 5 secondes (Yamatogi and Ohtahara, 2002).

Le gène *STXBPI*, pour « *syntaxin binding protein 1* », code pour la protéine Munc 18-1 qui s'associe aux protéines SNARE et joue un rôle essentiel dans la libération des vésicules synaptiques (Verhage et coll., 2000). Les mutations du gène *STXBPI* conduisent pour la plupart à une protéine instable avec 80% de réduction de l'expression de la protéine. Il en résulte une haploinsuffisance de la protéine Munc 18-1 au niveau de l'élément pré-synaptique, ce qui conduit à une altération de la libération des neurotransmetteurs. Ce mécanisme pathologique entraîne un déséquilibre de la balance excitation-inhibition pouvant être à l'origine d'une activité électrique anormale chez le nouveau-né (Kovacevic et coll., 2018). Parmi les autres gènes identifiés comme étant à l'origine du SO, il y a le gène *SCN2A*.

SCN2A et syndrome d'Ohtahara

En 2017, l'étude d'une cohorte de 201 patients révèle que 36% des mutations situées sur le gène *SCN2A* sont liées aux encéphalopathies épileptiques néonatales et infantiles précoces incluant le syndrome d'Ohtahara (**Figure 24**) (Wolff et coll., 2017).

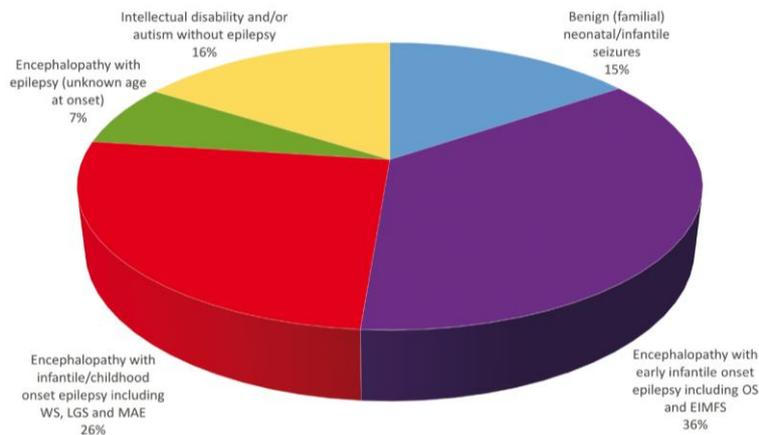


Figure 24. Distribution des patients porteurs d'une mutation *SCN2A* selon le phénotype et l'âge au début des crises. Les EE néonatales incluant le syndrome d'Ohtahara représentent 36% des patients (violet). Les EE infantiles représentent 26% des patients (rouge), l'autisme et la déficience intellectuelle concernent 16% des patients (jaune), les BFNIS représentent 15% des patients (bleu) et enfin 7% concernent les EE dont l'âge de début des crises est inconnu (vert). Cohorte de 201 patients (Wolff et coll., 2017).

L'étude fonctionnelle de deux mutations responsables du syndrome d'Ohtahara (V423L et F1597L) dans des cellules HEK, montrent qu'elles conduisent à un gain de fonction clair des canaux sodiques $Na_v1.2$ (Wolff et coll., 2017). Ces derniers étant majoritairement exprimés au niveau du SIA des neurones excitateurs, un gain de fonction conduit à une hyperexcitabilité neuronale pouvant être à l'origine des crises chez le nouveau-né.

Mais le mécanisme pathologique des mutations *SCN2A* responsables du syndrome d'Ohtahara n'est pas encore clairement élucidé. En effet, d'autres mutations conduisent à des effets divergents sur les propriétés biophysiques des canaux $Na_v1.2$, perte et/ou gain de fonction, ne permettant pas de conclure sur le pathomécanisme des encéphalopathies épileptiques néonatales (Begemann et coll., 2019). Il est donc important d'étudier les effets fonctionnels d'autres mutations afin de confirmer ou non le gain de fonction comme mécanisme

pathologique du syndrome d'Ohtahara, comme c'est déjà le cas avec les mutations du gène *KCNQ2*.

- Le syndrome de West ou spasmes infantiles

Ce syndrome est décrit en 1841 par le médecin William James West. Il décrit le phénotype de son fils âgé de 4 mois au moment de l'apparition de ses premières crises associées à un déficit du langage et des traits autistiques tels que des comportements stéréotypés (Cone, 1970).

Depuis, le syndrome de West est défini par 3 grands critères : 1/ des contractions involontaires des muscles appelés spasmes qui apparaissent entre 3 et 7 mois, isolés ou en série ils durent moins de 2 secondes et sont suivis d'un relâchement musculaire 2/ un retard psychomoteur et/ou une régression développementale 3/ un EEG de type hypersarythmie (**Figure 25**) constitué d'ondes cérébrales lentes, de pointes et d'ondes aigües pouvant varier dans la durée mais aussi la localisation (focale, multifocale ou plus rarement généralisée) (Gibbs et coll, Atlas of Electroencephalography 1952) (Kellaway et coll., 1979) (Lux and Osborne, 2004).

Bien qu'il s'agisse d'une EE pharmaco-résistante, le vigabatrin, l'anti-épileptique le plus utilisé dans le traitement du syndrome, suffit à supprimer les spasmes dans certains cas. Le vigabatrin est un analogue du GABA qui inhibe de façon sélective et irréversible l'enzyme responsable du catabolisme du GABA (la GABA-transaminase), ce qui a pour conséquence de renforcer la transmission GABAergique (French, 1999). L'hormone corticotrope ACTH peut être associée au vigabatrin car elle permet de contrôler les spasmes sur le long terme (Go et coll., 2012).

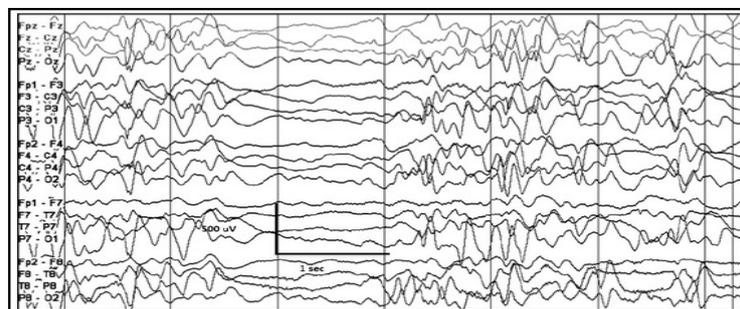


Figure 25. EEG de type hypersarrythmie. EEG désorganisé avec des ondes de grande amplitude (500-1000µV) enregistré chez un patient atteint du syndrome de West (Wong-Kiesel and Nickels, 2013).

- Le syndrome de Lennox-Gastaut

Le syndrome de Lennox-Gastaut est décrit pour la première fois en 1966 (Gastaut et coll., 1966). C'est une encéphalopathie épileptique sévère de l'enfant qui apparaît entre 2 et 6 ans (Berg et coll., 2001). Le plus souvent, les patients font des crises de type tonique et des absences atypiques (1989) (Arzimanoglou et coll., 2009). Les crises toniques se caractérisent par une contraction soutenue de l'ensemble des membres avec perte de connaissance. Les absences correspondent à de brèves périodes de non-réceptivité pendant lesquelles le patient a le regard dans le vide. Ces dernières surviennent plusieurs fois par jour et durent environ 10 secondes.

Des déficits cognitifs et un électroencéphalogramme (EEG) de type « slow spike wave » avec des pointes-ondes lentes et diffuses (<3 Hz) lors de la veille (**Figure 26**), et des rythmes rapides (10 Hz) pendant le sommeil sont associés aux crises (1989). Selon une étude, 20% des patients ont d'abord développé un syndrome de West (Hancock and Cross, 2009).



Figure 26. EEG de type « slow and spike wave discharges ». EEG avec des pointes-ondes lentes (70s, <3Hz) enregistré chez un patient atteint du syndrome de Lennox-Gastaut (Wong-Kisiel and Nickels, 2013).

SCN2A et EE infantiles (Syndromes de West et Lennox-Gastaut et EE infantiles non classifiées)

En 2004, le groupe de K Yamakawa identifie une mutation hétérozygote non-sens du gène *SCN2A* située à l'extrémité N-terminale intracellulaire du canal, R102X, chez une jeune femme atteinte d'une encéphalopathie épileptique depuis l'enfance (Kamiya et coll., 2004). La mutation est dite *de novo* ou spontanée car elle n'est pas transmise par les parents. Elle est localisée au niveau de l'extrémité intracellulaire C-terminale du canal.

Le phénotype de la patiente est similaire au syndrome de Dravet mais l'apparition plus tardive des crises ne permet pas de définir un syndrome précis. Les crises sont apparues à l'âge de 1 an et 7 mois et sont associées à un déficit cognitif sévère et des traits autistiques.

Des enregistrements de patch-clamp et des marquages immunocytochimiques sur des cellules HEK (*human embryonic kidney*), montre que la mutation entraîne une perte de fonction totale du canal $Na_v1.2$. Cette perte de fonction totale a été confirmée récemment par l'étude de souris transgéniques porteuses de la mutation R102X (Ogiwara et coll., 2018). La mutation entraîne une réduction de l'expression des canaux $Na_v1.2$ dans le cerveau d'environ 50%. Les enregistrements ECoG de ces souris révèlent des activités épileptiformes de type « *spike-and-wave discharges* » observée généralement dans les modèles d'absences épileptiques (Bertaso et coll., 2008). Le phénotype de ces souris est similaire à celui des souris hétérozygotes $SCN2A^{+/-}$ suggérant ainsi que la mutation R102X responsable d'EE infantile conduit à une perte de fonction des canaux $Na_v1.2$ (Ogiwara et coll., 2018).

En 2009, le même groupe identifie une nouvelle mutation *de novo* faux-sens, la mutation E1211K. (Ogiwara et coll., 2009). A l'âge de 11 mois les premiers spasmes apparaissent et l'enfant présente un retard du développement et une déficience intellectuelle sévère. Jusqu'à l'âge de 2 ans il est traité avec l'hormone corticotrope ACTH (voir syndrome de West) ; ce traitement s'avère efficace puisque les spasmes disparaissent. Depuis, les spasmes ont évolué vers des crises toniques qui durent 10 à 20 secondes et peuvent être au nombre de 10 par jour. L'étude des propriétés électrophysiologiques du canal $Na_v1.2$ porteur de la mutation E1211K dans des cellules HEK, montre que la mutation conduit à une perte et/ou gain de fonction du canal (activation, inactivation, récupération de l'inactivation). Les effets observés sur les propriétés biophysiques sont divergents et ne permettent pas de conclure sur l'effet global de la mutation.

Plus récemment, Berecki et coll ont étudié l'effet de 3 mutations $SCN2A$ dont une qui est retrouvée chez 12 patients souffrant de spasmes infantiles depuis l'âge de 8 mois environ (moyenne sur les 12 patients) et d'un retard du développement (Berecki et coll., 2018). Des expériences de patch-clamp sur cellules CHO (*chinese hamster ovary*) ont permis de mettre en évidence que cette mutation récurrente R853Q entraîne une diminution de la densité de courant et un déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés. De plus, en utilisant la technique du *dynamic-clamp* qui utilise la simulation informatique pour introduire une membrane artificielle ou des conductances synaptiques dans des neurones

biologiques, les auteurs montrent que la mutation R853Q conduit à une diminution de la fréquence de décharge des PA et donc à une perte de fonction du canal Na_v1.2. L'étude de cette mutation retrouvée chez 12 patients permet de renforcer le lien établi entre le gène *SCN2A* et les encéphalopathies épileptiques infantiles mais aussi de proposer la perte de fonction des canaux Na_v1.2 comme mécanisme pathologique.

Les troubles du spectre de l'autisme (TSA)

L'autisme est décrit pour la première fois en 1943 par le psychanalyste Leo Kanner. En observant le comportement de 11 enfants, 8 garçons et 3 filles, il a remarqué certaines caractéristiques telles que des difficultés à communiquer, des intérêts restreints et un langage non acquis (Kanner et coll, Nerv Child 1943). Suite à cette découverte, deux théories vont s'opposer pendant des années : celle des biologistes qui recherchent des explications génétiques ou neuro-développementales et celles des psychanalystes qui pensent que l'autisme est dû à une carence affective du milieu familial. Faute de preuves, cette dernière fut abandonnée.

Aujourd'hui, la classification internationale des maladies (CIM) définit les troubles du spectre de l'autisme (TSA) comme étant un trouble neuro-développemental qui se manifeste avant l'âge de 3 ans avec des déficits au niveau des interactions sociales et de la communication, des comportements stéréotypés et des intérêts restreints (CIM-10). De plus, 45% des autistes souffrent de déficience intellectuelle et près de 30% font des crises d'épilepsie (Lai et coll., 2014). La prévalence dans le monde est de 0.7 pour 100 personnes et le ratio est de trois garçons pour une fille (Elsabbagh et coll., 2012) (Loomes et coll., 2017). En France, 650 000 personnes sont concernées.

Les TSA peuvent être causés par des facteurs 1/ environnementaux tels que la pollution, l'exposition à des produits toxiques durant la grossesse (Flores-Pajot et coll., 2016) (Rossignol et coll., 2014) 2/ neurobiologiques tels que des malformations, une altération du système gabaergique ou de la balance excitation-inhibition (Rubenstein and Merzenich, 2003) (Sohal and Rubenstein, 2019) 3/ ou encore génétiques dans environ 60% des cas (Huguet et coll., 2016).

En 2003, l'équipe de Thomas Bourgeron identifie pour la première fois des mutations génétiques chez des enfants autistes (Jamain et coll., 2003). Les chercheurs découvrent des

mutations sur les gènes *NLGN3* et *NLGN4* codant pour les neuroligines, des protéines d'adhésion cellulaire localisées au niveau de l'élément post-synaptique des synapses. Les mutations altèrent la synaptogenèse et donc la transmission de l'information entre les neurones.

A ce jour, on comptabilise 102 gènes impliqués dans les TSA (Satterstrom et coll., 2020).

SCN2A et TSA

Le séquençage de l'exome entier a permis, depuis 2012, l'identification de plusieurs mutations sur le gène *SCN2A* chez les patients souffrant de TSA (Sanders et coll., 2012) (Jiang et coll., 2013) (Tavassoli et coll., 2014). Ces résultats ont mis en évidence que le gène *SCN2A* est fortement associé aux TSA (Sanders et coll., 2015). Les mutations identifiées sont *de novo* et peuvent être non-sens ou faux-sens.

Récemment, l'impact d'une dizaine de ces mutations sur les propriétés biophysiques des canaux $Na_v1.2$ a été étudié dans des expériences de patch-clamp dans des cellules HEK (**Figure 27**) (Ben-Shalom et coll., 2017).

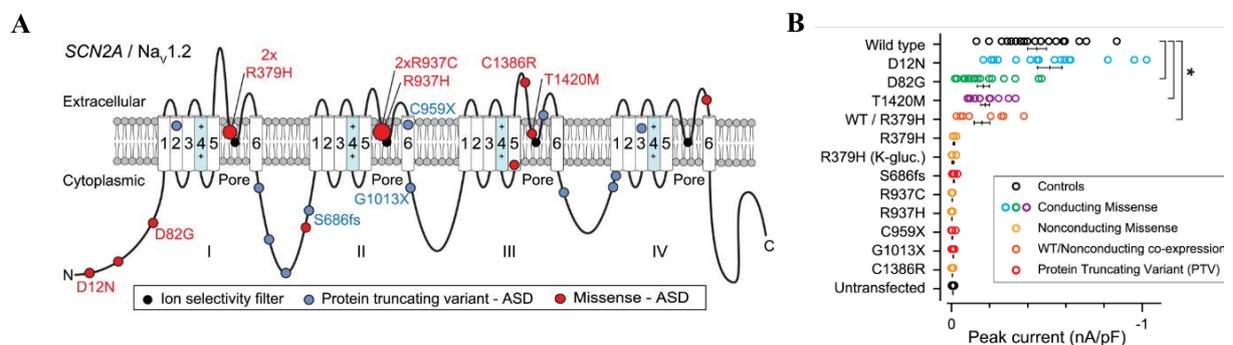


Figure 27. Effets fonctionnels des mutations *SCN2A* responsables de TSA. A/ Localisation des mutations *SCN2A* faux-sens (rouge) et non-sens (bleu) liées à l'autisme B/ Densités de courant des cellules HEK293 transfectées avec soit le canal $Na_v1.2$ WT soit le canal porteur d'une des mutations associées à l'autisme e représentées sur le canal (A) (WT: -447 ± 45 pA/pF, n = 18 ; D12N: -515 ± 65 pA/pF, n = 16 ; D82G: -166 ± 32 pA/pF, n = 18 ; T1420M: -177 ± 22 pA/pF, n = 13) (Ben-Shalom et coll., 2017).

Les mutations non-sens (C959X, G1013X) du gène *SCN2A* associées aux TSA ainsi que la majorité des mutations faux-sens (R379H, R937C, R937H et C1386R) conduisent à une perte de fonction totale des canaux sodiques (**Figure 27B**). Les auteurs concluent que les canaux sont exprimés à la surface de la cellule mais ne sont pas conductibles. Les mutations faux-

sens D12N, D82G et T1420M entraînent des modifications plus ou moins importantes des propriétés biophysiques et conduisent à une perte de fonction partielle des canaux sodiques $Na_v1.2$. Dans cette même étude, la co-expression du canal WT avec le canal porteur d'une des mutations faux-sens, R379H, conduisant à une perte de fonction totale des canaux $Na_v1.2$ a été analysée. La densité de courant des canaux WT est diminuée de manière significative en présence des canaux porteurs de la mutation (**Figure 27B**) mais aucun effet sur les propriétés biophysiques n'est observé. L'ensemble de ces résultats montre que les mutations *SCN2A* responsables de TSA conduisent à une perte de fonction, partielle ou totale, des canaux sodiques $Na_v1.2$.

La schizophrénie

La schizophrénie est une maladie chronique caractérisée par une vaste gamme de symptômes tels que des hallucinations et idées délirantes, un retrait social et des troubles cognitifs apparaissant à la fin de l'adolescence. L'hypothèse d'une origine génétique de la schizophrénie est apparue en 2010 avec la mise en évidence d'une mutation *de novo* non-sens située sur le gène *KIF17* chez un patient atteint de schizophrénie. Cette mutation a été identifiée grâce à l'analyse de l'ensemble de l'exome du patient (Tarabeux et coll., 2010). Ce gène code pour la kinésine 17 qui est une protéine présente au niveau des synapses glutamatergiques et jouant un rôle important dans la localisation de la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA (Guillaud et coll., 2003). Par la suite, l'analyse de l'ensemble de l'exome de plus de 600 patients atteints de schizophrénie a permis l'identification de nombreuses mutations *de novo* affectant principalement les protéines post-synaptiques tels que les récepteurs NMDA (Fromer et coll., 2014). En 2016, Carroll et coll ont identifié les premières mutations situées sur le gène *SCN2A* de patients schizophrènes (Carroll et coll., 2016).

SCN2A et schizophrénie

En 2014, Dickinson et coll identifient, à partir d'une cohorte de 339 patients atteints de schizophrénie, des polymorphismes mononucléotidiques associés à la capacité cognitive générale (g) dans le gène *SCN2A*. Ils suggèrent que le gène *SCN2A* est impliqué dans la déficience cognitive des patients souffrant de schizophrénie (Dickinson et coll., 2014). Depuis, seulement 4 mutations (3 faux-sens et 1 non-sens) du gène *SCN2A* ont été liées à la schizophrénie (Carroll et coll., 2016) (Suddaby et coll., 2019).

Les mutations faux-sens R850P, V1282F et S1656P sont localisées respectivement au niveau du S4 de DII, du S3 de DIII et de la boucle cytoplasmique reliant le S4 au S5 de DIV et la mutation non-sens E169X est localisée sur le S2 de DI. Aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée à ce jour.

De manière intéressante, il existe des symptômes communs entre les patients atteints de schizophrénie et ceux souffrant de TSA tels que le retrait social ou les problèmes de langage ce qui laisse penser que ces deux pathologies puissent avoir des mécanismes pathologiques en commun (De Crescenzo et coll., 2019) (Mi et coll., 2019).

II. OBJECTIFS

Les gènes *SCN1A* et *SCN2A* codent respectivement pour les canaux sodiques potentiel-dépendants $Na_v1.1$ et $Na_v1.2$. Les canaux $Na_v1.1$ sont majoritairement exprimés au niveau des neurones inhibiteurs tandis que les canaux $Na_v1.2$ sont présents au niveau des neurones excitateurs. Ils sont localisés au niveau des nœuds de Ranvier, du SIA et du compartiment somato-dendritique (Mantegazza and Catterall, 2012).

Les gènes *SCN1A* et *SCN2A* sont la cible de nombreuses mutations conduisant à divers phénotypes. Les mutations du gène *SCN1A* sont responsables de formes d'épilepsie plus ou moins sévères ou de migraine hémiplégique familiale (MHF-3) et les mutations du gène *SCN2A* sont responsables d'un large spectre de pathologies qui comprend les troubles du spectre de l'autisme (TSA) avec ou sans épilepsie, les épilepsies bénignes, les encéphalopathies épileptiques (EE) infantiles ou néonatales, la schizophrénie, la déficience intellectuelle et les absences (Mantegazza and Broccoli, 2019) (Guerrini et coll., 2014) (Hedrich et coll., 2019).

L'objectif de ma thèse est d'étudier les effets fonctionnels de ces mutations sur les propriétés des canaux $Na_v1.1$ et $Na_v1.2$ et de l'excitabilité neuronale dans le but d'identifier les mécanismes à l'origine de ces pathologies.

Objectif 1 : Caractérisation d'une nouvelle mutation du gène *SCN1A* responsable de la MHF-3 et présentant des défauts de repliement et/ou trafic cellulaire

A ce jour, il est clairement établi que certaines mutations du gène *SCN1A* peuvent conduire à la formation de canaux qui présentant des défauts de repliement et/ou de trafic cellulaire. Les canaux mutés sont retenus dans le réticulum endoplasmique (RE) puis dégradés par le protéasome. Ils sont peu (ou pas) présents à la membrane plasmique, ce qui se traduit par une réduction partielle (ou totale) de la densité de courant des cellules qui génèrent peu (ou pas) de courant sodium (Terragni et coll., 2018).

Ces défauts d'expression des canaux peuvent être partiellement ou totalement « corrigés » *in vitro*. Si les canaux sont transfectés dans des lignées cellulaires de type tsA-201, on peut soit incubé les cellules à 30°C au lieu de 37°C, afin de ralentir les cinétiques de repliement soit co-transfecter des protéines telles que l'ankyrine G ou la calmoduline qui, en interagissant avec les canaux mutés, vont stabiliser leur conformation. Dans les 2 cas, il en résulte une augmentation du nombre de canaux mutés à la membrane plasmique se traduisant par une restauration partielle ou totale de la densité de courant.

Si les canaux sont transfectés dans des neurones en culture, on peut aussi observer une « correction » de ces défauts, probablement due à la présence de protéines d'interaction endogènes qui permettent aux canaux mutés de rejoindre la surface de la cellule.

Notre équipe a montré, que les canaux porteurs de mutations *SCN1A* responsables de l'épilepsie et présentant des défauts d'adressage à la surface cellulaire, conduisent à une perte de fonction des canaux $Na_v1.1$ après récupération partielle de la densité de courant (Rusconi et coll., 2007) (Rusconi et coll., 2009) (Bechi et coll., 2015). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment qui ont montré que la perte de fonction des canaux $Na_v1.1$ entraîne une hypoexcitabilité des interneurons GABAergiques conduisant à une hyperexcitabilité du réseau neuronal et à la génération des crises d'épilepsie (Yu et coll., 2006).

Plus récemment, notre équipe a étudié la 1^{ère} mutation *SCN1A*, responsable de la MHF-3 et qui présente des défauts d'adressage à la surface cellulaire, la mutation faux-sens L1649Q. L'étude fonctionnelle de cette mutation dans des cellules tsA-201 révèle qu'elle entraîne une réduction importante de la densité de courant conduisant à une perte de fonction des canaux $Na_v1.1$ (Cestele et coll., 2013b). Or, les mutations *SCN1A* dans la MHF-3 conduisent à un gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ (Cestele et coll., 2013b) (Fan et coll., 2016) (Mantegazza and Cestele, 2018). Le gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ induit une hyperexcitabilité des interneurons GABAergiques conduisant à une accumulation importante de potassium dans le milieu intracellulaire. Puis, les neurotransmetteurs tels que le glutamate et le GABA vont s'accumuler, ce qui aura pour conséquence de dépolariser fortement les neurones corticaux et de déclencher la dépression corticale envahissante (DCE) à l'origine de la MHF-3 (Cestele et coll., 2008). Le lien entre le gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ dans les interneurons GABAergiques et la DCE est encore une hypothèse. Toutefois, l'hypothèse a été récemment validée avec un model computationnel (Desroches et coll., 2019).

Par conséquent, la perte de fonction des canaux $Na_v1.1$ porteurs de la mutation L1649Q va à l'encontre du mécanisme pathologique de la MHF-3.

Fait intéressant, l'utilisation de différentes méthodes de « correction » des défauts d'adressage des canaux mutés telles que l'incubation des cellules tsA-201 à 30°C ou encore l'étude de la mutation dans des neurones néocorticaux en culture transfectés a permis d'une part de restaurer la densité de courant et d'autre part d'étudier les propriétés biophysiques des canaux

mutés grâce à des enregistrements de patch-clamp. De manière surprenante, la mutation L1649Q conduit à un gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ après restauration de la densité de courant.

Notre équipe a ainsi identifié deux mécanismes différents. Après « correction » partielle ou totale des défauts d'adressage à la surface cellulaire, toutes les mutations *SCN1A* responsables de l'épilepsie conduisent à une perte de fonction des canaux $Na_v1.1$ (Rusconi et coll., 2007) (Rusconi et coll., 2009) (Bechi et coll., 2015) tandis qu'une mutation *SCN1A* responsable de la MHF-3 conduit à un gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ (Cestele et coll., 2013b). Toutefois, si le mécanisme est clair pour l'épilepsie avec au moins 6 mutations identifiées qui présentent le même mécanisme, ce n'est pas le cas pour la MHF-3. Cela est dû au fait qu'à ce jour, la mutation L1649Q est la seule mutation MHF-3 à présenter des défauts d'adressage à la surface cellulaire.

Le 1^{er} objectif de ma thèse a donc été de caractériser une mutation *SCN1A* nouvellement identifiée dans la MHF-3 et qui présente des défauts d'expression conduisant à la perte de fonction des canaux $Na_v1.1$ (résultats préliminaires obtenus par l'équipe).

Objectif 2 : Relation phénotype/génotype de 23 mutations *SCN2A*

La seconde partie de ma thèse est ciblée sur l'étude de mutations situées sur le gène *SCN2A*, responsables d'un large spectre de pathologies.

Les études fonctionnelles réalisées précédemment par l'équipe ont montré que les mutations associées à l'Épilepsie Néonatale et Infantile Familiale Bénigne (ENIFB) induisent un gain de fonction des canaux $Na_v1.2$. Ce gain de fonction entraîne une hyperexcitabilité des neurones excitateurs et de l'ensemble du réseau neuronal pouvant être à l'origine des crises d'épilepsie (Scalmani et coll., 2006).

En revanche, si le mécanisme est clair pour l'ENIFB, ce n'est pas le cas pour les autres pathologies.

En effet, comme il a été décrit précédemment dans la partie *SCN2A et TSA*, le groupe de Bender a étudié l'impact d'une dizaine de mutations *SCN2A* sur les propriétés biophysiques des canaux $Na_v1.2$ exprimés dans des cellules HEK (Ben-Shalom et coll., 2017). Le groupe montre que les mutations non-sens ainsi que la majorité des mutations faux-sens conduisent à une perte de fonction totale des canaux sodiques. Les auteurs concluent que les canaux sont exprimés à la surface de la cellule mais ne sont pas conductibles. Or, comme notre équipe l'a

montré pour les canaux $\text{Na}_v1.1$, les canaux porteurs d'une mutation peuvent présenter des défauts de repliement ou de trafic cellulaire. Ainsi ils sont retenus dans le RE puis sont dégradés par le protéasome. Ils ne sont donc pas présents à la surface cellulaire, d'où l'absence de courant sodique. Dans cette même étude, les auteurs se sont intéressés à l'effet de la co-expression du canal WT avec le canal porteur de la mutation R379H, une mutation liée à l'autisme et qui induit une réduction quasi-totale de la densité de courant des canaux.

La présence du canal muté entraîne une diminution de la densité de courant des canaux WT mais n'ayant aucun effet sur les propriétés biophysiques ils concluent que le mutant n'exerce aucune dominance négative. Or, la réduction de la densité de courant des canaux sauvages en présence des canaux mutés peut être la conséquence d'une dominance négative (*voir partie Dimérisation et dominance négative*).

L'ensemble de ces résultats révèle que les mécanismes liés aux mutations *SCN2A* dans les TSA ne sont pas clairs.

De plus, en ce qui concerne les mutations responsables d'encéphalopathies épileptiques néonatales ou infantiles, il a été montré qu'elles conduisent à un gain de fonction et/ou une perte de fonction lorsqu'elles sont exprimées dans des lignées cellulaires de type HEK (Ogiwara et coll., 2009) (Berecki et coll., 2018) (Wolff et coll., 2017) (Begemann et coll., 2019). Pour les mutations liées à la schizophrénie et aux absences, aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée à ce jour.

Afin de mieux comprendre ces mécanismes, nous avons étudié dans un 1^{er} temps les effets fonctionnels de 23 mutations hétérozygotes situées sur le gène *SCN2A* et responsables de différentes pathologies : les TSA, les EE infantiles, le syndrome d'Ohtahara (EE néonatale), la schizophrénie, les absences et les TSA associés à l'épilepsie (**Figure 28**).

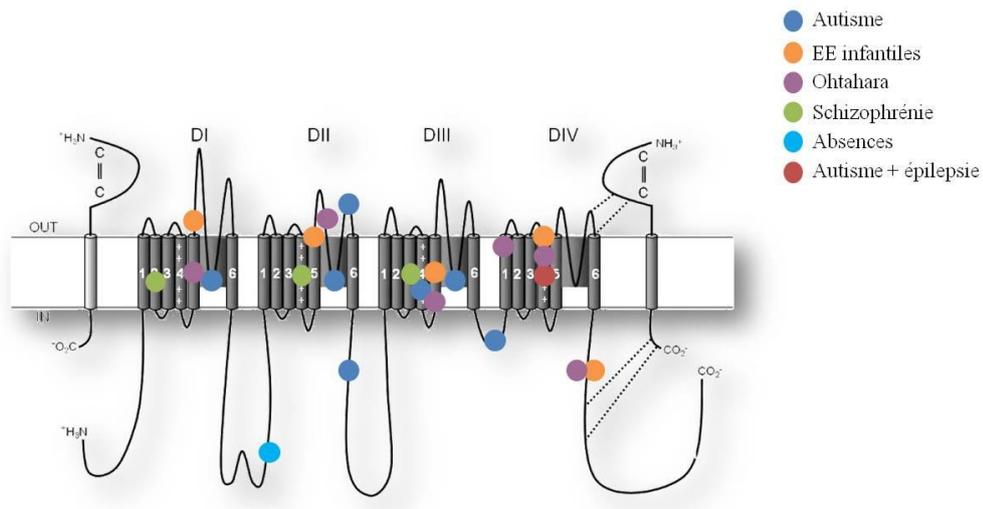


Figure 28. Localisation des 23 mutations *SCN2A* étudiées

Localisation des 23 mutations *SCN2A* associées à l'autisme (bleu foncé), aux EE infantiles (orange), au syndrome d'Ohtahara (violet), à la schizophrénie (vert), aux absences (bleu clair) et à l'autisme associé à l'épilepsie (rouge foncé).

Dans un 2nd temps, nous avons étudié l'impact fonctionnel de chaque canal porteur d'une de ces 23 mutations sur les canaux WT afin de déterminer si les canaux mutés peuvent interagir avec les canaux WT et exercer un effet de dominance négative.

Toutes les mutations ont été étudiées dans des neurones néocorticaux en culture car comme nous avons pu le voir précédemment avec les mutations *SCN1A*, les canaux mutés peuvent se comporter différemment selon s'ils sont exprimés dans des lignées cellulaires ou dans des neurones en culture qui se rapprochent des conditions physiologiques.

III. MATERIEL ET METHODES

1. Mutagenèse dirigée et clonage

L'introduction des mutations dans le gène *SCN2A* a été réalisée en utilisant le kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent). Le plasmide pCDM8-*SCN2A* est amplifié par PCR en utilisant des amorces, d'environ 30 paires de bases, contenant la mutation selon le protocole décrit sur la **figure 29**.

Les clones contenant la mutation d'intérêt sont amplifiés, l'ADN est purifié en utilisant le Kit NucleoBond XtraMidi (Macherey Nagel) et la séquence est entièrement vérifiée par séquençage Sanger.

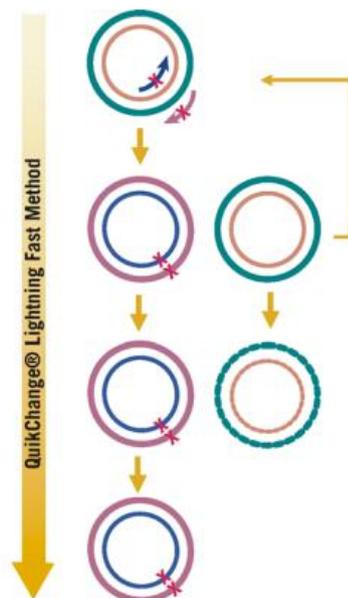


Figure 29. Principales étapes de la mutagenèse dirigée avec digestion du brin parental. La 1^{ère} étape correspond à l'amplification de l'ADN parental et de l'ADN synthétisé après le premier cycle de PCR (1 heure). La 2^{ème} étape correspond à la digestion de l'ADN parental par l'enzyme DpnI (5 minutes). La 3^{ème} étape correspond à la transformation des plasmides contenant la mutation dans des bactéries (1.5 heure).
D'après QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual.

pCDM8-SCN2A	
pCDM8-SCN2A ^{F382S}	t1154c
pCDM8-SCN2A-HA	867 tacccatac gatgttccagattacgct
pCDM8-SCN2A ^{E169X}	g505t
pCDM8-SCN2AHA ^{E169X}	867 tacccatac gatgttccagattacgct g505t
pCDM8-SCN2A ^{A263V}	c788t
pCDM8-SCN2A ^{D284G}	a851g
pCDM8-SCN2A ^{R379H}	g1136a
pCDM8-SCN2A-HA ^{R379H}	867 tacccatac gatgttccagattacgct g1136a
pCDM8-SCN2A ^{S487A}	t1447g
pCDM8-SCN2A ^{G659D}	g1976a
pCDM8-SCN2A ^{A896V}	c2687t
pCDM8-SCN2A ^{R850P}	g2549c
pCDM8-SCN2A ^{M925T}	t2774c
pCDM8-SCN2A ^{R937H}	g2810a
pCDM8-SCN2A-HA ^{R937H}	867 tacccatac gatgttccagattacgct g2810a
pCDM8-SCN2A ^{C959X}	c2877a
pCDM8-SCN2A-HA ^{C959X}	867 tacccatac gatgttccagattacgct c2877a
pCDM8-SCN2A ^{G1013X}	g3037t
pCDM8-SCN2A-HA ^{G1013X}	867 tacccatac gatgttccagattacgct g3037t
pCDM8-SCN2A ^{V1282F}	g3844t
pCDM8-SCN2A ^{L1314P}	t4022g
pCDM8-SCN2A-HA ^{L1314P}	867 tacccatac gatgttccagattacgct t4022g

pCDM8-SCN2A ^{A1316V}	c3947t
pCDM8-SCN2A ^{C1344Y}	g4031a
pCDM8-SCN2A ^{T1420M}	c4259t
pCDM8-SCN2A ^{R1515X}	c4543t
pCDM8-SCN2A ^{R1515X}	867 tacccatac gatgttccagattacgct c4543t
pCDM8-SCN2A ^{M1548T}	t4643c
pCDM8-SCN2A ^{R1626X}	c4876t
pCDM8-SCN2AHA ^{R1626X}	867 tacccatac gatgttccagattacgct c4876t
pCDM8-SCN2A ^{R1629H}	g4886a
pCDM8-SCN2A ^{R1635Q}	g4904a
pCDM8-SCN2A ^{R1882Q}	g5645a
pCDM8-SCN2A ^{R1882X}	c5644t
pcDNA3-KCNJ10	
pEYFP-C1	
pEYFP-C1-difopein	
pcDNA3-KCNK2-2*HA	

Tableau 1. Liste des plasmides utilisés dans notre étude

Pour étudier les mutations dans les neurones néocorticaux en culture, la mutation F385S a été insérée dans chaque gène codant pour le canal WT ou porteur d'une mutation. La substitution du résidu phénylalanine par un résidu sérine en position 385 confère au canal une résistance à la tétrodotoxine (TTX). En ajoutant de la TTX (1 μ M) dans la solution d'enregistrement extracellulaire des neurones transfectés, les courants sodiques endogènes sont bloqués et seuls les courants générés par le canal transfecté sont enregistrés.

2. Culture de neurones néocorticaux

Un jour avant la dissection, des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre sont traitées avec de la poly-L-Lysine hydrobromide. Un jour avant la dissection, des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre sont traitées avec de la poly-L-Lysine hydrobromide. Un jour avant la culture, 2 mg de poly-L Lysine (Sigma) sont ajoutés dans un tube contenant 40 ml d'eau pure. Après homogénéisation, 1 ml est versé dans chaque boîte de Pétri. Les 40 boîtes sont ensuite incubées dans un incubateur en conditions standard (37°C, 5% CO₂) entre 4 et 24 heures. Elles sont rincées 2 fois avec 1 ml d'eau pure juste avant de déposer les neurones. La solution de dissection ainsi que le milieu de culture des neurones sont également préparés le jour précédant la dissection (voir solutions).

Les souris OF1 gestantes (Charles River) sont anesthésiées à l'isoflurane avant d'être sacrifiées par dislocation cervicale au 17^{ème} jour de gestation.

Après avoir incisé l'abdomen, les embryons sont libérés du placenta et placés sur de la glace. L'embryon est sacrifié par décapitation et la tête placée dans une boîte contenant du milieu de dissection froid. A partir de cette étape, la dissection se fait sous une loupe binoculaire. La peau de la tête est retirée à l'aide de pinces fines puis le crâne est découpé latéralement. Le cerveau peut être retiré délicatement du crâne en utilisant une spatule courbée (**Figure 30**).

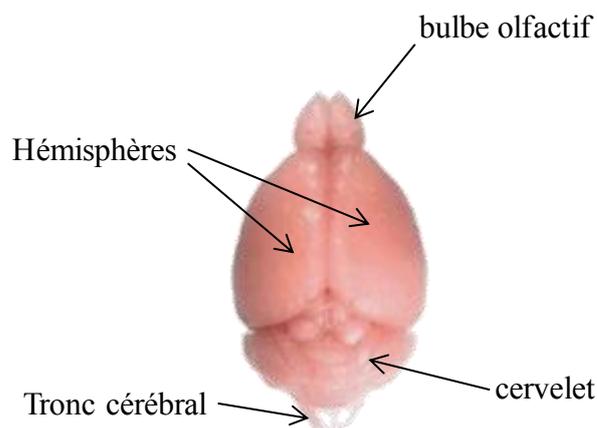


Figure 30. Cerveau d'embryon de souris à E17. Les embryons sont prélevés chez des souris OF1 au 17^{ème} jour de gestation.

Après avoir rincé le cerveau, le cervelet est retiré et les deux hémisphères sont séparés. Pour isoler le cortex de chaque hémisphère 1/ le septum, le thalamus et l'hypothalamus sont retirés à l'aide de pinces très fines 2/ l'hippocampe et le bulbe olfactif sont découpés 3/ et pour finir les méninges et les microvaisseaux sanguins sont retirés délicatement avec des pinces très fines.

Une fois isolés, les cortex sont découpés en petits morceaux de 1mm^3 et transférés dans un tube Falcon de 50 ml contenant 15 ml de solution de dissection et 20 mg de protéase XIV (Sigma) permettant la digestion du cortex. Le tube est agité pendant 20 minutes à 37°C (agitation 400x g).

A partir de cette étape, la mise en culture se fait sous une hotte stérile.

Après digestion enzymatique, le surnageant est aspiré et les bouts de cortex sont rincés deux fois avec du milieu de dissection à température ambiante. Ensuite, les neurones sont dissociés mécaniquement à l'aide de pipettes Pasteur en verre (3 diamètres différents) dans 5 ml de milieu de dissection. Les neurones sont dissociés, dans l'ordre, avec une pipette Pasteur de gros, moyen puis petit diamètre. A chaque fois, le surnageant (surface trouble) est récupéré et transféré dans un second tube. Ensuite, 5 ml de milieu de culture Neurobasal complet à 37°C sont ajoutés à la solution contenant les neurones dissociés.

Pour le comptage des neurones, un tube eppendorf contenant 0.5 ml de Bleu Tryptan à 0.4% (marquage des cellules mortes), 0.3ml de milieu Neurobasal Complet et 0.2ml de milieu contenant les neurones dissociés (dilution au 5^{ème}) est préparé.

La densité des cellules est estimée à l'aide d'un hémostomètre et ajustée à 500 000 cellules/ml. Les boîtes de culture, contenant la poly-L-Lysine, sontensemencées à raison de 500 000 cellules par boîte et placées dans un incubateur en conditions standard (37°C , 5% CO_2).

Après une heure d'incubation, le milieu des neurones est changé avec 2ml de milieu Neurobasal complet à 37°C .

La solution nécessaire à la dissection des neurones contient: 1 mM d'acide kynurénique, 134 mM d'acide iséthionique, 2 mM de chlorure de potassium, 8 mM de chlorure de magnésium hexahydrate, 0.1 mM de chlorure de calcium dihydrate, 23 mM de glucose, 15.5mM d'hepes. Le pH est ajusté à 7.2 avec du NaOH. Ensuite la solution est filtrée puis stockée à 4°C pendant une semaine maximum.

Pour chaque dissection, 2 tubes de milieu Neurobasal complet de 50ml sont préparés. Chaque tube contient : 48.5 ml de milieu Neurobasal (Fisher scientific, 21103-049, 500ml), 1 ml de supplément B-27 50X (Fisher scientific, 17504-044, 10ml), 250 µl GlutaMAX I (Fisher scientific, 35050-038, 100ml), 250 µl Pénicilline/Streptomycine (Fisher scientific, 15140-122, 100ml) et 5 µl bFGF (R&D Biosystems, 3139-FB-025, 25µg)

Le milieu peut être utilisé pendant une semaine.

3. Transfection des neurones néocorticaux en culture avec la Lipofectamine 2000

Les neurones ont été transfectés entre 3 et 8 jours *in vitro* par lipofection en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Ils sont enregistrés 24 heures après la transfection.

La lipofection, également connue sous le nom de «transfection lipidique» ou «transfection à base de liposomes», utilise un complexe lipidique pour délivrer l'ADN aux cellules (**Figure 31**). Cette technologie utilise de minuscules structures vésiculaires appelées liposomes qui ont la même composition que la bicouche phospholipidique de la membrane des cellules animales. Une réaction simple (**Figure 32**) permet de former un liposome autour du plasmide contenant la séquence d'ADN à transfecter. Le liposome contenant le plasmide peut être endocyté ou fusionner directement avec la membrane cellulaire pour libérer la construction d'ADN dans les neurones.

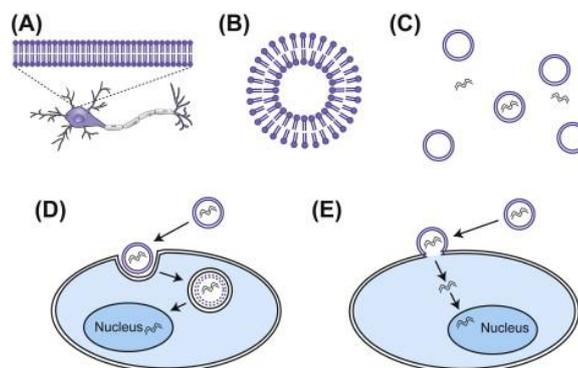
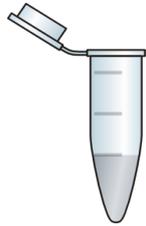
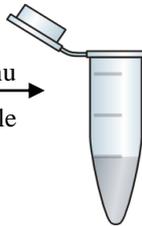


Figure 31. Principe de la lipofection. (A) La membrane cellulaire est composée d'une bicouche lipidique, avec un intérieur hydrophobe et un extérieur hydrophile. (B) Les liposomes sont également composés d'une bicouche lipidique disposée comme une coquille sphérique. (C) Réaction qui permet aux liposomes de se former autour de l'ADN. (D) Les cellules en culture peuvent endocyter le liposome, le digérant dans les vésicules pour libérer l'ADN. (E) Alternativement, les liposomes peuvent directement fusionner avec la membrane plasmique, libérant directement l'ADN dans les cellules

Tube 1
242 μ l de milieu OptiMem
+ ADN (voir tableau)

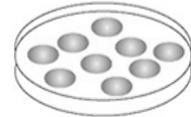


Mettre le contenu
du Tube 1 dans le
Tube 2



Incubation 20 min à T°C
ambiante et application
sur les cellules

Incubation 24h
37°C 5% CO₂



Tube 2
242 μ l de milieu OptiMem
+ 7.5 μ l de Lipofectamine 2000



Figure 32. Transfection des cellules à la lipofectamine 2000. Le tube 1 contenant l'ADN est versé, goutte à goutte, dans le tube 2 qui contient l'agent de transfection (Lipofectamine 2000). Après homogénéisation le tube contenant le mélange est incubé à température ambiante pendant 20 minutes pour permettre la formation des liposomes autour des plasmides contenant la séquence d'ADN codant pour notre gène d'intérêt. Après l'incubation, le mélange est versé dans les boîtes de Pétri de 35 mm contenant les neurones néocorticaux en culture. Les neurones sont stockés dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ jusqu'aux enregistrements.

4. Transfection au phosphate de calcium des cellules tsA-201 et des neurones plus matures

Les cellules sont mises en culture dans un milieu DMEM-F12 contenant les antibiotiques pénicilline/streptomycine et 10% de sérum bovin fœtal (FBS). La transfection au phosphate de calcium est une méthode rapide, simple, efficace et peu coûteuse qui consiste à transférer des cellules eucaryotes par co-précipitation du phosphate de calcium avec de l'ADN (**Figure 33**). Le précipité de phosphate de calcium insoluble avec l'ADN attaché adhère à la surface cellulaire et est introduit dans les cellules par endocytose.

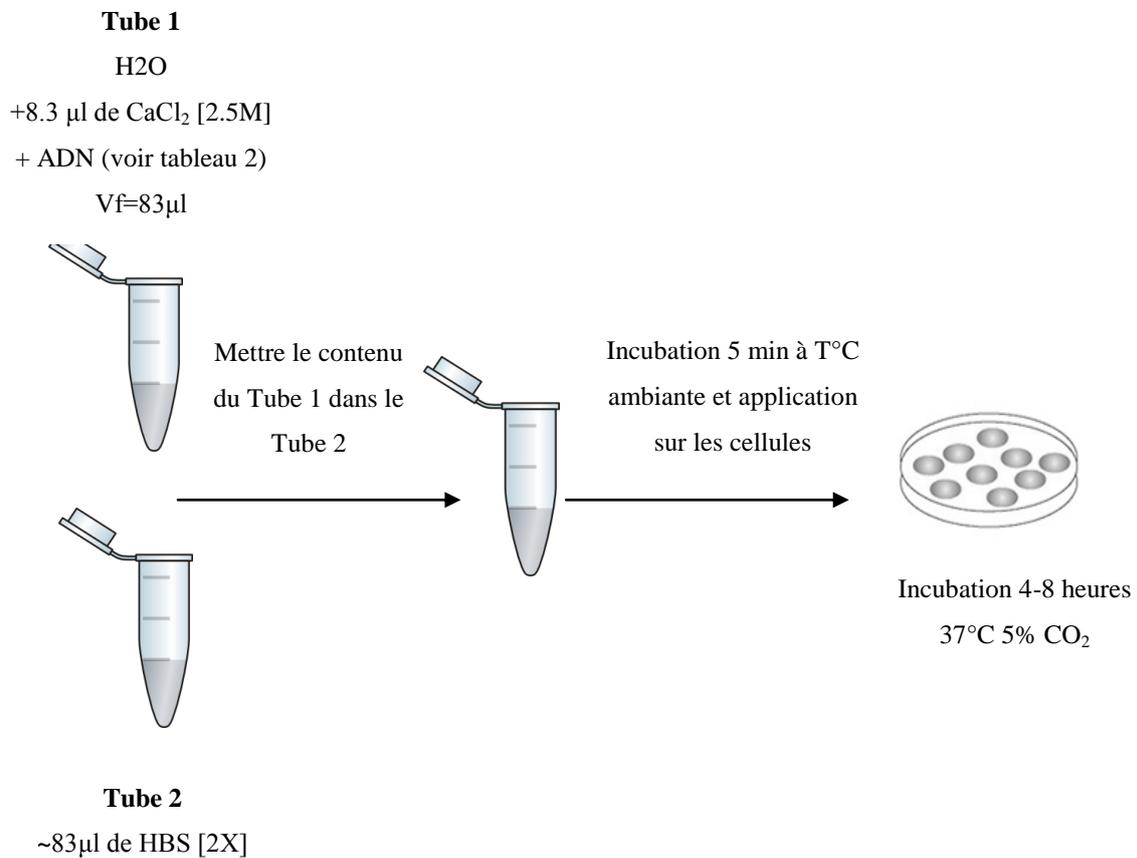


Figure 33. Transfection des cellules au phosphate de calcium. Le tube 1 contenant l'ADN est versé, goutte à goutte, dans le tube 2 qui contient du HBS 2X. Après homogénéisation le tube contenant le mélange est incubé à température ambiante pendant 5 minutes. Après l'incubation, le mélange est versé dans les boîtes de Pétri de 35 mm contenant les cellules tsA-201 en culture. Les cellules sont stockées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ pendant 4 à 8 heures.

Après avoir incubé les cellules tsA-201 avec le phosphate de calcium et l'ADN pendant 4 à 8 heures, le milieu est aspiré et les cellules sont détachées délicatement au PBS/EDTA puis elles sont divisées dans des nouvelles boîtes de Pétri contenant du milieu de culture DMEM. La division des cellules permet d'avoir des cellules isolées, indispensables pour le patch-clamp.

Les neurones enregistrés pour le current-clamp entre 9 et 15 jours in vitro ont été transfectés avec du calcium phosphate. En effet, nous avons constaté que la lipofectamine augmente fortement le taux de mort cellulaire chez les neurones plus matures. Cependant, nous avons ajouté une étape supplémentaire indispensable à la transfection au calcium phosphate classique. Après incubation des neurones avec le calcium phosphate et l'ADN (entre 3 et 4 heures), le précipité formé est dissout avec du milieu Neurobasal complet pré-équilibré dans un incubateur à 37°C et 10% de CO₂ pendant 20 minutes. Ensuite le milieu est changé par du milieu Neurobasal complet chaud et les boîtes de Pétri sont remplacées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ jusqu'aux enregistrements.

	[Canal Nav1.2]	[YFP]	[Difopéine-tagée YFP]
Expression des canaux seuls WT ou Mutant	3 µg	0.6 µg	
Co-expression des canaux WT + Mutant	1 µg WT + 1 µg MT	0.6 µg	
Co-expression des canaux WT + Mutant+difo	1 µg WT + 1 µg MT		0.6 µg
Co-expression des canaux S487A + Mutant	1 µg S487A + 1 µg MT	0.6 µg	

Tableau 2. Quantités d'ADN utilisées pour les différentes conditions de transfection

5. Patch-clamp en configuration « cellule entière » des neurones néocorticaux en culture

Pour obtenir une configuration cellulaire entière (**Figure 34**), la pipette contenant la solution intracellulaire doit être collée sur la membrane dans un 1^{er} temps, suffisamment collée pour que la résistance soit de l'ordre du GigaSeal. Ensuite, il faut rompre la membrane sous la pipette par aspiration. Cette configuration permet d'enregistrer les courants générés par l'ensemble des canaux présents à la membrane plasmique.

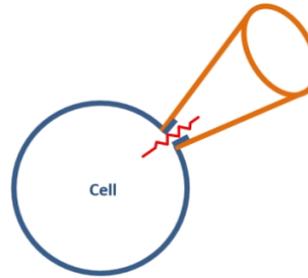


Figure 34. Représentation schématique d'une cellule en configuration cellule entière. La partie de la membrane sous la pipette est rompue.

Les neurones ont été enregistrés, 24 heures après la transfection, à température ambiante (20-24°C) en utilisant un amplificateur MultiClamp 700A et le logiciel pClamp 10.2 (Axon Instruments / Molecular Devices). Le signal a été filtré à 10 kHz et échantillonné à 50 kHz. La capacité de l'électrode et la résistance série ont été soigneusement compensées pendant l'expérience. La résistance de la pipette est d'environ 3 à 3,5 MΩ.

Afin de permettre une dialyse complète du cytoplasme, les courants sont enregistrés 5 min après l'obtention de la configuration en cellulaire entière. La dépendance au potentiel de l'activation est étudiée en appliquant des steps de potentiels dépolarisants d'une durée de 100 ms et allant de -110 mV à +65 mV à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. La dépendance au potentiel de l'inactivation a été étudiée en ajoutant un 2nd step dépolarisant à -5 mV (**Figure 35**). Les 2 steps consécutifs sont appliqués toutes les 8 secondes. Les courbes de conductance-potentiel sont dérivées des courbes courant-potentiel (I/V) selon la formule suivante : $G = I / (V - V_r)$, où I est le courant maximal, V est le potentiel et V_r est le potentiel d'inversion observé pour les neurones (~ +65mV). La dépendance au potentiel de l'activation et la dépendance au potentiel de l'inactivation ont été ajustées selon la relation de Boltzmann sous la forme $y = 1 / (1 + \exp((V_{1/2} - V) / k))$, où y est G_{Na} normalisé ou I_{Na} , $V_{1/2}$ est le potentiel de demi-activation (V_a) ou de demi-inactivation (V_h) et k est un facteur de pente.

Le courant persistant I_{NaP} est quantifié comme le courant moyen entre 40 ms et 50 ms après le début du protocole.

Les courants Na^+ ont également été enregistrés à partir d'une décharge neuronale enregistrée dans un neurone pyramidal exciteur afin d'avoir un effet global de la mutation.

Les potentiels d'action ont été obtenus grâce à la technique du current-clamp. Après être passé en configuration cellule entière en mode voltage-clamp, le mode de l'amplificateur est changé en current-clamp et le potentiel du neurone est maintenu à -70 mV. Ensuite des courants allant de 0 à 150 pA sont injectés. Pour chaque courant injecté, le nombre de PA générés par le neurone est compté.

La solution extracellulaire utilisée pour le Voltage-Clamp contient 140 mM de chlorure de sodium (NaCl), 2 mM de chlorure de calcium ($CaCl_2$), 2 mM de chlorure de magnésium ($MgCl_2$), 1 mM de chlorure de baryum ($BaCl_2$), 1 mM de chlorure de cadmium ($CdCl_2$) et 10 mM Na-Hepes. Le pH a été ajusté à 7.4 avec de l'acide acétique. A chaque expérience 1 μ M de tétrodoxine (TTX) est ajouté dans la solution extracellulaire afin de bloquer les courants sodiques endogènes.

La solution intracellulaire utilisée pour le Voltage-Clamp contient 130 mM CsF, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA et 10 mM NaCl. Le pH a été ajusté à 7.4 avec de l'hydroxyde de césium (CsOH).

La solution extracellulaire utilisée pour le Current-Clamp contient 129 mM NaCl, 1.25 mM de dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4), 1.8m M de sulfate de magnésium ($MgSO_4$), 1.6m M de $CaCl_2$, 3 mM de chlorure de potassium (KCl), 10 mM Hepes, 35 mM glucose.

Le pH a été ajusté à 7.4 avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH).

La solution extracellulaire utilisée pour le Current-Clamp contient 135 mM de gluconate de potassium (Kgluconate), 20 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EGTA, 10 mM Hepes, 2 mM Na_2ATP , 0.1 mM Na_2GTP , 0.1 mM de leupeptine.

Le pH a été ajusté à 7.4 avec de l'hydroxyde de potassium (KOH). L'ATP, le GTP ainsi que la leupeptine sont ajoutés dans la solution intracellulaire le jour des enregistrements.

Toutefois, les valeurs de potentiel présentées dans les différents résultats ne correspondent pas aux valeurs réelles car le potentiel de jonction (produit par la mobilité spécifique de chaque type d'ion contenu dans les milieux aqueux des solutions intracellulaire et extracellulaire) n'a pas été mesuré et pris en compte pour les enregistrements en voltage-clamp et current-clamp.

Le potentiel de jonction est produit par la mobilité spécifique de chaque type d'ion contenu dans les milieux aqueux des solutions intracellulaire et extracellulaire

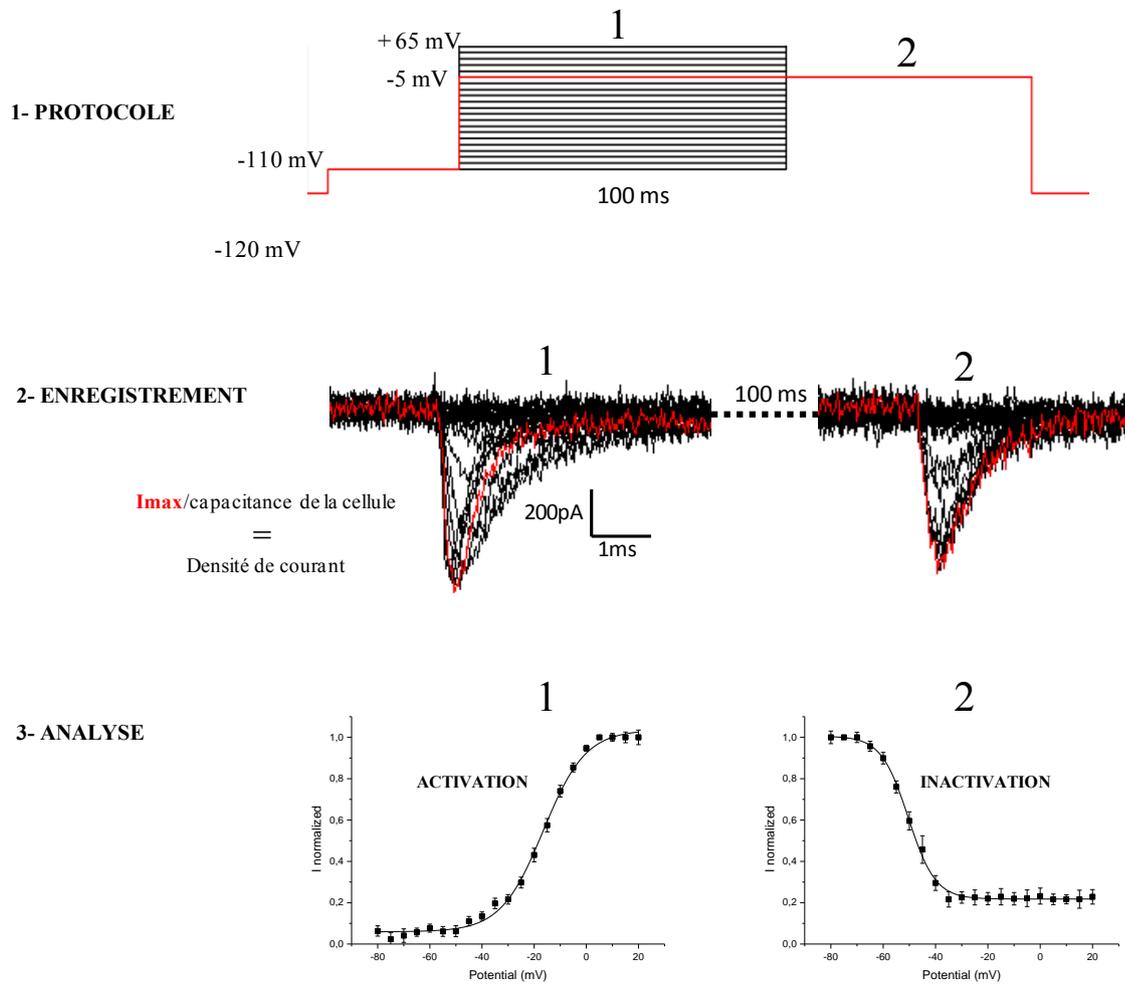


Figure 35. Protocole d'enregistrement des neurones en configuration cellule entière Le courant sortant, visible à +65mV (potentiel d'inversion) n'est pas représenté ici.

6. Marquages immunocytochimiques

Marquage extracellulaire de cellules tsA-201 pour la cytométrie en flux ou FACS

Dans le but de quantifier les canaux à la surface cellulaire, les cellules tsA-201 ont été transfectées avec le canal WT hNa_v1.2-HA [3µg] qui contient un tag HA (séquence peptidique YPYDVPDYA) au niveau de la boucle extracellulaire IS5-S6 après le résidu d'acide aminé 289.

En parallèle des cellules tsA-201 ont été transfectées avec le même canal sans tag HA (contrôle négatif) ou avec le canal potassique TREK-HA (construction du Dr Delphine Bichet) contenant un tag HA extracellulaire détectable au FACS (contrôle positif).

Les cellules, environ 500 000/boîte de 1.5mm³, sont transfectées au calcium phosphate (voir transfection des cellules tsA-201). Après 24 heures, le milieu de culture est retiré des boîtes contenant les cellules transfectées et les cellules sont détachées délicatement avec 1mL de PBS/EDTA puis rincées avec 1mL de culture froid (sans pénicilline/streptomycine) par pipetage 4-5 fois.

Les cellules (2mL au total) sont transférées dans des tubes eppendorf puis centrifugées à 400x g pendant 5 minutes. Après avoir aspiré le surnageant, les cellules sont re-suspendues dans 1mL de PBS (1X) froid et centrifugées de nouveau (400x g 5min). Cette étape est répétée 2 fois.

Après avoir fait deux lavages consécutifs, les cellules sont re-suspendues dans 100µL de PBS contenant 1µL de Live Dead (marquage des cellules mortes) puis incubées à température ambiante pendant 30 minutes.

Après incubation, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS (1X) froid et re-suspendues dans 100µL de PBS (1X) froid contenant l'anticorps monoclonal anti-HA conjugué au FITC à une concentration de 5µg/mL. Les cellules sont vortexées avant d'être incubées sur une plateforme à bascule (200 tours/minute) dans le noir à 4°C.

Après 45 minutes d'incubation, les cellules sont retirées de l'obscurité et rincées avec du PBS (1X) froid avant d'être centrifugées (400x g 5min). Cette étape est répétée 3 fois.

Les cellules sont ensuite re-suspendues dans 500µL de PBS (1X) froid et transférées dans des tubes de cytométrie en flux de 5 ml. Les tubes sont conservés dans le noir jusqu'à l'analyse de l'échantillon (jour même).

Principe de la cytométrie de flux ou FACS (fluorescence activated cell sorting)

La cytométrie de flux est une méthode qui permet d'évaluer les protéines de la membrane cellulaire, les protéines intracellulaires ainsi que les peptides et l'ADN. Le principe sous-jacent de l'analyse FACS est une réaction antigène-anticorps, les anticorps étant marqués par fluorescence. Comme décrit précédemment, nous avons utilisé un anticorps conjugué avec le FITC (fluorescein isothiocyanate), un dérivé de fluorescéine. Le FITC possède un pic d'excitation et d'émission à 495 nm et 521 nm respectivement (vert).

Pour l'analyse au FACS, les cellules tsA-201 marquées sont soumises à un faisceau laser focalisé. Des forces capillaires poussent les cellules à franchir la cellule de flux, où les marqueurs sont stimulés par le rayonnement du laser. La lumière fluorescente émise par le FITC (combiné à l'anticorps anti-HA) et la lumière diffusée sont détectées séparément.

Les cellules diffusent une fraction lumineuse qui est ensuite détectée par des photomultiplicateurs (détecteurs de lumière). La quantité de lumière mesurée correspond à la taille des cellules et à leur complexité.

Ces expériences de FACS n'ont donné aucun résultat puisque le tag HA inséré sur la partie extracellulaire du canal $Na_v1.2$ n'est pas détectable à la surface des cellules sans perméabilisation (Annexe 1).

Marquage extracellulaire sur culture de neurones

Dans le but de quantifier les canaux à la surface cellulaire, les neurones néocorticaux en culture (entre 4 et 7 jours *in vitro*) ont été transfectés avec le canal WT ou mutant $hNa_v1.2$ qui contient un tag HA (séquence peptidique YPYDVPDYA) au niveau de la boucle extracellulaire IS5-S6 après le résidu d'acide aminé 289.

En parallèle des neurones ont été transfectés avec le même canal sans tag HA (contrôle négatif).

Dans un 1^{er} temps, les neurones sont déposés sur des lamelles de 18mm le jour de la mise culture. Après 4-5 jours *in vitro*, les neurones sont rincés avec du PBS puis fixés avec du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA) et 4% de sucrose pendant 10 minutes à 4°C.

Après fixation, les lamelles sont rincées avec une solution de PBS contenant 0.01M de glycine pendant 5 minutes. La glycine permet de stopper le processus de fixation (à ce stade-là, les cellules peuvent être stockées 3j à 4°C).

Après avoir bloqué les sites non spécifiques avec du PBS contenant 10% de BSA pendant 30 minutes, les lamelles sont placées dans une solution de PBS+3% de BSA contenant les anticorps primaires. L'incubation avec les anticorps primaires se fait sur une nuit (overnight) à 4°C dans le noir. Le lendemain, les lamelles sont rincées avec du PBS + 3% BSA (4 fois pendant 5 minutes) puis placées dans une solution de PBS+3% de BSA contenant les anticorps secondaires pendant une heure à température ambiante.

Pour finir, les lamelles sont rincées avec du PBS 4 fois pendant 5 minutes puis montées sur des lames de verre avec du milieu de montage Fluoromount (18µL/lamelle). Une fois que le milieu de montage a séché, les lames sont stockées dans le noir à 4°C.

Les acquisitions ont été faites à partir d'un microscope confocal LSM 780.

Les marquages des neurones nous ont permis de quantifier l'intensité de fluorescence des canaux WT ou porteurs d'une des 4 mutations suivantes identifiées dans l'autisme : R379H, R937H, G1013X et L1314P (Annexe 2). La quantification des canaux WT a été faite au niveau de la zone des neurones marquée avec un anticorps anti-β1 dirigée contre la partie extracellulaire de la sous-unité β1 (normalement présente au SIA). L'intensité de fluorescence a été normalisée avec MAP2.

Mais les neurones étant perméabilisés par le protocole (transfection lipofectamine/fixation) nous ne pouvons être pas certains qu'il s'agisse d'un marquage uniquement membranaire. Un marquage des canaux des canaux dans le RE ne peut pas être exclu.

Marquage extracellulaire de cellules tsA-201 pour le STED (*STimulated Emission Depletion*)

Le tag HA inséré sur le canal Na_v1.2 n'est pas détectable à la surface cellulaire des tsA-201 et les neurones transfectés sont perméabilisés avant même le marquage, ce qui rend impossible la localisation (et quantification) des canaux à la membrane plasmique.

Par conséquent, nous avons utilisé le kit de coloration de surface cellulaire Membrite™ (Biotium) qui marque de façon covalente la surface des cellules vivantes. Un jour après la transfection, le milieu de culture est aspiré et les cellules sont incubées avec une solution *Pre-staining* pendant 5min dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Ensuite la solution *Pre-staining* est aspirée et les cellules sont incubées avec le Membrite™ pendant 5min dans un

incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Elles sont ensuite rincées 2 fois avec du PBS 1X puis fixées avec du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA) et 4% de sucrose pendant 10 minutes à 4°C. Le protocole est ensuite identique à celui utilisé pour le marquage extracellulaire des neurones transfectés sauf qu'avant d'incuber les cellules avec l'anticorps primaire, elles sont perméabilisées avec du PBS contenant 3% de BSA et 0.2% de triton.

Principe du STED

Le faisceau laser STED présente une intensité nulle au centre. Il est spatialement superposé avec le faisceau d'excitation et temporellement synchronisé juste avant que l'émission spontanée se produise. Le rôle du faisceau STED est donc d'instantanément dépeupler l'état excité par émission stimulée sur l'ensemble du volume excité, sauf au centre. Les molécules présentes au centre de la tache de diffraction sont fluorescentes et leurs positions peuvent être enregistrées avec une résolution non limitée par la diffraction. De cette manière, l'image entière peut ensuite être reconstruite point par point. Nous avons utilisé le STED, en collaboration avec Sophie Abelanet de la plateforme imagerie de l'IPMC, car il permet d'obtenir des images jusqu'à une résolution inférieure à une dizaine de nanomètre (Hell et coll., 1994).

Anticorps primaires	Anticorps secondaires
Anti-HA FITC 1/200	
Anti-HA mouse (sigma) 1/200	Goat anti-mouse Alexa 488 1/500; goat anti-mouse Abberior Star 600 (STED)
Anti-β1 extracellulaire (alomone labs) 1/200	Goat anti-rabbit Alexa 647 1/500
Anti-MAP2 chicken (Invitrogen) 1/1000	Goat anti-chicken Alexa 594 1/1000

Tableau 3. Anticorps utilisés pour les différents marquages immunocytochimiques

7. Tests statistiques

Les ensembles de données ont été testés pour une distribution normale et le test Anova post-hoc a été utilisé pour comparer les différents groupes (groupes de 3 à 7 facteurs). Nous avons considéré les différences comme statistiquement significatives lorsque $p < 0,05$. La signification est indiquée dans les figures comme: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Les données sont représentées par des moyennes \pm SEM, «n» indique le nombre de cellules.

Pour les marquages immunocytochimiques, l'intensité de fluorescence a été quantifiée avec ImageJ.

IV. RESULTATS

Partie 1

Caractérisation d'une nouvelle mutation du gène *SCN1A* responsable de la MHF-3 et présentant des défauts de repliement et/ou trafic cellulaire

Synthèse de l'article

Le 1^{er} objectif de ma thèse a consisté en la caractérisation de la mutation L1670W située sur le canal Na_v1.1. Cette mutation, nouvellement identifiée chez un patient atteint de migraine hémiplégique familiale de type 3 (MHF-3), est localisée au niveau de la boucle intracellulaire reliant les segments S4 et S5 du domaine IV.

Les enregistrements de patch-clamp des cellules tsA-201 ont mis en évidence que la mutation L1670W entraîne une diminution très importante de la densité de courant des canaux Na_v1.1. Cette réduction peut être partiellement restaurée en incubant les cellules à 30°C après transfection. La diminution de la température d'incubation favorise l'adressage des canaux mutés à la surface cellule en ralentissant les cinétiques de repliement.

La récupération de la densité de courant suggère que 1/ la mutation L1670W induit des défauts de repliement et/ou trafic cellulaire des canaux Na_v1.1 ayant pour conséquence une réduction du nombre de canaux à la surface cellulaire et 2/ ces défauts peuvent être « corrigés ».

Dans les conditions de récupération partielle de la densité de courant, j'ai analysé les propriétés biophysiques du canal porteur de la mutation L1670W à partir d'enregistrements électrophysiologiques en utilisant la technique du patch-clamp en configuration cellule entière. Mes résultats ont mis en évidence que la mutation induit un déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus dépolarisés et une augmentation significative du courant sodium persistant I_{NaP} conduisant à un gain de fonction des canaux Na_v1.1. Afin d'identifier l'effet global de la mutation, nous avons enregistré les courants Na⁺ enregistrés en réponse à une décharge neuronale de type Fast-Spiking enregistrée au préalable dans un interneurone GABAergique. Les cellules exprimant la mutation génèrent des courants qui ont une densité plus importante que ceux générés par les cellules exprimant les canaux WT, ce qui suggère que dans les cellules tsA-201, la mutation L1670W conduit à un gain de fonction des canaux Na_v1.1 après « correction » des défauts d'adressage à la surface cellulaire.

Par ailleurs, dans les neurones transfectés et incubés à 37°, la densité de courant des canaux porteurs de la mutation L1670W est partiellement récupérée, suggérant ainsi que dans des conditions se rapprochant des conditions physiologiques, les canaux mutés s'expriment à la membrane. Cela peut s'expliquer par le fait que des protéines endogènes peuvent, en

interagissant avec les canaux mutés, stabiliser leur conformation et les aider à rejoindre la surface de la cellule. Les enregistrements de patch-clamp en configuration cellule entière des neurones néocorticaux en culture transfectés avec soit le canal WT soit le canal porteur de la mutation L1670W révèlent que la mutation conduit à un déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus dépolarisés et une augmentation du courant I_{NaP} . De plus, la densité des courants Na^+ enregistrés en réponse à une décharge Fast-Spiking est plus grande dans les neurones exprimant la mutation L1670W. De manière intéressante, ces résultats sont similaires à ceux que nous avons obtenus à partir d'enregistrements réalisés sur les cellules tsA-201 incubées à 30°C.

L'ensemble de ces résultats révèle que la mutation L1670W conduit à un gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ dans les neurones néocorticaux en culture. Les canaux $Na_v1.1$ sont majoritairement exprimés dans les interneurons GABAergiques, ce qui signifie qu'un gain de fonction conduit à une hyperexcitabilité des neurones inhibiteurs. L'hyperexcitabilité des interneurons GABAergiques entraîne une accumulation importante de potassium dans le milieu intracellulaire à laquelle s'ajoute une accumulation de neurotransmetteurs comme le glutamate et le GABA. Les neurones corticaux sont fortement dépolarisés, ce qui a pour conséquence de déclencher la dépression corticale envahissante (DCE) qui est le mécanisme pathologique proposée pour la migraine hémiplégique familiale de type 3 (Cestèle et coll, J Neurosci 2008).

Ainsi, tout comme la mutation L1649Q (Cestèle et coll., 2013), la mutation L1670W entraîne des défauts d'adressage des canaux $Na_v1.1$ à la surface cellulaire pouvant être « corrigés » par différentes méthodes.

De plus, contrairement à ce qui a été observé pour les mutations *SCN1A* liées à l'épilepsie et présentant aussi des défauts d'adressage, les mutations L1649Q et L1670W conduisent à un gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ après « correction » de ces défauts.

Par conséquent, le gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ après « correction » des défauts de repliement et/ou trafic cellulaire pourrait être un mécanisme récurrent de la MHF-3.

Ce mécanisme est différent de celui qui a été décrit précédemment pour les mutations *SCN1A* responsables de MHF-3 conduisant à un gain de fonction des canaux $Na_v1.1$ sans présenter des défauts d'adressage à la surface cellulaire.

Article



Gain of Function for the SCN1A/hNa_v1.1-L1670W Mutation Responsible for Familial Hemiplegic Migraine

Sandra Dhifallah¹, Eric Lancaster², Shana Merrill², Nathalie Leroudier¹, Massimo Mantegazza^{1*} and Sandrine Cestèle^{1*}

¹Université Côte d'Azur, CNRS UMR 7275, INSERM, IPMC, Valbonne, France, ²Department of Neurology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Felix Viana,
Instituto de Neurociencias (IN), Spain

Reviewed by:

Angelika Lampert,
Uniklinik RWTH Aachen, Germany
Terrance P. Snutch,
University of British Columbia,
Canada

*Correspondence:

Massimo Mantegazza
mantegazza@ipmc.cnrs.fr
Sandrine Cestèle
cestele@ipmc.cnrs.fr

Received: 07 May 2018

Accepted: 12 June 2018

Published: 09 July 2018

Citation:

Dhifallah S, Lancaster E, Merrill S, Leroudier N, Mantegazza M and Cestèle S (2018) Gain of Function for the SCN1A/hNa_v1.1-L1670W Mutation Responsible for Familial Hemiplegic Migraine. *Front. Mol. Neurosci.* 11:232. doi: 10.3389/fnmol.2018.00232

The *SCN1A* gene encodes for the voltage-dependent Na_v1.1 Na⁺ channel, an isoform mainly expressed in GABAergic neurons that is the target of hundreds of epileptogenic mutations. More recently, it has been shown that the *SCN1A* gene is also the target of mutations responsible for familial hemiplegic migraine (FHM-3), a rare autosomal dominant subtype of migraine with aura. Studies of these mutations indicate that they induce gain of function of the channel. Surprisingly, the mutation L1649Q responsible for pure FHM-3 showed a complete loss of function, but, when partially rescued it induced an overall gain of function because of modification of the gating properties of the mutant channel. Here, we report the characterization of the L1670W *SCN1A* mutation that has been previously identified in a Chinese family with pure FHM-3, and that we have identified also in a Caucasian American family with pure FHM-3. Notably, one patient in our family had severe neurological deterioration after brain radiation for cancer treatment. Functional analysis of L1670W reveals that the mutation is responsible for folding/trafficking defects and, when they are rescued by incubation at lower temperature or by expression in neurons, modifications of the gating properties lead to an overall gain of function. Therefore, L1670W is the second mutation responsible for FHM-3 with this pathophysiological mechanism, showing that it may be a recurrent mechanism for Na_v1.1 hemiplegic migraine mutations.

Keywords: migraine with aura, sodium channels, GABAergic neurons, cortical spreading depression, epilepsy

INTRODUCTION

Migraine is a chronic neurovascular disorder characterized by recurrent disabling attacks of severe, unilateral, throbbing headache with autonomic dysfunctions lasting up to 3 days (Diener et al., 2012; Goadsby et al., 2017). Familial hemiplegic migraine (FHM) is a severe monogenic subtype of migraine with aura, characterized by the presence of hemiparesis as part of the aura phase; causative genes for FHM have been identified and functional studies have allowed to get insights into the pathophysiological mechanisms of migraine (Vecchia and Pietrobon, 2012; Pietrobon and Moskowitz, 2013; Ferrari et al., 2015; Mantegazza and Cestèle, 2018). Gain of

function mutations in *CACNA1A* encoding the alpha 1a subunit of the Ca_v2.1 (P/Q type) neuronal calcium channel are responsible for FHM-1 (Ophoff et al., 1996), loss of function mutations in *ATP1A2*, encoding the alpha 2 subunit of the Na⁺/K⁺ ATPase are responsible for FHM-2 (De Fusco et al., 2003). Moreover, the gene *SCN1A*, encoding for the voltage gated sodium channel Na_v1.1 alpha subunit, which is the target of hundreds of epileptogenic mutations (Marini and Mantegazza, 2010; Meisler et al., 2010; Catterall, 2012; Guerrini et al., 2014), has also been identified as the target of mutations responsible for FHM-3 (Dichgans et al., 2005). Often FHM-3 patients do not show epileptic phenotypes (Mantegazza and Cestèle, 2018), and numerous studies have been undertaken to find out why a mutation in the same gene leads to different pathologies, such as epilepsies vs. FHM. We have shown that migraine mutations cause Na_v1.1 gain of function (Cestèle et al., 2008, 2013b), a finding that has been confirmed by other studies (Fan et al., 2016). Notably, epileptogenic mutations cause the opposite effect, inducing loss of function of the channel and, because Na_v1.1 is expressed mainly in GABAergic neurons, this leads to hypoexcitability of these neurons and reduced inhibition in neuronal networks (Yu et al., 2006; Ogiwara et al., 2007; Han et al., 2012; Hedrich et al., 2014).

Besides targeting the same gene, Na_v1.1 epileptogenic and migraine mutations have another common point: they can cause folding/trafficking defects and, therefore, reduce the level of expression of the protein at the plasma membrane (Cestèle et al., 2013b; Bechi et al., 2015; Terragni et al., 2018). Thus far, only the mutation L1649Q responsible for FHM-3 has been shown to have this property and, importantly, we have demonstrated that under certain conditions the expression of this mutant can be partially rescued, leading to an overall effect that is consistent with gain of function (Cestèle et al., 2013b). Conversely, epileptogenic folding/trafficking defective mutants show loss of function also upon rescue, consistent with a different functional effect in comparison with migraine mutants (Rusconi et al., 2007, 2009; Bechi et al., 2015). We report here the functional study of the L1670W Na_v1.1 mutation that has been recently identified in a Chinese family presenting with pure FHM without epileptic phenotypes (Zhang et al., 2017). We have identified the same mutation in a Caucasian American family presenting with pure FHM and, in the index patient, a remarkable clinical feature involving severe neurological deterioration after standard brain radiation for cancer treatment. We have studied the effects of this mutation both in a human cell line and in mouse neocortical neurons. We show that the mutation L1670W, similarly to L1649Q (Cestèle et al., 2013b), induces rescuable folding/trafficking defects and an overall gain of function when rescued in cell lines or when expressed in GABAergic cortical neurons. Therefore, our results confirm that FHM-3 mutations cause Na_v1.1 gain of function and reveal that folding/trafficking defects leading to gain of function upon rescue can be a recurrent mechanism for Na_v1.1 hemiplegic migraine mutations in different ethnic groups.

MATERIALS AND METHODS

Genetic Testing

Genetic testing was performed by sequencing (Athena Diagnostics, Marlborough, MA, USA) to detect sequence variants in the *CACNA1A*, *ATP1A2* and *SCN1A* genes.

Plasmids and Mutagenesis

We used the shorter splice variant isoform (-11aa) of the human Na_v1.1 channel α subunit (GenBank database accession no. NM_006920.4) that could be the predominant Na_v1.1 variant expressed in brain (Schaller et al., 1992; Lossin, 2009), and that we have used in numerous other studies (Cestèle et al., 2008, 2013a,b). We subcloned the Na_v1.1 cDNA into the pCDM8 vector to minimize rearrangements (Mantegazza et al., 2005). The mutation L1670W was introduced with the Quick Change Lightning Kit (Stratagene). In order to render the hNa_v1.1 resistant to the channel blocker tetrodotoxin (TTX), we replaced the phenylalanine at position 383 with a serine (F383S; Sivilotti et al., 1997; Bechi et al., 2012; Cestèle et al., 2013b).

Cell Culture and Transfection

The cell line tsA-201 was maintained and transiently transfected with CaPO₄ as already reported (Cestèle et al., 2008). Neocortical neurons were obtained from E17 OF1 mouse embryos (Charles River) and prepared as in Cestèle et al. (2013b). The dissociated neurons were plated into 35 mm dishes for patch-clamp recordings and maintained in culture at 37°C with 5% CO₂ in Neurobasal A culture medium (Invitrogen) supplemented with B27+ (Invitrogen), glutamine 1 mM (Invitrogen), β -FGF 10 ng/ml (Invitrogen), penicillin G (50U/ml) and streptomycin 50 μ g/ml (Sigma). Transfection of neurons was performed with Lipofectamin 2000 (Invitrogen) 4–5 days after the preparation and recorded 24–48 h after transfection. Cells were co-transfected with the cDNA of hNa_v1.1 and a reporter vector expressing Yellow Fluorescent Protein (pEYFP-N1; Clontech) in order to identify the transfected cells for electrophysiological recordings. We selected neurons with fusiform bipolar morphology in order to record from GABAergic cells, as previously described (Scalmani et al., 2006; Cestèle et al., 2013b).

Electrophysiological Recordings and Analysis

Sodium currents were recorded using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Cells were recorded at room temperature (20–24°C) using a MultiClamp 700A amplifier and pClamp 10.2 software (Axon Instruments/Molecular Devices). Signal were filtered 10 kHz and sampled at 50 kHz. Electrode capacitance and series resistance were carefully compensated during the experiment. Pipette resistance was around 2–2.5 M Ω and maximal accepted voltage-clamp error was less than 2.5 mV. The remaining transient and leakage currents were eliminated using a P/4 subtraction paradigm. Recording solutions for tsA-201 cells were (in mM): external solution 150 NaCl, 1 MgCl₂, 1.5 CaCl₂, KCl₂ and

10 HEPES (pH 7.4 with NaOH); internal pipette solution 105 CsF, 35 NaCl, 10 EGTA, 10 HEPES and (pH 7.4 with CsOH). Recording solutions for neurons were (in mM): external solution 140 NaCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 1 BaCl₂, 1 CdCl₂, 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH) and TTX 1 μM; internal pipette solution (in mM): 130 CsF, 10 NaCl, 10 EGTA and 10 HEPES (pH 7.4 with CsOH). We started the recordings 5 min after obtaining of the whole cell configuration, in order to allow a complete dialysis of the cytoplasm. In the cells selected for the analysis the currents were stable also during long lasting recordings: ±10% max in comparison with the initial amplitude (in general a small run-up). Voltage dependence of activation was studied applying test pulses of 100-ms from −110 mV to +60 mV from a holding potential at −120 mV. Voltage dependence of inactivation was studied with a 100-ms prepulse at different potentials followed by a test pulse at −10 mV. The intersweep interval was 8 s. Conductance-voltage curves were derived from current-voltage (I–V) curves according to $G = I/(V - V_r)$, where I is the peak current, V is the test voltage, and V_r is the apparent observed reversal potential for tsA-201. The voltage dependence of activation and the voltage dependence of inactivation were fit to Boltzmann relationships in the form $y = 1/(1 + \exp((V_{1/2} - V)/k))$, where y is normalized G_{Na} or I_{Na} , $V_{1/2}$ is the voltage of half-maximal activation (V_a) or inactivation (V_h) and k is a slope factor; for the inactivation curve we included a baseline. Persistent current (I_{NaP}) was quantified as the mean current between 40 ms and 50 ms after the beginning of the voltage step. Development of fast inactivation was studied using a prepulse of different duration at different voltage followed by a test pulse at 0 mV with an intersweep interval of 6 s. Recovery from fast inactivation was studied using a test pulse at 0 mV followed by a repolarization at −120 mV of different duration and a test pulse to 0 mV with an intersweep interval of 10 s. Development of slow inactivation was obtained using inactivating prepulses to 0 mV of increasing duration followed by repolarizations to −100 mV during 15-ms to allow complete recovery from fast inactivation and test pulses to 0 mV. Voltage dependence of development of slow inactivation was studied with 20-s-prepulse at different potentials followed by 15-ms repolarizations to −110 mV and test pulses to 0 mV. Recovery of slow inactivation was obtained using a 20-s-long inactivating prepulse to 0 mV followed by recovery interpulses at −90 mV of increasing duration and test pulses to 0 mV. Voltage dependence of recovery from slow inactivation was studied applying a 20-s-long inactivating prepulse to 0 mV followed by a 20-s recovery interpulse at different potentials and a test pulse to 0 mV. The intersweep interval for studying slow inactivation properties was 70 s. Use dependence was evaluated with trains of 200 depolarizing steps 2 ms long to 0 mV from a holding potential of −70 mV at 10 Hz, 50 Hz and 100 Hz (leak was subtracted off-line with a P/3 paradigm). Action potential clamp recordings were performed using as voltage stimulus a GABAergic neuronal discharge recorded from a fast spiking basket cell injecting a 1 s-long depolarizing current step as in Hedrich et al. (2014); the instantaneous firing frequency of the discharge was between 106 Hz and 82 Hz. Recordings were not corrected for junction potentials.

Statistical Tests

Datasets were tested for normal distribution and the following tests were used, as indicated in the text. For normally distributed datasets, we used the unpaired Student's t -test with Welch correction. For non-normally distributed datasets, we used the Mann-Whitney rank-sum test when we compared two unpaired datasets or, when we compared more than two unpaired datasets, the Kruskal-Wallis H test with Mann-Whitney post tests and Bonferroni correction for multiple comparisons. We considered the differences as statistically significant when $p < 0.05$, p values are provided only for significant differences. Significance is indicated in the figures as: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. If not differently indicated, data are shown as means ± SEM, “ n ” indicates the number of cells.

RESULTS

Family

The index patient (II-2, **Figure 1**) is from a Caucasian American family and reported a history of hemiplegic migraines beginning in his teens. He had 1–2 severe attacks per year as a young man. He would typically have decreased vision on one side followed by numbness beginning in a foot that would expand to that entire side of his body. A pounding headache with photo- and phonophobia would then occur. There would be weakness and numbness on that half of the body lasting for hours, and rarely lasting as long as a day. Attacks were infrequent, often separated by many months or a year. In between attacks he had no neurological or cognitive deficits and was able to function well in his career and home life. At age 60 he was started on valproic acid and the migraine attacks and hemiplegic events essentially stopped. At age 69 he was diagnosed with limited stage small cell lung cancer and treated with CALBG-30610, cisplatin, VP-16, and standard prophylactic brain radiation. Fourteen months after cancer diagnosis he had frequent falls, worsening of memory and decreased spontaneous speech. By 16 months after diagnosis, he required a wheelchair for any mobility, had bladder incontinence, and would passively watch television all day but be unable to relate the events he watched. He continued to neurologically decline until his death 18 months after cancer diagnosis.

The deceased father (patient I-1) had a long-lasting history of hemiplegic migraine, well known to the family. Other neurological issues or cognitive deficits were not reported. He died at age 53 of “jaw cancer”.

Patient III-2 is the 29-year-old son of the index patient. He had a single febrile seizure at age 1 and was diagnosed with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) during childhood. He developed hemiplegic migraines at age 12. Since then events have been unpredictable, sometimes occurring several times per week and sometimes not for a year. The typical event begins with blurred vision on one side, usually the left, for 20–30 min. As the vision clears, numbness starts in the foot and spreads to that half of the body over about 30 min. Once the spread of numbness and weakness is complete he will have crushing head pain with photo- and phonophobia.

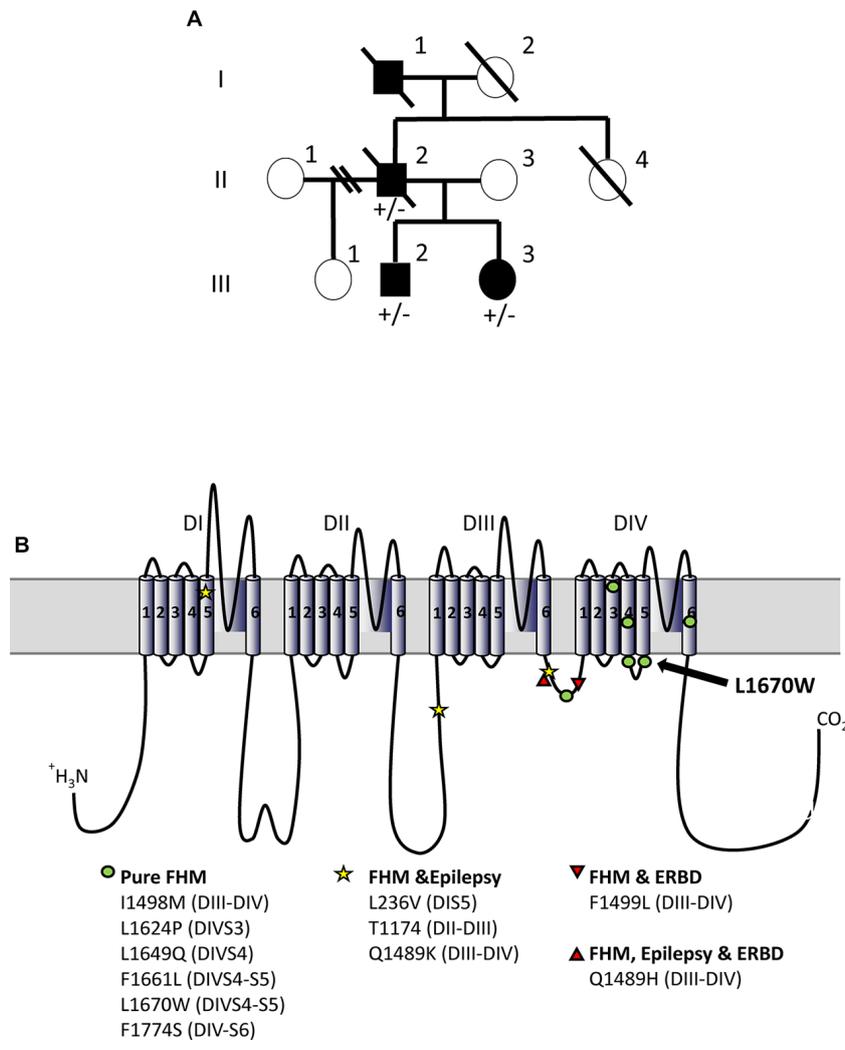


FIGURE 1 | L1670W familial hemiplegic migraine (FHM-3) family. **(A)** Family pedigree. The proband is patient II-2. No genetic test was performed on patient I-1. Squares are representative of men and circles of women. Plain symbols represent affected individuals and empty symbols unaffected individuals. **(B)** Schematic representation of Nav_v1.1 alpha subunit and localization of FHM-3 mutations identified thus far; the mutation L1670W that we have studied here is highlighted with an arrow. Voltage-gated sodium channels are formed by four main domains (DI-IV), each one formed by six transmembrane segments (S1–6) connected by intracellular and extracellular loops; within each domain, S1–4 form the voltage sensing module (in which the positively charged S4 is the voltage sensor) and S5–6 form the pore module, with the intracellular loop between S4 and S5 that is the linker between the two modules. The intracellular loop between DIII-IV is the inactivation gate, which blocks the pore in the fast-inactivated states of the channels acting as a hinged lid. Slow inactivation depends on rearrangements of the pore domain. DIV is important for the coupling between activation and inactivation. Thus, most of the FHM mutations are in regions that are important for inactivation.

The pain may last up to 4 h. He rarely has nausea or vomiting with the headaches. The affected half of the body is numb and weak for 1 h to a couple days, with his longest event persisting 1 week. During the prolonged attack he was clumsy on the left side and could not type on a computer. He shows incoordination with the affected limbs during the attacks. Between events he has no neurological symptoms. Neurological examination was normal, including mental status, cranial nerve function, strength, sensation, balance, reflexes, gait and coordination.

Patient III-3 is a 26-year-old woman, daughter of the index patient. Her medical history is notable for pseudotumor cerebri diagnosed at age 19. Pseudotumor was treated with

acetazolamide for a year, and with weight loss, then resolved and remains in remission. She developed headaches at 17 years of age and has had 10 total events since then. A few headaches started with blurred vision on one side, but most had no visual aura. Headaches usually start with numbness or tingling of the foot and progress to involve the entire half of the body over 5–30 min. That half of the body feels weak as well as numb. Head pain begins during or after the spread of the numbness and weakness. Headaches are described as crushing or pounding and she seeks a quiet, dark place when they occur. Motor and sensory symptoms recover over hours to days. There is no numbness or weakness between attacks. Her neurological examination was normal, including mental

status, cranial nerve function, strength, sensation, balance, reflexes, gait and coordination. MRI of the brain without contrast and MRA of the head, performed at age 21, were normal.

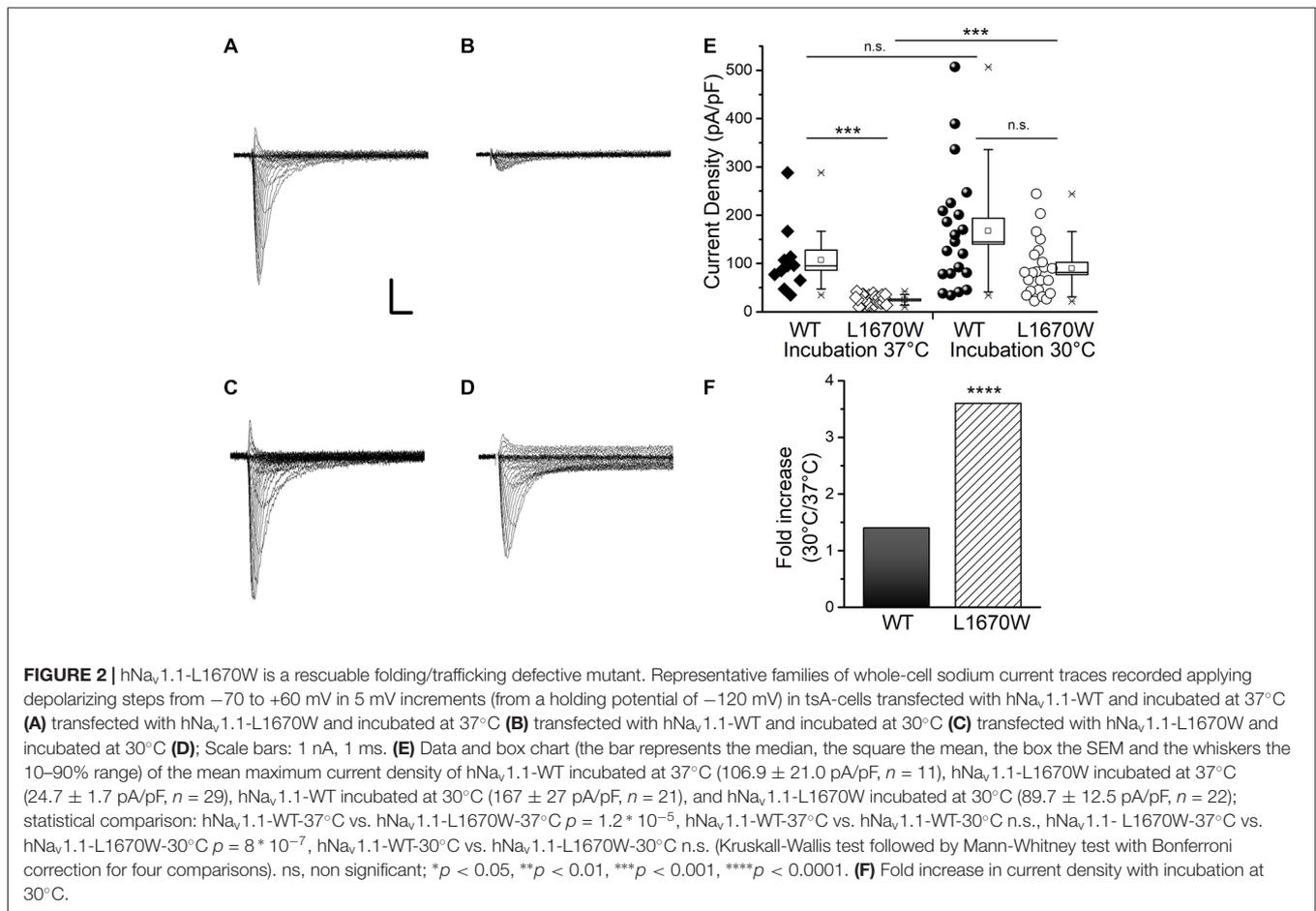
II-1 and III-1 were not reported to have migraine or hemiplegic attacks and were not available for genetic testing.

Genetic Testing

Patient II-2 had sequencing of *ATPIA2* that was normal, but sequencing of *CACNA1A* could not be completed due to inadequate sample. *CACNA1A* was sequenced for patients III-2 and III-3 and showed no abnormalities. All three patients carried the heterozygous missense mutation L1670W in *SCN1A* (c.5009T>G/p.Leu1670Trp: leucine 1670 to tryptophan). This mutation has been already described in a Chinese FHM family, but functional studies have not been performed (Zhang et al., 2017). In both families, the mutation causes a pure form of familial hemiplegic migraine as it is not associated with epilepsy or Elicited Repetitive Daily Blindness (ERDB), which are co-morbidities reported in FHM patients. L1670W is localized in the linker between the voltage sensing module and the pore module of domain 4: the intracellular loop connecting S4 and S5 transmembrane segments (Figure 1B).

The Mutation L1670W Reduces the Plasma Membrane Targeting of hNa_v1.1, Which Is Rescued by Incubation at Lower Temperature

To disclose the functional effect of the mutation hNa_v1.1-L1670W, we transiently transfected human tsA-201 cells with WT- or L1670W-hNa_v1.1 channels. The cells were incubated at 37°C for 24 h before to record sodium currents with the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Representative current traces are shown in Figures 2A,B. We observed that, in these conditions, cells expressing L1670W channels show a dramatic reduction of current amplitude in comparison with those expressing WT channels. The quantification of the current density showed a 5-fold reduction for L1670W (Figure 2E), which indicates a nearly complete loss of function of the mutant channels. This could be caused by defects of conduction or by trafficking/folding defects that reduce the targeting of the mutant channels to the plasma membrane. In order to get insights into the mechanism underlying the loss of function of hNa_v1.1-L1670W, we incubated the transfected cells at 30°C before the recordings, a condition that is known to rescue numerous folding/trafficking defective mutant proteins, including Na_v1.1 mutants (Bernier et al., 2004; Terragni



et al., 2018). Representative current traces upon incubation at 30°C (**Figure 2C** for hNa_v1.1-WT, **Figure 2D** for L1670W) show rescue with a substantial increase of L1670W current. Comparisons of the current densities confirmed that incubation at 30°C induced a 3.7-fold increase for L1670W, whereas the current density of WT channels was not significantly modified (**Figures 2E,F**). This data indicated that the incubation of the cells at 30°C can rescue L1670W mutant channels and lead to a more efficient targeting of the mutant protein at the plasma membrane, supporting the hypothesis that L1670W induces folding/trafficking-defects. Interestingly, although with incubation at 30°C there was a trend toward a reduction of L1670W current density in comparison with hNa_v1.1-WT, the difference was not statistically significant (**Figure 2E**), consistent with a nearly complete rescue of L1670W in this condition.

Effects of L1670W on hNa_v1.1 Gating Properties in tsA-201 Cells

To analyze the gating properties of WT and L1670W sodium channels, currents were recorded with the whole-cell configuration of the patch-clamp technique in tsA-201 cells previously incubated at 30°C for 24 h after transfection, to induce rescue of L1670W channels. As shown in **Figure 3A**, the analysis of the conductance-voltage plot highlights a significant positive shift in the voltage-dependence of activation (4.8 mV on average). Consistently, the plot of the normalized current-voltage relationships (**Figure 3A**, inset) shows that the maximum current was at -15 mV for the WT and at -10 mV for L1670W. In the other hand, the inactivation curve was also shifted to positive potentials (8.4 mV on average, **Figure 3A**) and the inactivation was not complete, as the baseline was increased 4.75-fold with L1670W, which is consistent with an increase of the persistent current (I_{NaP} ; see below). Notably, the effect observed on the voltage-dependence of fast inactivation is consistent with a clear gain of function induced by the mutation, whereas the positive shift of the activation curve is consistent with a loss of function.

The comparison of the kinetics of onset and of decay of the current elicited with a depolarizing step to -10 mV (**Figure 3B**) shows that both current onset and decay are slower for L1670W. However, quantifications over a range of potentials, displayed in **Figures 3C,D**, show that there is no difference between WT and L1670W channels at depolarized potentials. This is consistent with an effect due to the positive shift of the voltage dependence of activation, without a direct modification of the kinetics of onset or decay (inactivation from the open state).

The analyses of the development of fast inactivation and of the recovery from fast inactivation over a range of potentials are displayed in **Figures 3E,F**, respectively. Our data indicates that the L1670W mutant shows a faster development of fast inactivation from the closed states (**Figure 3E**) and a faster recovery from fast inactivation (**Figure 3F**). The effect on the development is consistent with a loss of function, whereas the effect on the recovery is consistent with a gain of function.

Mean whole-cell current traces with a longer time scale are displayed in **Figure 3G** and clearly show the increase of

I_{NaP} induced by the L1670W mutation. Comparison over a range of potentials of the mean I_{NaP} recorded 5 min after the establishment of the whole-cell configuration (quantified as the average current between 45 ms and 55 ms after the beginning of the test pulse and expressed as percentage of maximum transient sodium current) showed that L1670W induced a 3.7-fold increase of I_{NaP} compared to the WT.

All together our data indicates that the mutation L1670W modifies several properties of the fast inactivation of Na_v1.1 channels, inducing a positive shift of the voltage dependence of inactivation (gain of function), an acceleration of the kinetics of the development from the closed states (loss of function) and of the recovery (gain of function), as well as an increase of I_{NaP} (gain of function). This is consistent with a destabilization of the fast-inactivated state.

Furthermore, we studied the effect of L1670W on the properties of slow inactivation. Our results indicate that the mutation induced a large positive shift (18.7 mV) in the curve of the voltage-dependence of the development of slow inactivation (**Figure 4A**). We found no significant modifications of the other properties of slow inactivation that we studied: kinetics of development (**Figure 4B**), voltage-dependence of recovery (**Figure 4C**) and kinetics of recovery (**Figure 4D**). This effect is in agreement with a gain of function for L1670W.

Thus, analysis of the gating properties of the mutant L1670W channels compared to the wild-type highlighted that the mutation alters several parameters of the fast and slow inactivation properties of hNa_v1.1 channels and induces a mix of loss (positive shift of the voltage-dependence of activation, faster development of fast inactivation from the closed states) and gain of function (positive shift of the voltage dependence of inactivation, increase of I_{NaP} , faster recovery of fast inactivation, positive shift of the voltage dependence of the development of slow inactivation).

In order to disclose the effect of L1670W on use dependence, we elicited sodium currents in tsA-201 cells using trains of 2 ms-long depolarizing steps at 10 Hz, 50 Hz and 100 Hz (**Figures 5A–C**, respectively). Our data revealed that the mutation L1670W induces a decrease of use dependence during the train that is consistent with a gain of function as an overall effect. Furthermore, to better reproduce neuronal dynamic conditions during a discharge of action potentials, we applied as voltage command a neuronal discharge recorded in a fast-spiking GABAergic neuron (**Figure 5D**), in which Na_v1.1 is particularly important, and recorded Na⁺ action currents in tsA-201 cells, quantified as current densities to normalize for the size of the cells (**Figures 5E,F**). Our results show a significant increase of action currents' peak amplitude in cells transfected with the L1670W mutant compared to cells transfected with the WT. In fact, the first action current in the discharge was not significantly different, although there was a trend toward a larger peak current for the WT, but, importantly, the average of the amplitude of the last five peak action currents in the discharge was significantly larger for L1670W (2.9-fold increase, see **Figure 5F**).

Our results are consistent with a gain of function as overall effect of L1670W in tsA-cells, which would induce

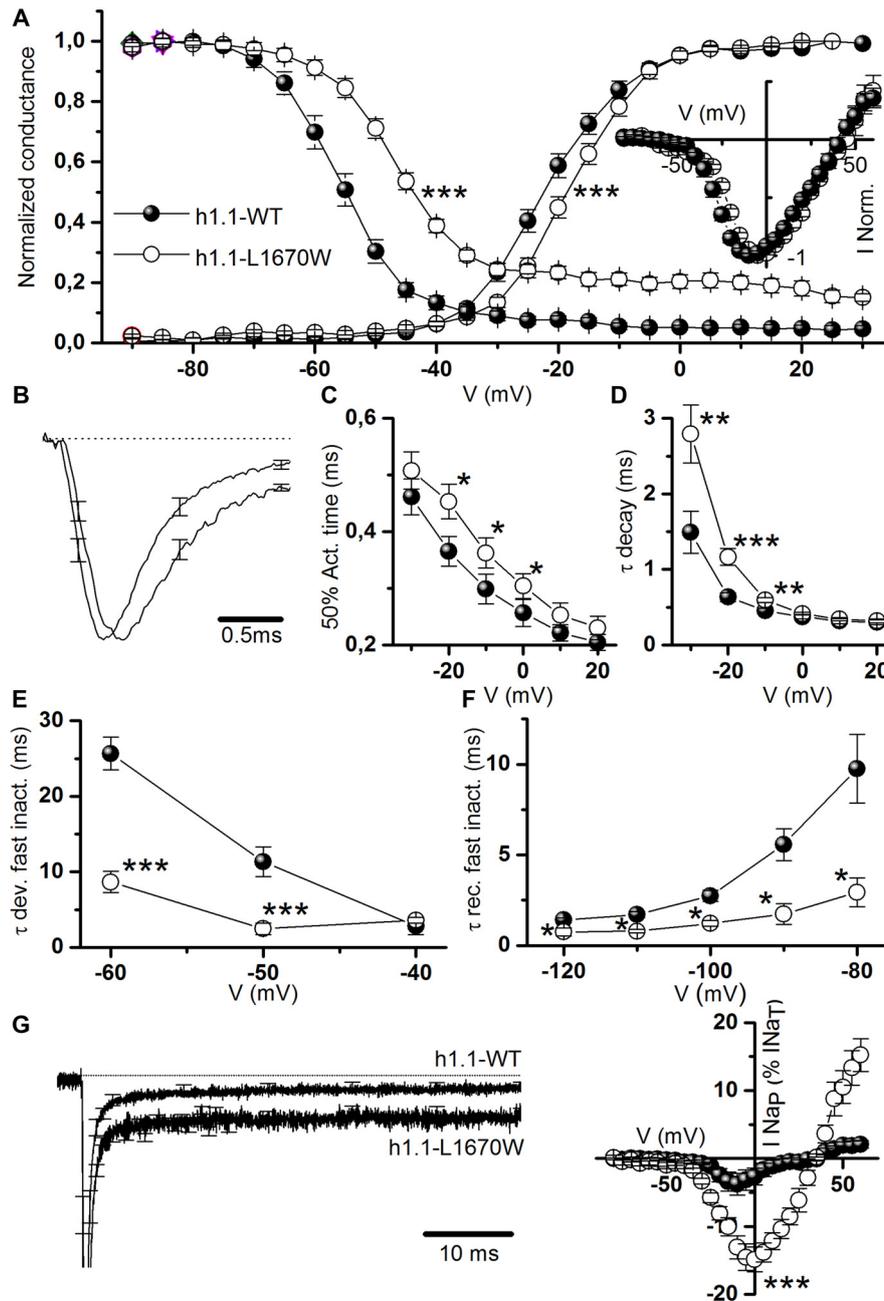


FIGURE 3 | Functional effects of hNa_v1.1-L1670W on fast gating properties upon rescue in tsA-201 cells. **(A)** Mean voltage dependence of activation and fast inactivation, lines are mean Boltzmann fits; mean parameters: voltage of half activation V_a and slope K_a for hNa_v1.1-WT (n = 18), V_a = -21.6 ± 1.2 mV, K_a = 6.6 ± 0.4, hNa_v1.1-L1670W (n = 22), V_a = -16.8 ± 1.0 mV (p = 0.004), K_a = 6.1 ± 0.5 mV; voltage of half inactivation (V_h), slope (K_h) and baseline for hNa_v1.1-WT (n = 12), V_h = -55.6 ± 0.3 mV, K_h = 4.9 ± 0.3 mV, baseline = 0.04 ± 0.01, L1670W (n = 16), V_h = -47.3 ± 0.9 mV (p = 5 * 10⁻⁵), K_h = 6.1 ± 0.5 mV, baseline = 0.19 ± 0.05 (p = 2 * 10⁻⁵); Welch t-test. Inset: normalized current-voltage (I-V) plot of the peak transient current. **(B)** Comparison of mean normalized current traces elicited with a command step to -10 mV from a holding potential of -120 mV; the dotted line is the 0. n = 13 for WT and L1679W. **(C)** Time (ms) of half-activation of the current at the indicated potentials: -30 mV WT 0.46 ± 0.03, L1670W 0.51 ± 0.03; -20 mV WT 0.36 ± 0.03, L1670W 0.45 ± 0.03 (p = 0.02); -10 mV WT 0.29 ± 0.02, L1670W 0.36 ± 0.03 (p = 0.04); 0 mV WT 0.25 ± 0.02, L1670W 0.30 ± 0.02 (p = 0.05); 10 mV WT 0.22 ± 0.01 L1670W 0.25 ± 0.02; 20 mV WT 0.20 ± 0.01 L1670W 0.23 ± 0.02; Welch t-test, n = 13 for all groups. **(D)** Voltage dependence of the time constant (τ in ms) of the current decay (single exponential fits at the indicated potentials): -30 mV WT 1.5 ± 0.3, L1670W 2.8 ± 0.4 (p = 0.02); -20 mV WT 0.63 ± 0.06, L1670W 1.2 ± 0.1 (p = 5 * 10⁻⁴); -10 mV WT 0.45 ± 0.04, L1670W 0.59 ± 0.03 (p = 0.008); 0 mV WT 0.37 ± 0.03, L1670W 0.41 ± 0.02; 10 mV WT 0.31 ± 0.03 L1670W 0.34 ± 0.02; 20 mV WT 0.30 ± 0.03 L1670W 0.32 ± 0.02; Welch t-test, n = 13 for all groups. **(E)** τ (ms) of the development of fast inactivation at the indicated potentials: -60 mV, τ_{DEV-WT} = 25.6 ± 2.2 (n = 12), τ_{DEV-L1670W} = 8.6 ± 1.4 (n = 4; p = 0.009); -50 mV, τ_{DEV-WT} = 11.3 ± 2.0 (n = 10), τ_{DEV-L1670W} = 2.4 ± 0.8 (n = 7; p = 0.002); -40 mV, τ_{DEV-WT} = 2.8 ± 1.1 (n = 6), τ_{DEV-L1670W} = 3.6 ± 0.4 (n = 7); Mann-Whitney test. **(F)** τ (ms) of the recovery from fast inactivation at the indicated potentials: (Continued)

FIGURE 3 | Continued

–120 mV, $\tau_{\text{REC-WT}} = 1.4 \pm 0.2$ (n = 7), $\tau_{\text{REC-L1670W}} = 0.8 \pm 0.2$ ms (n = 4); –110 mV, $\tau_{\text{REC-WT}} = 1.7 \pm 0.2$ ms (n = 7), $\tau_{\text{REC-L1670W}} = 0.79 \pm 0.09$ ms (n = 3; p = 0.02); –100 mV, $\tau_{\text{REC-WT}} = 2.7 \pm 0.3$ ms (n = 8), $\tau_{\text{REC-L1670W}} = 1.2 \pm 0.2$ ms (n = 4; p = 0.014); –90 mV, $\tau_{\text{REC-WT}} = 5.6 \pm 0.9$ ms (n = 7), $\tau_{\text{REC-L1670W}} = 1.7 \pm 0.6$ ms (n = 5; p = 0.02); –80 mV, $\tau_{\text{REC-WT}} = 9.8 \pm 1.9$ ms (n = 7), $\tau_{\text{REC-L1670W}} = 2.9 \pm 0.8$ ms (n = 6; p = 0.02); Mann-Whitney test.

(G) Left panel, comparison of the same mean normalized current traces displayed in **(B)**, but with a longer time scale in order to compare I_{NaP} ; right panel, mean current-voltage plots for I_{NaP} measured after 5 min from the establishment of the whole-cell configuration and expressed as percentage of the transient current (maximal I_{NaP} : $4.0 \pm 1.5\%$ n = 21 WT, $14.9 \pm 2.1\%$ n = 22 L1670W; p = 0.002 Mann-Whitney test). Data are shown as mean \pm SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

hyperexcitability of GABAergic interneurons. However, they have been obtained with incubation at 30°C, in order to rescue folding/trafficking defects of L1670W and increase its insertion into the plasma membrane. To investigate the effect of a neuronal cell background and use conditions that are more similar to pathophysiological ones, we performed experiments in transfected neocortical neurons. In fact, in our previous study of the FHM L1649Q Na_v1.1 mutant, we observed rescue when it was expressed in neocortical GABAergic neurons without incubation at 30°C (Cestèle et al., 2013b).

Effects of L1670W on hNa_v1.1 in Neocortical Neurons

Primary neuronal cultures were prepared from E17 mouse embryos and neocortical neurons were transfected 4 days after the preparation with wild-type Na_v1.1 or the L1670W mutant. In these experiments we introduced into the two clones the F383S mutation that confers resistance to the blocker TTX and does not modify functional properties, in order to block endogenous sodium currents with TTX and record selectively from the exogenous hNa_v1.1 channels (Cestèle et al., 2013b; Bechi et al., 2015). Therefore, we performed whole-cell patch-clamp recordings 24 h–48 h after transfection from fluorescent neurons expressing the reporter YFP in the presence of 1 μ M TTX.

Figure 6A displays representative sodium current traces and shows that hNa_v1.1-L1670W mutants are partially rescued when expressed in neocortical neurons incubated at 37°C. Thus, incubation at lower temperature is not necessary for partially rescuing L1670W in a GABAergic neuron cell background, similarly to the results that we obtained with the FHM L1649Q mutation (Cestèle et al., 2013b). However, the current density of L1670W was significantly reduced by about 50% in comparison with that recorded with WT channels (**Figure 6A**, inset), differently than in tsA-201 cells incubated at 30°C, in which

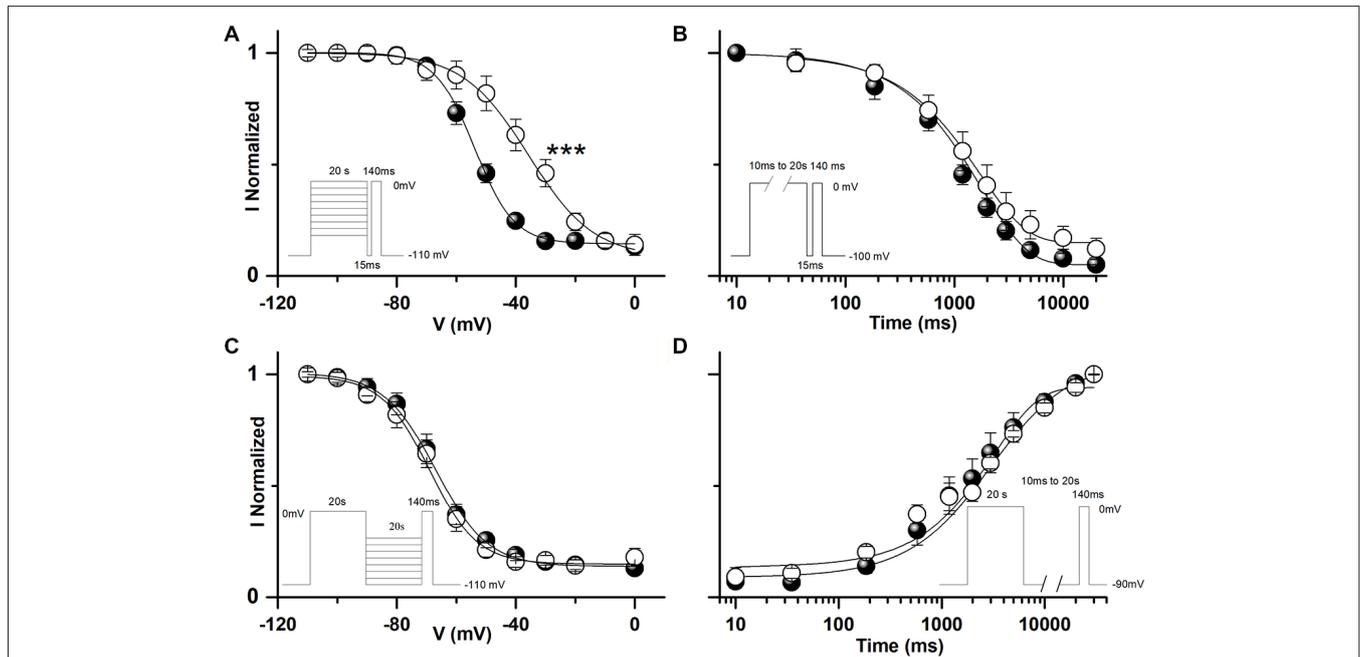
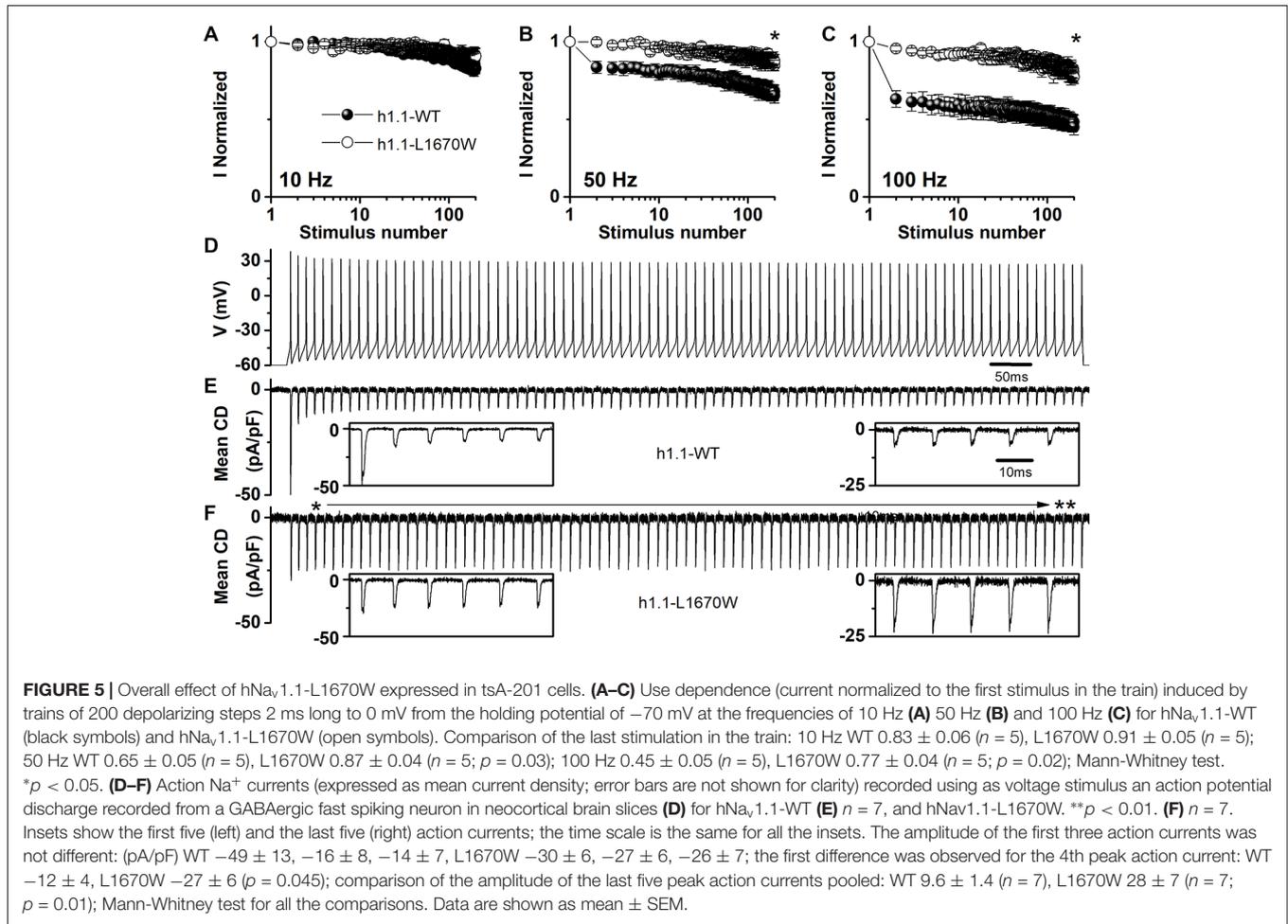


FIGURE 4 | Functional effects of hNa_v1.1-L1670W on slow inactivation upon rescue in tsA-201 cells. **(A)** Voltage dependence of development of slow inactivation; the lines are mean Boltzmann fits: mean parameters, hNa_v1.1-WT, $V_h = -53.5 \pm 2.0$ mV, $K_h = 7.6 \pm 0.9$ mV, baseline 0.14 ± 0.03 (n = 11); hNa_v1.1-L1670W, $V_h = -34.8 \pm 2.7$ mV (p = 2×10^{-4}), $K_h = 10.0 \pm 1.4$, baseline 0.13 ± 0.03 (n = 6). ***p < 0.001. **(B)** Mean kinetics of development of slow inactivation at 0 mV for the indicated durations, the lines are mean fits of single exponentials: mean parameters, $\tau_{\text{DEV-WT}} = 1310 \pm 184$ ms, baseline 0.08 ± 0.02 (n = 8), $\tau_{\text{DEV-L1670W}} = 2070 \pm 283$ ms, baseline 0.15 ± 0.04 (n = 6). **(C)** Voltage dependence of recovery from slow inactivation; the lines are mean Boltzmann fits: mean parameters, WT, $V_h = -66.9 \pm 2.4$ mV, $K_h = 7.4 \pm 1.2$ mV, baseline 0.15 ± 0.03 (n = 8); L1670W, $V_h = -68.3 \pm 2.9$ mV, $K_h = 7.5 \pm 0.9$ baseline 0.15 ± 0.04 (n = 6). **(D)** Mean recovery at –90 mV from slow inactivation; the lines are mean fits of single exponentials: mean parameters, $\tau_{\text{DEV-WT}} = 3252 \pm 892$ ms (n = 6), $\tau_{\text{DEV-L1670W}} = 3449 \pm 383$ ms (n = 5). Welch *t*-test for all the comparisons. The insets show the voltage stimuli; the relative durations of the steps are not in scale (see the durations indicated). Data are shown as mean \pm SEM.



L1670W current density showed a trend towards reduction that did not reach statistical significance (Figure 2). Thus, we next investigated whether L1670W modifies hNa_v1.1 gating properties in neurons similarly to tsA-201 cells and whether the overall effect is gain of function also in neurons, despite the reduction in current amplitude. As shown in Figure 6B, the analysis of the voltage dependence of activation and of fast inactivation yielded results that are similar to those obtained in tsA-201 cells (Figure 3A). In fact, the conductance-voltage plot showed a significant positive shift in the voltage-dependence of activation (9 mV on average), the inactivation curve showed a larger positive shift (20 mV on average) and the inactivation was not complete (the baseline was increased 2.9-fold). Consistently and similarly to the data obtained with tsA-cells, L1670W increased I_{NaP} by 2.4-fold, as shown by the mean current-voltage plots for I_{NaP} expressed as percentage of the transient current (Figure 6C). The quantification of the current onset kinetics over a range of potentials (Figure 6D) showed a trend that was similar to the effect observed in tsA-201 cells, but it did not reach statistical significance. Similarly, the kinetics of current decay showed a trend that was similar to the effect observed in tsA-201 cells, but only the point at –10 mV was significantly different (Figure 6E). We did not study slow

inactivation properties because the protocols are challenging for recordings from neurons in primary culture. These results show that the effect on gating properties is similar in GABAergic neurons and tsA-201 cells, with some effects clearly inducing a gain of function and others clearly inducing a loss of function.

We investigated the overall effect of the mutation in transfected GABAergic neurons by action potential clamp experiments. Figures 6E,G show action currents elicited expressing the WT or the L1670W mutant, respectively, and applying a fast-spiking neuron discharge as voltage command. Comparing the amplitudes of the action currents expressed as current density, we found that the first current in the discharge showed a trend towards larger amplitude for the WT, which did not reach statistical significance, whereas the average of the peak amplitude of the last five currents in the discharge showed a 1.7-fold increase for L1670W, consistent with an overall gain of function.

This data indicates that in a GABAergic neuronal cell background the conditions needed to allow the expression of the hNa_v1.1-L1670W mutant at the plasma membrane are present. The effects observed on gating properties are in agreement with those that we obtained in tsA-201 cells and the action potential

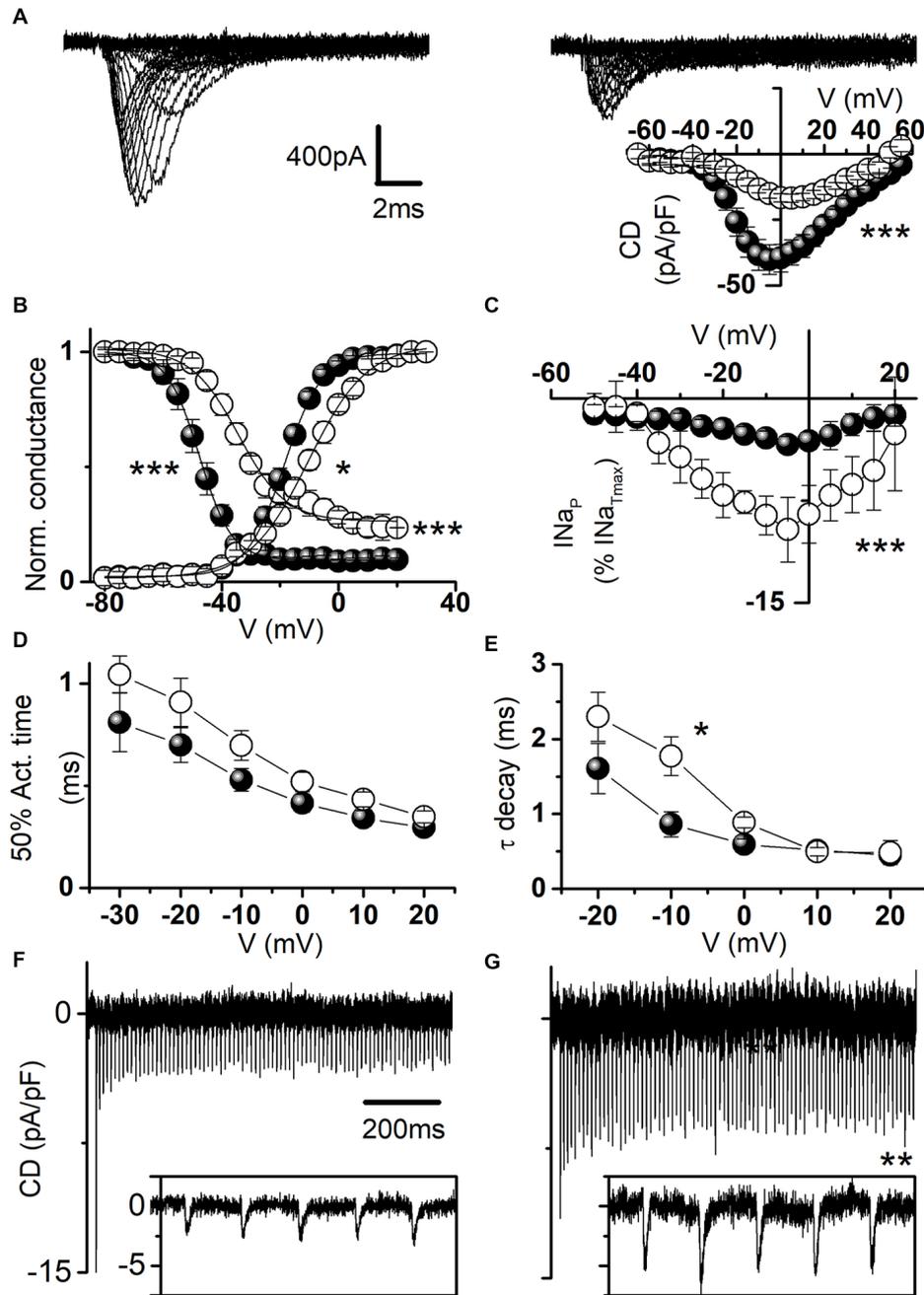


FIGURE 6 | Functional effects of hNav_{1.1}-L1670W expressed in neocortical GABAergic neurons. **(A)** Representative whole-cell sodium current traces recorded in the presence of 1 μ M tetrodotoxin (TTX) from fusiform bipolar GABAergic neurons selected in primary cultures of neocortical neurons transfected with hNav_{1.1}-F383S-WT (left) or hNav_{1.1}-F383S-L1670W (right); the inset displays the mean current density-voltage plots for hNav_{1.1}-F383S-WT and hNav_{1.1}-F383S-L1670W, and the comparison of the mean maximum current density yielded: WT 41.9 ± 5.7 pA/pF $n = 22$; L1670W 19.4 ± 1.5 pA/pF $n = 20$ ($p = 7 * 10^{-4}$), Mann-Whitney test. **(B)** Mean voltage dependence of activation and fast inactivation, lines are mean Boltzmann fits; mean parameters: voltage of half activation (V_a) and slope (K_a) for WT ($n = 16$), $V_a = -17.5 \pm 1.3$ mV, $K_a = 5.1 \pm 0.3$, L1670W ($n = 15$), $V_a = -8.4 \pm 1.4$ mV ($p = 10^{-4}$), $K_a = 7.7 \pm 0.8$ mV ($p = 0.01$); voltage of half inactivation (V_h), slope (K_h) and baseline for WT ($n = 15$), $V_h = -48.1 \pm 1.9$ mV, $K_h = 4.3 \pm 0.2$ mV, baseline = 0.09 ± 0.03 , L1670W ($n = 9$), $V_h = -27.9 \pm 1.5$ mV ($p = 3 * 10^{-4}$), $K_h = 5.1 \pm 0.7$ mV, baseline = 0.26 ± 0.06 ($p = 5 * 10^{-4}$); Welch t -test. **(C)** Mean current-voltage plots for I_{NaP} measured after 5 min from the establishment of the whole-cell configuration and expressed as percentage of maximal I_{NaP} : WT $5.6 \pm 0.9\%$ $n = 21$, L1670W $13.6 \pm 1.9\%$ $n = 22$, $p = 0.005$, Mann-Whitney test). **(D)** Time (ms) of half-activation of the current at the indicated potentials: -30 mV WT 0.81 ± 0.14 , L1670W 1.05 ± 0.09 ; -20 mV WT 0.70 ± 0.08 , L1670W 0.9 ± 0.1 ; -10 mV WT 0.53 ± 0.05 , L1670W 0.69 ± 0.07 ; 0 mV WT 0.41 ± 0.04 , L1670W 0.52 ± 0.04 ; 10 mV WT 0.34 ± 0.04 L1670W 0.43 ± 0.03 ; 20 mV WT 0.29 ± 0.03 L1670W 0.35 ± 0.03 ; non-significant differences, Welch t -test, $n = 15$ for all (Continued)

FIGURE 6 | Continued

groups. **(E)** Voltage dependence of the time constant (τ in ms) of the current decay (single exponential fits at the indicated potentials): -20 mV WT 1.6 ± 0.3 , L1670W 2.3 ± 0.3 ; -10 mV WT 0.86 ± 0.18 , L1670W 1.77 ± 0.26 ($p = 0.02$); 0 mV WT 0.59 ± 0.07 , L1670W 0.88 ± 0.07 ; 10 mV WT 0.51 ± 0.06 , L1670W 0.49 ± 0.05 ; 20 mV WT 0.45 ± 0.05 , L1670W 0.48 ± 0.16 ; Welch t -test, $n = 15$ for all groups. Whole-cell action sodium currents (expressed as mean current density; error bars are not shown for clarity) recorded as in **Figures 5D–F** using as voltage stimulus an action potential discharge recorded in a neocortical mouse brain slice from a GABAergic fast spiking neuron for WT ($n = 11$; **F**) and L1670W ($n = 9$; **G**): comparison of the amplitude of the first peak action current in the discharge, WT 19.6 ± 2.9 pA/pF; L1670W 12.7 ± 1.8 pA/pF; the first action current with amplitude statistically different was the 3rd in the discharge: WT 5.9 ± 1.5 pA/pF; L1670W 10.5 ± 1.4 pA/pF ($p = 0.048$); comparison of the average of the last five peak action currents (pooled) in the discharge, WT 5.2 ± 0.8 pA/pF; L1670W 9.0 ± 1.0 pA/pF ($p = 0.01$); Welch t -test for all the comparisons. Data are shown as mean \pm SEM.

clamp experiments show that the overall effect of hNa_v1.1-L1670W is gain of function.

DISCUSSION

We report the functional characterization of the L1670W hNa_v1.1/*SCN1A* missense mutation, which we identified in a Caucasian American family presenting with FHM, and that was previously found in a Chinese family with pure FHM (Zhang et al., 2017). None of the patients of the two families reported epilepsy or other clinical issues that have been associated to Na_v1.1 hemiplegic migraine mutations, such as cerebellar ataxia or ERDB. Thus, L1670W is a recurrent mutation identified in different ethnic groups causing pure hemiplegic migraine. Notably, our index patient had progressive cognitive impairment after receiving standard whole brain radiation for cancer treatment, at a dose that is usually well tolerated. In our knowledge, this is the first report of a *SCN1A* positive patient showing this clinical feature. Interestingly, *SCN1A* is among the genes up-regulated after low dose brain radiation (Lowe et al., 2009), but it has never been investigated whether brain radiation has higher risk for patients with FHM or other *SCN1A* mutations. The results of our study show that the mutation in some conditions causes an almost complete loss of function of Na_v1.1 because of folding/trafficking defects. However, the mutant is partially rescued by incubation at lower temperature or by expression in neurons (the latter is a condition that more closely mimics *in vivo* pathophysiological conditions) and, upon rescue, the modifications of gating properties induced by L1670W lead to an overall gain of function, similarly to other FHM-3 mutations. Interestingly, Na_v1.1 gain of function and radiation-induced upregulation of *SCN1A* might act together to cause brain injury upon radiation therapy. Importantly, we report a single case with this clinical feature and the effect of the radiation therapy may be just coincidental, but it will be important to shed light on this issue in future studies.

Na_v1.1 is the target of hundreds of mutations implicated in different epilepsy phenotypes (Marini and Mantegazza, 2010; Meisler et al., 2010; Catterall, 2012; Guerrini et al., 2014).

Migraine and epilepsy share some pathologic features. They are episodic disorders in which patients are affected sporadically with paroxysmal attacks. Moreover, aberrant neuronal excitability is implicated in the pathological mechanisms of both diseases. However, of the 11 Na_v1.1 mutations linked thus far to hemiplegic migraine, nine cause hemiplegic migraine without epilepsy (Mantegazza and Cestèle, 2018), consistently with different pathological mechanisms between epileptogenic and migraine Na_v1.1 mutations. Thus, the comparison of the functional effects of L1670W and of other Na_v1.1 migraine mutations with those of Na_v1.1 epileptogenic mutation can contribute to shed light on the differential pathological mechanisms of migraine and epilepsy.

Numerous functional studies and gene-targeted mouse models have shown that epileptogenic mutations cause loss of function of Na_v1.1 (Guerrini et al., 2014), whereas we and others have shown that hemiplegic migraine Na_v1.1 mutations cause gain of function of the channel (Cestèle et al., 2008, 2013a,b; Fan et al., 2016). We confirm here that also L1670W causes an overall gain of function. Na_v1.1 is expressed mainly in GABAergic neurons; thus, epileptogenic mutations lead to hypoexcitability of these neurons and reduced inhibition in cortical networks, consistent with the epileptic phenotype observed in patients and gene targeted mice (Yu et al., 2006; Ogiwara et al., 2007; Han et al., 2012; Hedrich et al., 2014). The pathologic mechanism of FHM Na_v1.1 mutations is more counterintuitive. We have shown that FHM-related Na_v1.1 gain of function induces hyperexcitability of transfected GABAergic neurons (Cestèle et al., 2008, 2013b). This effect is confirmed for L1670W by the action potential clamp experiments that we have performed applying as voltage command a GABAergic neuronal discharge (recorded from a fast spiking neuron), which elicits larger sodium currents in both tsA-201 cells and GABAergic neurons transfected with L1670W in comparisons with Na_v1.1-WT.

We have hypothesized that hyperexcitability of GABAergic neurons could cause extracellular K⁺ and neurotransmitter accumulation, inducing neuronal depolarization and initiation of cortical spreading depression, a wave of transient network hyperexcitability leading to a long-lasting depolarization block of neuronal firing that is a proposed pathological mechanism of migraine (Cestèle et al., 2008, 2013b; Mantegazza and Cestèle, 2018). As in other episodic disorders, migraine patients show symptoms during paroxysmal attacks. The attacks are sporadic in FHM3: in general 3/4 per year, as in our family. It is hypothesized that mutations involved in episodic disorders do not directly trigger attacks, but lower the threshold for trigger factors (Pietrobon and Moskowitz, 2013). FHM mutations could lower the threshold for cortical spreading depression triggers. It is interesting to note that, as shown by our use dependence experiments (**Figures 5A–C**), L1670W induces a net increase in current only when channels are activated at high frequency. This feature has been observed also for other FHM-3 mutations (Cestèle et al., 2008, 2013b; Fan et al., 2016) and is consistent with dysfunctions induced mainly in some functional states (when neuronal networks are challenged and neurons fire at high frequency).

As our present and previous studies show, one striking functional effect that epileptogenic and migraine Na_v1.1 missense mutations can have in common is the rescuable reduction of current density, which depends on reduced channel density in the plasma membrane (Bechi et al., 2015). This effect can be caused by folding or trafficking defects (including protein instability in the plasma membrane). Although we have not investigated detailed mechanisms, the rescue induced by incubation at low temperature is shared by numerous folding defective mutants. They are recognized as incorrectly folded proteins by the quality control system of the endoplasmic reticulum and degraded, but they can be rescued by physical conditions (e.g., low temperature) or molecular interactions (Bernier et al., 2004; Terragni et al., 2018). Interestingly, the overall effect of epileptogenic hNa_v1.1 mutations remains loss of function also upon rescue (Rusconi et al., 2007, 2009; Cestèle et al., 2013b). We have shown here that also L1670W induces rescuable folding/trafficking defects, but when rescued its overall effect becomes gain of function, similarly to the L1649Q FHM-3 mutant that we have previously studied (Cestèle et al., 2013b). Therefore, L1670W is a further FHM-3 mutant showing this feature, which may be a common mechanism for FHM-3 mutations. Interestingly, both L1649Q and L1670W showed an almost complete loss of function when expressed in tsA-201 cells, whereas expression in neurons induced a partial rescue. However, effects on gating properties were similar both in tsA-201 cells and in neurons. Overall, the differential effect upon rescue is consistent with the hypothesis that epileptogenic Na_v1.1 mutants cause loss of function, whereas the FHM-3 ones cause gain of function.

Notably, the differential cell background between tsA-201 cells and neurons does not provide the same rescuing conditions but does not modify the effects on gating properties. This discrepancy between cell lines and neurons should be taken into account when functional studies are performed, because lack of rescue would lead to the identification of loss of function effects for mutants that instead induce gain of function. In our experiments with cell lines, we have not co-expressed interacting proteins because their effect, including that of accessory β subunits, is mutation-dependent (Cestèle et al., 2013b; Bechi et al., 2015) and it is not possible to test all the interacting proteins identified and their combinations. On the other end, neurons provide a more physiologic cell background. Although transfected cells are reduced experimental systems, they allow screens of numerous mutations and investigations of detailed functional properties that are much more difficult to perform with other systems (Mantegazza et al., 2010). The identification of the best conditions for their use (e.g., using in parallel cell lines and neurons) can allow obtain reliable results.

Our functional analysis of hNa_v1.1-L1670W points out that the gain of function is mainly caused by the destabilization of the inactivated states, both in tsA-201 cells and in GABAergic neurons (positive shift of the voltage dependence of fast inactivation, increase of I_{NaP} , faster development and faster recovery of fast inactivation and positive shift of the voltage

dependence of development of slow inactivation). We observed an analogous effect for L1649Q, the other folding/trafficking defective FHM-3 Na_v1.1 mutant that we have studied (Cestèle et al., 2013b), with similar modifications of fast inactivation and increase of I_{NaP} . In particular, increase of I_{NaP} is a common effect that we have observed in FHM migraine mutations (Cestèle et al., 2008, 2013a,b). Interestingly, L1670W and L1649Q show distinct effect on slow inactivation, because L1670W modifies mainly the voltage dependence of the development whereas L1649Q modifies mainly the other properties of slow inactivation, including kinetics. These differences in functional effects may be explained by the fact that they are localized in different structural region of the channel. Both L1670W and L1649Q are in the domain IV (DIV) of Na_v1.1 (**Figure 1B**), in the intracellular loop between transmembrane segments S4 and S5 and in the transmembrane segment S4 (the positively charged voltage sensor), respectively. Notably, most of the Na_v1.1 hemiplegic migraine mutations described so far in the literature are in DIV or in the intracellular loop between DIII and DIV, and all the mutations causing pure FHM are in DIV, except the mutation I1498M that is in the inactivation loop (**Figure 1**). These are regions directly involved in inactivation of the channel. The loop between DIII and IV is the inactivation loop, which acts as a hinged lid that blocks the pore when the channel is in fast inactivated states (Catterall, 2014). DIV is essential for activation-inactivation coupling, because DIV voltage sensor activates (S4 moves outward) after the voltage sensors of the other domains, inducing a distinct pore conformation that leads to fast inactivation (Goldschen-Ohm et al., 2013). The intracellular loop between transmembrane segments S4 and S5, in which L1670W is located, is the functional linker between the voltage sensing modules and the pore modules. The comparison of the crystal structures of channels in different states has shown that the outward movement of S4 driven by depolarization induces a movement of the S4-S5 linker, which causes a bending and twisting motion of S5 and S6, that open the pore and, in domain IV, to the establishment of a pore conformation that leads to inactivation (Catterall, 2014).

Interestingly, another FHM-3 mutation (F1661L) has been identified in DIV S4-S5 loop, but functional studies have not been performed (Weller et al., 2014). However, there are other Na_v1.1 missense mutations in these regions: 14 mutations of DIV-S4 and 14 of DIV S4-S5 linker have been identified in epileptic patients¹. We have performed the functional study of the S4-S5 linker M1664K mutation, which caused a complete loss of function of hNa_v1.1, because the mutant was expressed but not targeted to the plasma membrane and the rescuing approaches that we have tested, including incubation at lower temperature, were unsuccessful (Bechi et al., 2015). Thus, rescuing properties are different also for mutants that are at very close locations in the same structural region. The functional study of another DIV S4-S5 mutation, F1661S, showed reduced current density, impaired recovery from slow inactivation and increased I_{NaP} (Rhodes et al., 2004). DIV S4 mutations that

¹<http://www.caae.org.cn/gznews/scn1adatabase/index.php>

have been functionally studied are R1648H (which facilitated inactivation; Tang et al., 2009; Hedrich et al., 2014), R1648C (which induced a negative shift of the fast inactivation curve, a positive shift of the activation curve and an increase of I_{NaP}; Rhodes et al., 2005), I1657M (which induced a negative shift of the fast inactivation curve and a positive shift of the activation curve; Lossin et al., 2003), and R1657C (which induced reduced current density, a positive shift of the activation curve and accelerated recovery from fast and slow inactivation; Lossin et al., 2003). Therefore, the overall effect of these epileptogenic mutations is consistent with loss of function and, in general, the final effect of a mutation does not directly depend on the structural region in which it is located.

Altogether, we have characterized the functional effect of the sixth mutant causing pure FHM-3. The loss of function caused by a major reduction of current density transformed into overall gain of function when the mutant is rescued suggests a recurrent mechanism for FHM-3 mutations. Therefore, our study provides important insights into the mechanism of FHM-3 mutations and can contribute to the understanding of differential pathophysiological mechanisms in comparison with epileptogenic mutations.

REFERENCES

- Bechi, G., Rusconi, R., Cestele, S., Striano, P., Franceschetti, S., and Mantegazza, M. (2015). Rescuable folding defective Nav1.1 (SCN1A) mutants in epilepsy: properties, occurrence, and novel rescuing strategy with peptides targeted to the endoplasmic reticulum. *Neurobiol. Dis.* 75, 100–114. doi: 10.1016/j.nbd.2014.12.028
- Bechi, G., Scalmani, P., Schiavon, E., Rusconi, R., Franceschetti, S., and Mantegazza, M. (2012). Pure haploinsufficiency for Dravet syndrome Nav1.1 (SCN1A) sodium channel truncating mutations. *Epilepsia* 53, 87–100. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03346.x
- Bernier, V., Lagacé, M., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2004). Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 222–228. doi: 10.1016/j.tem.2004.05.003
- Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J. Physiol.* 590, 2577–2589. doi: 10.1113/jphysiol.2011.224204
- Catterall, W. A. (2014). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Exp. Physiol.* 99, 35–51. doi: 10.1113/expphysiol.2013.071969
- Cestèle, S., Labate, A., Rusconi, R., Tarantino, P., Mumoli, L., Franceschetti, S., et al. (2013a). Divergent effects of the T1174S SCN1A mutation associated with seizures and hemiplegic migraine. *Epilepsia* 54, 927–935. doi: 10.1111/epi.12123
- Cestèle, S., Schiavon, E., Rusconi, R., Franceschetti, S., and Mantegazza, M. (2013b). Nonfunctional Nav1.1 familial hemiplegic migraine mutant transformed into gain of function by partial rescue of folding defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110, 17546–17551. doi: 10.1073/pnas.1309827110
- Cestèle, S., Scalmani, P., Rusconi, R., Terragni, B., Franceschetti, S., and Mantegazza, M. (2008). Self-limited hyperexcitability: functional effect of a familial hemiplegic migraine mutation of the Na_v1.1 (SCN1A) Na⁺ channel. *J. Neurosci.* 28, 7273–7283. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4453-07.2008
- De Fusco, M., Marconi, R., Silvestri, L., Atorino, L., Rampoldi, L., Morgante, L., et al. (2003). Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump α 2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat. Genet.* 33, 192–196. doi: 10.1038/ng1081
- Dichgans, M., Freilinger, T., Eckstein, G., Babini, E., Lorenz-Depiereux, B., Biskup, S., et al. (2005). Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet* 366, 371–377. doi: 10.1016/s0140-6736(05)66786-4

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SD performed electrophysiological experiments and analysis, and participated to the writing of the manuscript. EL performed the clinical part of the study and participated in the writing of the clinical/genetic results. SM supervised the genetic analysis and participated in the writing of the genetic results. NL performed DNA sequencing. MM supervised the electrophysiological experiments and their analysis and participated in the writing of the manuscript. SC performed molecular biology experiments and preliminary electrophysiological experiments, performed data analysis and wrote the manuscript.

FUNDING

This research was supported by the Investissements d’Avenir-Laboratory of Excellence “Ion Channels Science and Therapeutics” (Agence Nationale de la Recherche; grant LabEx ICST ANR-11-LABX-0015-01), the European Union project DESIRE (grant no. EFP7-602531) and the “Fédération Hospitalo-Universitaire” FHU-INOVPAIN (France).

- Diener, H. C., Dodick, D. W., Goadsby, P. J., Lipton, R. B., Olesen, J., and Silberstein, S. D. (2012). Chronic migraine—classification, characteristics and treatment. *Nat. Rev. Neurol.* 8, 162–171. doi: 10.1038/nrneurol.2012.13
- Fan, C., Wolking, S., Lehmann-Horn, F., Hedrich, U. B., Freilinger, T., Lerche, H., et al. (2016). Early-onset familial hemiplegic migraine due to a novel SCN1A mutation. *Cephalalgia* 36, 1238–1247. doi: 10.1177/0333102415608360
- Ferrari, M. D., Klever, R. R., Terwindt, G. M., Ayata, C., and van den Maagdenberg, A. M. (2015). Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. *Lancet Neurol.* 14, 65–80. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70220-0
- Goadsby, P. J., Holland, P. R., Martins-Oliveira, M., Hoffmann, J., Schankin, C., and Akerman, S. (2017). Pathophysiology of migraine: a disorder of sensory processing. *Physiol. Rev.* 97, 553–622. doi: 10.1152/physrev.00034.2015
- Goldschen-Ohm, M. P., Capes, D. L., Oelstrom, K. M., and Chanda, B. (2013). Multiple pore conformations driven by asynchronous movements of voltage sensors in a eukaryotic sodium channel. *Nat. Commun.* 4:1350. doi: 10.1038/ncomms2356
- Guerrini, R., Marini, C., and Mantegazza, M. (2014). Genetic epilepsy syndromes without structural brain abnormalities: clinical features and experimental models. *Neurotherapeutics* 11, 269–285. doi: 10.1007/s13311-014-0267-0
- Han, S., Tai, C., Westenbroek, R. E., Yu, F. H., Cheah, C. S., Potter, G. B., et al. (2012). Autistic-like behaviour in Scn1a^{+/-} mice and rescue by enhanced GABA-mediated neurotransmission. *Nature* 489, 385–390. doi: 10.1038/nature11356
- Hedrich, U. B., Liautard, C., Kirschenbaum, D., Pofahl, M., Lavigne, J., Liu, Y., et al. (2014). Impaired action potential initiation in GABAergic interneurons causes hyperexcitable networks in an epileptic mouse model carrying a human Nav1.1 mutation. *J. Neurosci.* 34, 14874–14889. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0721-14.2014
- Lossin, C. (2009). A catalog of SCN1A variants. *Brain Dev.* 31, 114–130. doi: 10.1016/j.braindev.2008.07.011
- Lossin, C., Rhodes, T. H., Desai, R. R., Vanoye, C. G., Wang, D., Carniciu, S., et al. (2003). Epilepsy-associated dysfunction in the voltage-gated neuronal sodium channel SCN1A. *J. Neurosci.* 23, 11289–11295. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-36-11289.2003
- Lowe, X. R., Bhattacharya, S., Marchetti, F., and Wyrobek, A. J. (2009). Early brain response to low-dose radiation exposure involves molecular networks and pathways associated with cognitive functions, advanced aging and Alzheimer’s disease. *Radiat. Res.* 171, 53–65. doi: 10.1667/RR1389.1

- Mantegazza, M., and Cestèle, S. (2018). Pathophysiological mechanisms of migraine and epilepsy: similarities and differences. *Neurosci. Lett.* 667, 92–102. doi: 10.1016/j.neulet.2017.11.025
- Mantegazza, M., Gambardella, A., Rusconi, R., Schiavon, E., Annesi, F., Cassulini, R. R., et al. (2005). Identification of an Na_v1.1 sodium channel (SCN1A) loss-of-function mutation associated with familial simple febrile seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102, 18177–18182. doi: 10.1073/pnas.0506818102
- Mantegazza, M., Rusconi, R., Scalmani, P., Avanzini, G., and Franceschetti, S. (2010). Epileptogenic ion channel mutations: from bedside to bench and, hopefully, back again. *Epilepsy Res.* 92, 1–29. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2010.08.003
- Marini, C., and Mantegazza, M. (2010). Na⁺ channelopathies and epilepsy: recent advances and new perspectives. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 3, 371–384. doi: 10.1586/ecp.10.20
- Meisler, M. H., O'Brien, J. E., and Sharkey, L. M. (2010). Sodium channel gene family: epilepsy mutations, gene interactions and modifier effects. *J. Physiol.* 588, 1841–1848. doi: 10.1113/jphysiol.2010.188482
- Ogiwara, I., Miyamoto, H., Morita, N., Atapour, N., Mazaki, E., Inoue, I., et al. (2007). Na_v1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J. Neurosci.* 27, 5903–5914. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5270-06.2007
- Ophoff, R. A., Terwindt, G. M., Vergouwe, M. N., van Eijk, R., Oefner, P. J., Hoffman, S. M., et al. (1996). Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell* 87, 543–552. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81373-2
- Pietrobon, D., and Moskowitz, M. A. (2013). Pathophysiology of migraine. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 365–391. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183717
- Rhodes, T. H., Lossin, C., Vanoye, C. G., Wang, D. W., and George, A. L. Jr. (2004). Noninactivating voltage-gated sodium channels in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 11147–11152. doi: 10.1073/pnas.0402482101
- Rhodes, T. H., Vanoye, C. G., Ohmori, I., Ogiwara, I., Yamakawa, K., and George, A. L. Jr. (2005). Sodium channel dysfunction in intractable childhood epilepsy with generalized tonic-clonic seizures. *J. Physiol.* 569, 433–445. doi: 10.1113/jphysiol.2005.094326
- Rusconi, R., Combi, R., Cestele, S., Grioni, D., Franceschetti, S., Dalpra, L., et al. (2009). A rescuable folding defective Na_v1.1 (SCN1A) sodium channel mutant causes GEFS+: common mechanism in Na_v1.1 related epilepsies? *Hum. Mutat.* 30, E747–E760. doi: 10.1002/humu.21041
- Rusconi, R., Scalmani, P., Cassulini, R. R., Giunti, G., Gambardella, A., Franceschetti, S., et al. (2007). Modulatory proteins can rescue a trafficking defective epileptogenic Na_v1.1 Na⁺ channel mutant. *J. Neurosci.* 27, 11037–11046. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3515-07.2007
- Scalmani, P., Rusconi, R., Armatura, E., Zara, F., Avanzini, G., Franceschetti, S., et al. (2006). Effects in neocortical neurons of mutations of the Na_v1.2 Na⁺ channel causing benign familial neonatal-infantile seizures. *J. Neurosci.* 26, 10100–10109. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2476-06.2006
- Schaller, K. L., Krzemien, D. M., McKenna, N. M., and Caldwell, J. H. (1992). Alternatively spliced sodium channel transcripts in brain and muscle. *J. Neurosci.* 12, 1370–1381. doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-04-01370.1992
- Sivilotti, L., Okuse, K., Akopian, A. N., Moss, S., and Wood, J. N. (1997). A single serine residue confers tetrodotoxin insensitivity on the rat sensory-neuron-specific sodium channel SNS. *FEBS Lett.* 409, 49–52. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00479-1
- Tang, B., Dutt, K., Papale, L., Rusconi, R., Shankar, A., Hunter, J., et al. (2009). A BAC transgenic mouse model reveals neuron subtype-specific effects of a generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) mutation. *Neurobiol. Dis.* 35, 91–102. doi: 10.1016/j.nbd.2009.04.007
- Terragni, B., Scalmani, P., Franceschetti, S., Cestèle, S., and Mantegazza, M. (2018). Post-translational dysfunctions in channelopathies of the nervous system. *Neuropharmacology* 132, 31–42. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.05.028
- Vecchia, D., and Pietrobon, D. (2012). Migraine: a disorder of brain excitatory-inhibitory balance? *Trends Neurosci.* 35, 507–520. doi: 10.1016/j.tins.2012.04.007
- Weller, C. M., Pelzer, N., de Vries, B., López, M. A., De Fàbregues, O., Pascual, J., et al. (2014). Two novel SCN1A mutations identified in families with familial hemiplegic migraine. *Cephalalgia* 34, 1062–1069. doi: 10.1177/0333102414529195
- Yu, F. H., Mantegazza, M., Westenbroek, R. E., Robbins, C. A., Kalume, F., Burton, K. A., et al. (2006). Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat. Neurosci.* 9, 1142–1149. doi: 10.1038/nn1754
- Zhang, Y., Chen, N., Zhou, M., Guo, J., Guo, J., and He, L. (2017). A novel SCN1A mutation identified in a Chinese family with familial hemiplegic migraine: a case report. *Cephalalgia* 37, 1294–1298. doi: 10.1177/0333102416677049

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Dhifallah, Lancaster, Merrill, Leroudier, Mantegazza and Cestèle. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Partie 2

Relation phénotype/génotype de 23 mutations *SCN2A*

Objectif 2: Relation phénotype/génotype de 23 mutations *SCN2A*

La seconde partie de ma thèse est ciblée sur l'étude de mutations situées sur le gène *SCN2A*, responsables d'un large spectre de pathologies.

Les études fonctionnelles réalisées précédemment par l'équipe ont montré que les mutations associées à l'Epilepsie Néonatale et Infantile Familiale Bénigne (ENIFB) induisent un gain de fonction des canaux $Na_v1.2$. Ce gain de fonction entraîne une hyperexcitabilité des neurones excitateurs et de l'ensemble du réseau neuronal pouvant être à l'origine des crises d'épilepsie (Scalmani et coll., 2006).

En ce qui concerne les mutations responsables d'encéphalopathies épileptiques néonatales ou infantiles, il a été montré qu'elles conduisent à un gain de fonction et/ou une perte de fonction lorsqu'elles sont exprimées dans des lignées cellulaires de type HEK (Ogiwara et coll., 2009) (Berecki et coll., 2018) (Wolff et coll., 2017) (Begemann et coll., 2019). Pour les mutations liées à la schizophrénie et aux absences, aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée à ce jour.

Afin de mieux comprendre ces mécanismes, nous avons étudié les effets fonctionnels de 23 mutations hétérozygotes situées sur le gène *SCN2A* et responsables de différentes pathologies: l'autisme, les EE infantiles, le syndrome d'Ohtahara (EE néonatale), la schizophrénie, les absences et l'autisme associé à l'épilepsie.

1. Etude fonctionnelle de mutations *SCN2A* responsables de TSA

1.1 Les mutations *SCN2A* liées aux TSA conduisent à une perte de fonction des canaux $Na_v1.2$

Nous avons sélectionné six mutations décrites dans la littérature comme étant à l'origine d'un phénotype autistique sans épilepsie associée. Pour avoir un groupe hétérogène, nous avons choisi trois mutations faux-sens et trois mutations non-sens localisées à différents endroits de la structure du canal $Na_v1.2$.

A cette sélection s'ajoute une 7^{ème} mutation (faux-sens), nouvellement identifiée par l'équipe du Dr Renzo Guerrini avec qui nous collaborons.

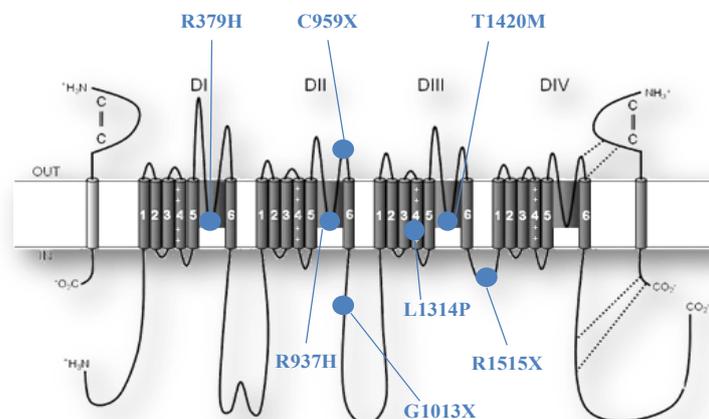


Figure 36: Localisation des 7 mutations *SCN2A* responsables de TSA

Tableau 4: Liste des mutations *SCN2A* dans les TSA

Mutations	Position orf	Phénotype	Identification
R379H faux-sens <i>de novo</i>	c.1136 G>A	Autisme	De Rubeis et coll, Nature 2014
R937H faux-sens <i>de novo</i>	c.2810 G>A	Autisme	De Rubeis et coll, Nature 2014
C959X non-sens <i>de novo</i>	c.2877 C>A	Autisme/retard du développement modéré	Sanders et coll, Nature 2012
G1013X non-sens <i>de novo</i>	c.3037 G>T	Autisme avec un retard du développement sévère	Sanders et coll, Nature 2012
L1314P faux-sens <i>de novo</i>	c.3941 T>C	Autisme/retard psychomoteur sévère/absence du langage	Dr Renzo Guerrini Nouvelle mutation
T1420M faux-sens <i>de novo</i>	c.4259 G>A	Autisme sans retard du développement	Lossifov et coll, Nature 2014
R1515X non-sens <i>de novo</i>	c.4543 C>T	Autisme avec un retard du développement sévère	D Gama et coll, Neuron 2015

Grâce à la technique de patch-clamp en configuration cellule entière, nous avons enregistré l'activité de neurones néocorticaux en culture exprimant soit le canal WT humain hNa_v1.2 soit le canal hNa_v1.2 porteur d'une des 7 mutations. Ensuite, nous avons comparé les propriétés biophysiques de chaque canal muté avec celles du canal WT.

Les mutations non-sens C959X, G1013X et R1515X ainsi que les mutations faux-sens R937H et L1314P conduisent toutes à une suppression totale de la densité de courant des neurones néocorticaux (**Figure 37A-B**).

En revanche, les neurones exprimant la mutation R379H ont une densité de courant fortement réduite par rapport aux neurones exprimant les canaux WT (WT : 46.6±6.8 pA/pF, n=29 ; R379H : 14.1±2.4 pA/pF, n=9 ; p=0.01961) (**Figure 37B**), suggérant ainsi que la mutation conduit à une perte de fonction quasi-totale des canaux Na_v1.2.

La mutation T1420M entraîne une diminution de la densité de courant (T1420M: 24.6±2.8 pA/pF, n=8) (**Figure 37A-B**), un déplacement de la courbe d'activation vers des potentiels plus dépolarisés (WT: -15.8±1.3mV, n=22 ; T1420M: -11.5±1.4, n=7) et un déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés (WT: -51.8±1.3mV, n=24 ; T1420M: -55.8±1.3, n=5) (**Figure 37C**). Nous avons ensuite enregistré les courants Na⁺ générés par les neurones en réponse à une décharge neuronale enregistrée au préalable dans un neurone exciteur. En effet, les courants Na⁺ enregistrés en réponse à la stimulation reflètent l'effet global de la mutation qui est parfois difficile à démontrer lorsqu'on analyse seulement les effets sur la densité de courant, l'activation et l'inactivation.

Les neurones exprimant la mutation T1420M génèrent des courants Na⁺ qui ont une densité de courant inférieure à celle des neurones exprimant les canaux WT (**Figure 37D**), ce qui indique que l'effet global de la mutation conduit à une perte de fonction des canaux Na_v1.2.

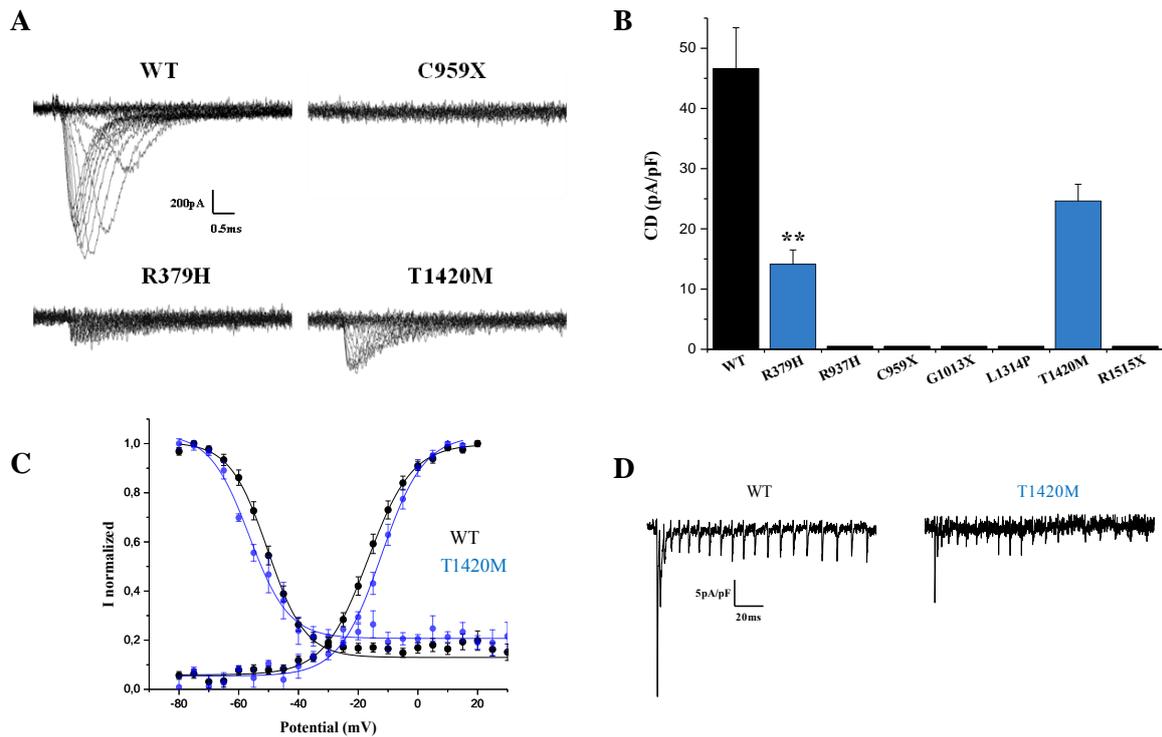


Figure 37 : Les canaux porteurs de mutations *SCN2A* responsables de TSA conduisent, dans la majorité des cas, à une réduction totale ou quasi-totale de la densité de courant des canaux sodiques potentiel-dépendants $Na_v1.2A$ / Traces représentatives des courants Na^+ enregistrés en configuration cellule entière enregistrés dans les neurones néocorticaux en culture exprimant les canaux WT, R379H, C959X ou T1420M. B/ Densités de courant des neurones exprimant les canaux WT ou porteurs des mutations R379H, R937H, C959X, G1013X, L1314P, T1420M ou R1515X. C/ Courbes d'activation et d'inactivation des canaux WT et des canaux porteurs de la mutation T1420M. D/Courants Na^+ enregistrés en réponse à une décharge neuronale dans les neurones exprimant les canaux WT ou les canaux porteurs de la mutation T1420M.

Nous avons également réalisé des enregistrements en current-clamp dans des neurones transfectés avec soit le canal WT soit le canal porteur de la mutation R379H. Pour avoir suffisamment de courant sodium nécessaire à la génération des PA, les canaux Na_v endogènes n'ont pas été bloqués par la TTX.

Nos données révèlent que la mutation R379H conduit à une réduction de la fréquence de décharge et à une réduction de l'amplitude des potentiels d'action (PA) (**Figure 38**).

Par conséquent, les mutations *SCN2A* liées aux TSA conduisent à une perte de fonction, partielle ou totale, des canaux $Na_v1.2$ dans les neurones néocorticaux en culture.

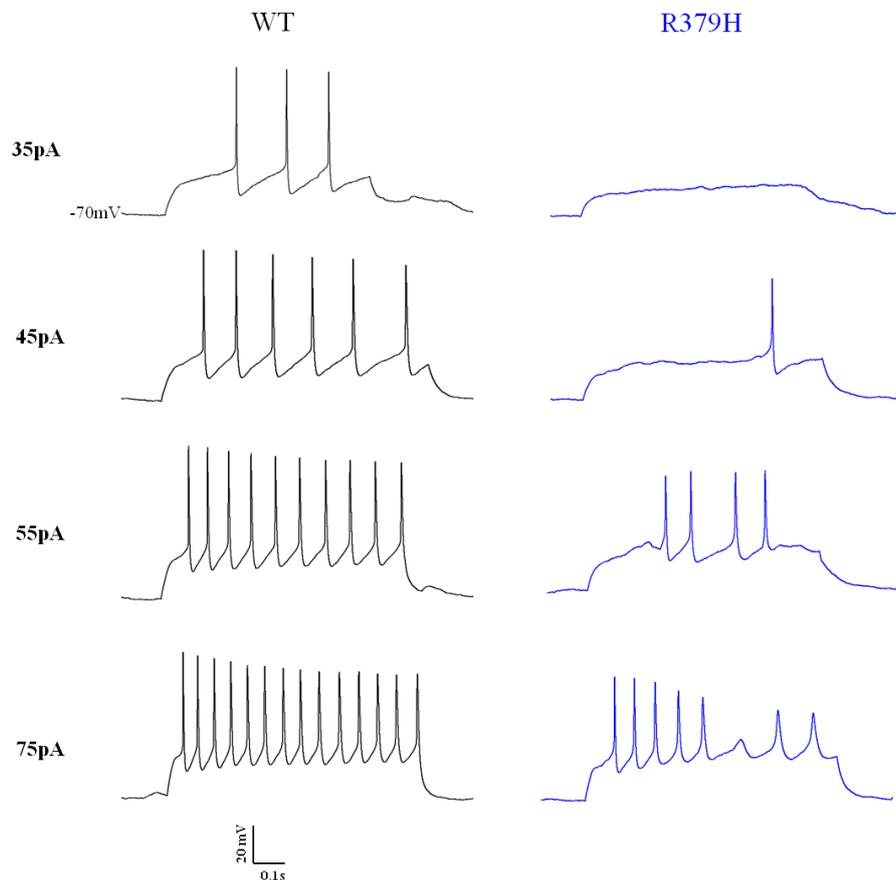


Figure 38: Exemple de décharges enregistrées dans des neurones néocorticaux en culture à 10 jours in vitro, transfectés avec les canaux WT ou R379H. Le potentiel membranaire des neurones est maintenu à -70mV. Des steps de courant de 0 à 150pA sont injectés.

Nos résultats sont en accord avec l'étude menée par le groupe de Bender dans les lignées cellulaires de type HEK, suggérant que les canaux $\text{Na}_v1.2$ porteurs de mutations responsables du phénotype autistique génèrent très peu ou pas du tout de courant sodium (Ben-Shalom et coll., 2017). Les auteurs concluent que les canaux sont exprimés à la surface de la cellule mais ne sont pas conductibles. Or, les canaux peuvent être retenus dans le RE puis dégradés par le protéasome. Ils ne sont donc pas présents à la surface cellulaire, d'où l'absence de courant sodique.

Afin de savoir si les mutants s'expriment à la membrane, avons réalisés des marquages immunocytochimiques sur des cellules tsA-201 transfectées avec soit le canal WT soit le canal porteur d'une des 7 mutations. L'utilisation d'un marqueur de surface cellulaire (Membrite) nous permet de visualiser la membrane des cellules tsA-201. Les acquisitions sont réalisées à l'aide d'un microscope STED. Nos résultats préliminaires montrent que les canaux exprimant la mutation C959X (perte de fonction totale) ne sont pas localisés au niveau de la membrane contrairement aux canaux WT (**Figure 39**).

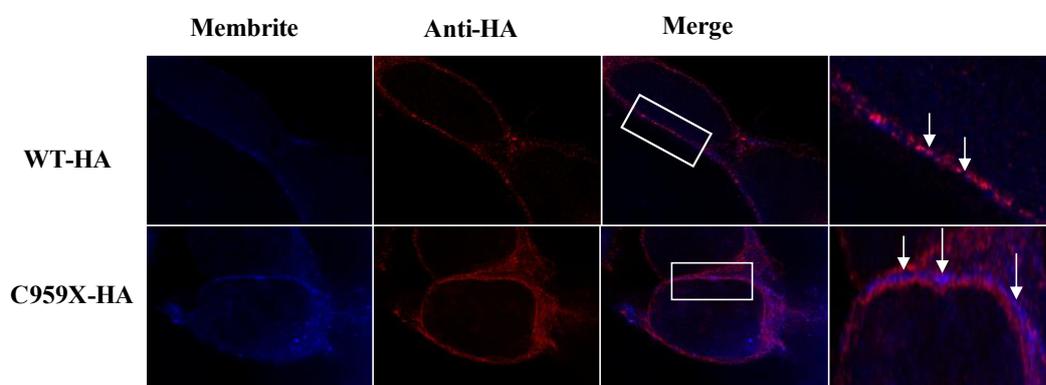


Figure 39 : Localisation des canaux $\text{Na}_v1.2$ WT ou porteurs de la mutation C959X dans les cellules tsA-201. Le membrite marque la membrane des cellules tsA-201 et l'anticorps anti-HA marque les canaux WT-HA ou C959X-HA. Images obtenues avec un microscope STED.

Nous avons ensuite étudié l'impact fonctionnel de chaque canal porteur d'une des 7 mutations *SCN2A* sur les canaux WT.

Pour s'assurer d'être dans les conditions optimales de co-transfection, nous avons analysé la densité de courant en fonction de la quantité d'ADN transfectée (**Figure 40**). Entre 1.5 μg et 3 μg d'ADN, la densité de courant est quasi-identique. La densité de courant diminue à partir

de 1 µg d'ADN, ce qui signifie que le début du plateau se situe entre 1 µg et 1.5 µg d'ADN transfecté. Par conséquent, nous avons choisi de co-transfecter 1 µg d'ADN WT et 1 µg d'ADN mutant pour ne pas être dans la phase de plateau de la densité de courant du WT et s'assurer de voir une possible réduction de cette dernière.

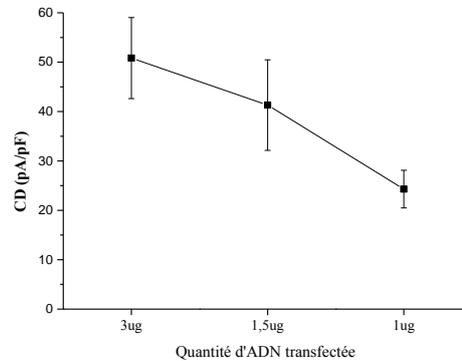


Figure 40 : Courbes représentant la densité de courant enregistrée dans les neurones néocorticaux en culture transfectés avec 1, 1.5 ou 3 µg d'ADN codant pour le canal Na_v1.2

([3 µg]: 50.8 ± 8.2 pA/pF, n=23 ; [1.5 µg]: 41.3 ± 9.2 pA/pF, n=10 ; [1 µg]: 24.3 ± 3.8 pA/pF, n=10).

1.2 Les mutations *SCN2A* responsables de TSA exercent un effet de dominance négative sur les canaux WT

Nous avons co-exprimé dans les neurones le canal WT avec chaque canal porteur d'une des 7 mutations étudiées précédemment (ratio 1:1). Pour être dans des conditions optimales et reproduire la compétition entre deux plasmides, nous avons co-exprimé le canal WT avec le canal potassique Kir4.1 pour la condition contrôle (ratio 1:1). La présence du canal Kir4.1 dans les neurones néocorticaux en culture n'affecte ni la densité de courant ni les propriétés biophysiques des canaux Na_v1.2 WT (**Tableau 5-7**).

Fait intéressant, la densité de courant des canaux WT est réduite de manière significative en présence des canaux mutés (**Figure 41A-B**). En effet, les mutations R379H, R937H, C959X, G1013X, L1314P et R1515X induisent toutes une réduction d'environ 30% de la densité de courant des canaux WT. Seule exception, les canaux porteurs de la mutation T1420M n'ont aucun impact sur la densité de courant des canaux WT (**Figure 41B**).

La diminution importante de la densité de courant rend l'analyse des propriétés biophysiques complexe. Lorsque celles-ci sont mesurables, on constate que les canaux mutés n'altèrent pas l'activation des canaux WT. L'activation potentiel-dépendante des différentes co-expressions WT+R379H, WT+R937H, WT+G1013X, WT+T1420M et WT+R1515X ainsi que

l'inactivation potentiel-dépendante des différentes co-expressions WT+R937H, WT+C959X, T1420M et R1515X sont similaires à celles des canaux WT (**Tableau 6-7**).

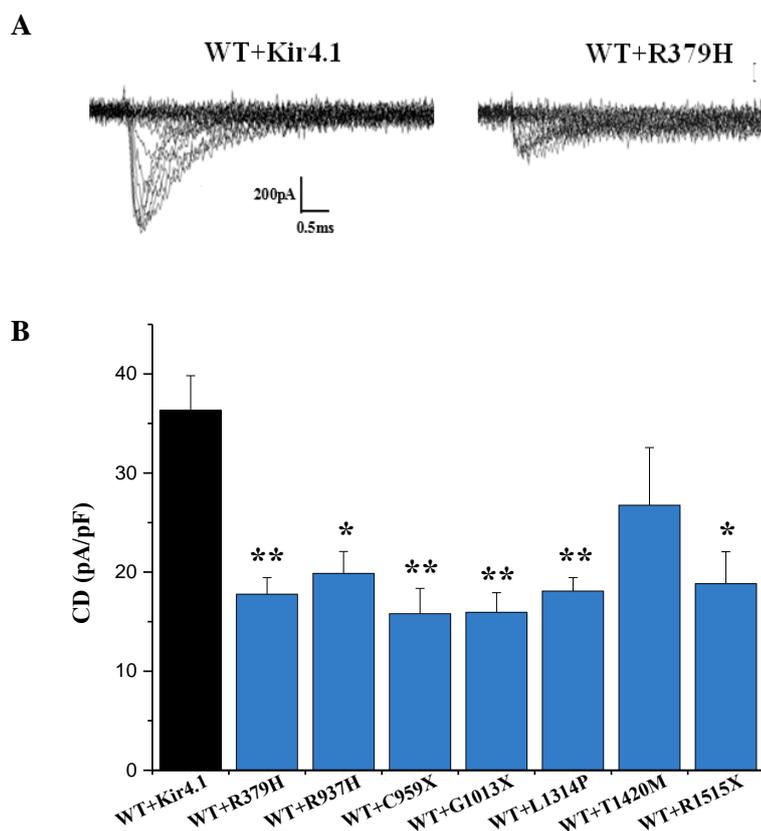


Figure 41: Les canaux porteurs de mutations *SCN2A* responsables de TSA exercent un effet de dominance négative sur les canaux WT. A/ Traces représentatives des courants Na⁺ enregistrés en configuration cellule entière enregistrés dans les neurones néocorticaux en culture exprimant les canaux WT+Kir4.1 (ratio 1:1) ou WT+R379H (ratio 1:1). B/ Densités de courant des différentes co-expressions WT+Kir4.1, WT+R379H, WT+R937H, WT+C959X, WT+G1013X, WT+L1314P, WT+T1420M et WT+R1515X au ratio 1:1 (WT+Kir4.1: 36.3±3.5 pA/pF, n=49 ; WT+R379H: 17.8±1.7 pA/pF, n=17, p=0.00239 ; WT+R937H: 19.8±2.2 pA/pF, n=14, p=0.01865 ; WT+C959X: 15.8±2.5 pA/pF, n=10, p=0.00966 ; WT+G1013X: 16±2 pA/pF, n=14, p=0.00246 ; WT+L1314P: 18.1±1.4 pA/pF, n=13, p=0.00695 ; WT+R1515X: 18.8±3.2 pA/pF, n=6, p=0.0413 ; WT+T1420M: 34.4±5.5 pA/pF, n=5)

Seule la co-expression WT+R379H conduit à un déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus dépolarisés (WT+R379H: -48.7 ± 2.3 mV, $n=5$; $p=0.03186$) pouvant être induit par la présence de quelques canaux à la surface cellulaire (**Tableau 6-7**). En effet, la mutation R379H est la seule à ne pas conduire à une perte de fonction totale des canaux $Na_v1.2$ mais la réduction importante de la densité de courant ($\sim 70\%$) ne permet pas une analyse précise des propriétés biophysiques. Il se peut donc que la mutation ait un effet sur l'inactivation du canal et que cet effet se retrouve dans les conditions de co-expressions où environ 50% des canaux WT et 50% des canaux mutés sont exprimés.

L'ensemble de nos résultats montrent que la majorité des mutations *SCN2A* liées aux TSA conduisent à une réduction de la densité de courant des canaux WT dans les neurones néocorticaux. Ce mécanisme est appelé dominance négative.

Comme il a été décrit dans la partie *Dimérisation α - α* , le groupe d'Isabelle Deschenes a récemment démontré que les canaux sodiques potentiel-dépendants peuvent s'assembler et former des dimères (Clatot et coll, 2017 Nat Commun). L'interaction α - α se fait par l'intermédiaire de la protéine 14.3.3. En formant un pont entre les canaux à deux endroits différents sur leur chaîne polypeptidique, elle leur permet d'interagir physiquement (**Figure 42**). Par conséquent, la dominance négative que nous observons pourrait être la conséquence d'une interaction entre les canaux WT et mutés dans le RE. En effet, si les canaux porteurs de mutations *SCN2A* liées aux TSA présentent des défauts de repliement et/ou de trafic cellulaire, ils sont retenus dans le RE où ils peuvent interagir avec les canaux WT entraînant ainsi tout le complexe à la dégradation. Il en résulte une diminution du nombre de canaux WT adressés à la surface cellulaire, ce qui explique la réduction de la densité de courant des canaux WT que nous observons en présence de ces mutations.

1.3 La dominance négative est la conséquence d'une interaction α - α

Pour savoir si la dominance négative que nous observons est la conséquence d'une interaction entre les canaux WT et les canaux mutés, nous avons utilisé 2 stratégies différentes, proposées par le groupe d'Isabelle Deschenes, pour empêcher l'interaction entre les sous-unités α (Clatot et coll, 2017 Nat Commun). La première stratégie consiste à bloquer la protéine 14.3.3 avec la difopéine et la seconde consiste à remplacer un résidu sérine en alanine en position 487 du

canal $\text{Na}_v1.2$ (S487A) afin d'empêcher la fixation de la protéine 14.3.3 sur le canal (**Figure 42**).

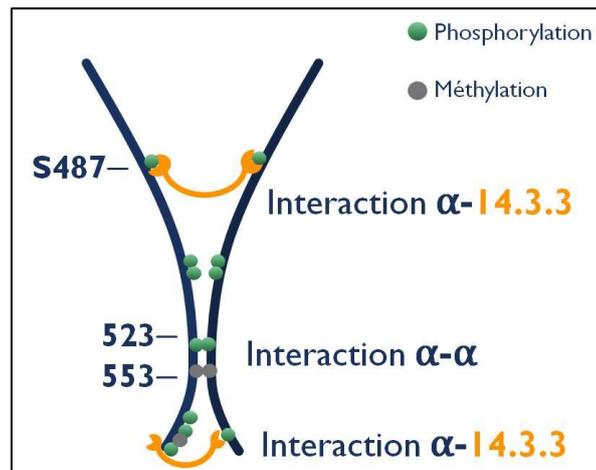


Figure 42 : Représentation schématique de la région d'interaction entre les sous-unités α -II humaine. La protéine 14.3.3 se lie aux sous-unités α à deux endroits différents du canal, au niveau de la boucle intracellulaire reliant DI et DII. Les canaux interagissent entre les résidus 523 et 553. *Modifié d'après Clatot et coll, Nat Commun 2018*

L'analyse des propriétés des canaux WT avec ou sans difopéine ainsi que les propriétés des canaux porteurs de la mutation S487A montre que la difopéine et la mutation S487A n'induisent aucun effet sur la densité de courant et les propriétés biophysiques des canaux $\text{Na}_v1.2$ (**Figure 43**).

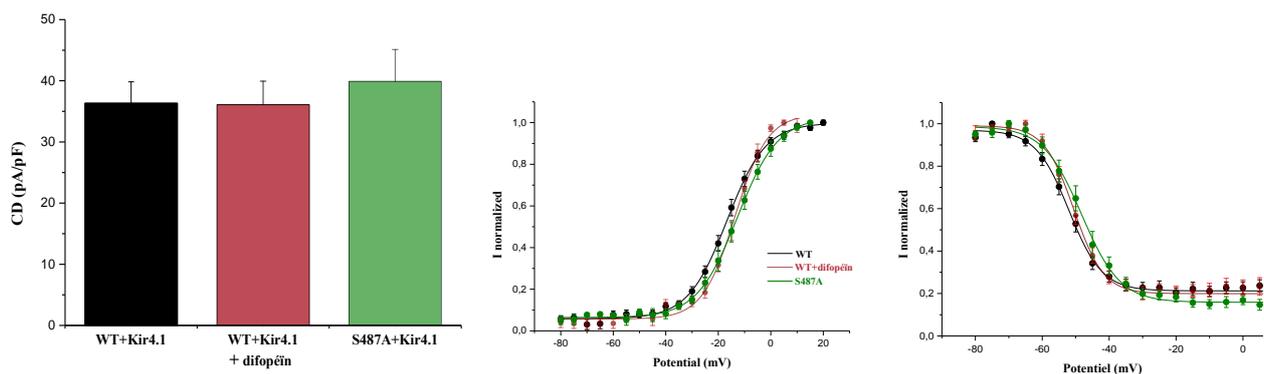


Figure 43 : La difopéine et la mutation S487A n'ont aucun effet sur les canaux WT. A/ Densités de courant des neurones co-transfectés avec les canaux WT+Kir4.1, WT+Kir4.1+difopéine et S487A+Kir4.1 (WT+Kir4.1: 36.3±3.5pA/pF, n=49 ; WT+Kir4.1+difopéine: 36.1±3.8 pA/pF, n=12 ; S487A+Kir4.1: 39.9±5.2 pA/pF, n=10). B/ Courbes d'activation des neurones co-transfectés avec les canaux WT+Kir4.1, WT+Kir4.1+difopéine et S487A+Kir4.1 (WT+Kir4.1 : -15±1mV, n=22 ; WT+Kir4.1+difopéine : -12.7±1.3mV, n=8 ; S487A+Kir4.1 : -11.1±1.4mV, n=8). C/ Courbes d'inactivation des neurones co-transfectés avec les canaux WT+Kir4.1, WT+Kir4.1+difopéine et S487A+Kir4.1 (WT+Kir4.1 : -52.1±1.2mV, n=16 ; WT+Kir4.1+difopéine : -50.8±1.3mV, n=8 ; S487A+Kir4.1 : -48±2mV, n=9).

Nous avons co-exprimé dans les neurones néocorticaux les canaux WT, les canaux mutés et la difopéine (ratio 1:1:0.5). La densité de courant des canaux WT n'est pas altérée par la présence des canaux mutés lorsque la difopéine est exprimée dans les neurones néocorticaux (**Figure 44A-B**).

Nous avons ensuite co-exprimé le canal hNa_v1.2-S487A avec chaque canal porteur d'une mutation *SCN2A* (ratio1:1). La densité de courant des canaux WT n'est pas réduite en présence des canaux mutés confirmant ainsi les résultats obtenus avec la difopéine (**Figure 44A et C**). Par conséquent, les canaux mutés ne sont plus capables d'exercer un effet de dominance négative lorsqu'on empêche la fixation de la protéine 14.3.3 sur les canaux et donc l'interaction entre les sous-unités α .

Ces résultats montrent que l'interaction entre les sous-unités α via la protéine 14.3.3 est à l'origine de la dominance négative observée dans les mutations *SCN2A* responsables du phénotype autistique. Pour la première fois, nous proposons la dominance négative comme nouveau mécanisme des mutations *SCN2A* responsables de TSA.

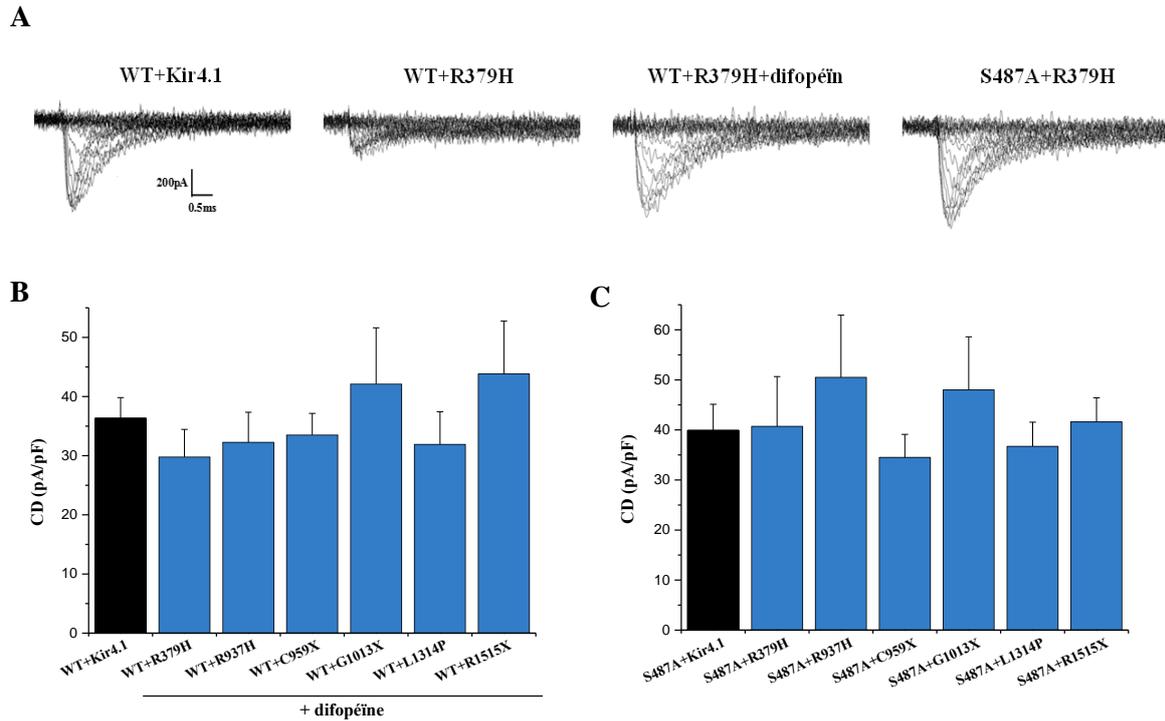


Figure 44 : La dominance négative des mutations SCN2A liées aux TSA est la conséquence d'une interaction entre les sous-unités α . A/ Traces représentatives des courants Na⁺ enregistrés en configuration cellule entière enregistrés dans les neurones néocorticaux en culture exprimant les canaux WT+Kir4.1 (ratio 1:1) ou WT+R379H (ratio 1:1) ou WT+R379H+difopéine (ratio 1:1:0.5) ou S487A+R379H (ratio 1:1) B/ Densités de courant des différentes co-expressions WT+Kir4.1, WT+R379H, WT+R937H, WT+C959X, WT+G1013X, WT+L1314P et WT+R1515X en présence de la difopéine (ratio 1:1:0.5). C/ Densités de courant des différentes co-expressions S487A+Kir4.1, S487A+R379H, S487A+R937H, S487A+C959X, S487A+G1013X, S487A+L1314P et S487A+R1515X (ratio 1:1). Les valeurs sont regroupées dans le tableau n°5.

Tableau 5: Densités de courant des mutations *SCN2A* responsables de TSA et des différentes conditions de co-expressions

	WT ou Mutant	WT + Mutant	WT+Mutant+Difopéine	S487A+Mutant
WT ou S487A	46.6±6.8 pA/pF (n=29)	36.3±3.5 pA/pF (n=49)	36.1±3.8 pA/pF (n=12)	39.9±5.2 pA/pF (n=10)
AUTISME				
R379H	14.1±2.4 pA/pF * (n=9) p=0.0046	17.8±1.7 pA/pF ** (n=17) p=0.00239	29.8±4.7 pA/pF (n=9)	40.7±9.9 pA/pF (n=7)
R937H	Pas de courant	19.8±2.2 pA/pF * (n=14) p=0.01865	32.2±5.1 pA/pF (n=8)	50.5±12.4 pA/pF (n=8)
C959X	Pas de courant	15.8±2.5 pA/pF ** (n=10) p=0.00966	33.5±3.6 pA/pF (n=10)	34.5±4.6 pA/pF (n=8)
G1013X	Pas de courant	16±2 pA/pF ** (n=14) p=0.00246	42.1±9.5 pA/pF (n=10)	48±11 pA/pF (n=8)
L1314P	Pas de courant	18.1±1.4 pA/pF ** (n=13) p=0.00695	31.9±5.5 pA/pF (n=10)	36.7±4.8 pA/pF (n=7)
T1420M	24.6±2.8 pA/pF (n=8)	34.4±5.5 pA/pF (n=5)	ND	40.5±8.5 pA/pF (n=6)
R1515X	Pas de courant	18.8±3.2 pA/pF * (n=6) p=0.0413	43.8±8.9 pA/pF (n=6)	41.6±4.8 pA/pF (n=5)

ND : non disponible

Tableau 6 : Potentiel de demi-activation (V_{half}) des mutations *SCN2A* responsables de TSA et des différentes conditions de co-expressions

	WT ou Mutant	WT + Mutant	WT+ Mutant + Difopéine	S487A+Mutant
WT ou S487A	-15.8±1.3 mV (n=22)	-15±1 mV (n=12)	-12.7±1.3 mV (n=8)	-11.1±1.4mV (n=8)
AUTISME				
R379H	ND	-15 ±2 mV (n=8)	-16.9±1.1 mV (n=9)	-14.7±2.2 mV (n=6)
R937H	ND	-14.9±2.3 mV (n=5)	-9.8±3.2 mV (n=7)	-13.8±2.3 mV (n=6)
C959X	ND	ND	-13±1 mV (n=8)	-15.3±1.6 mV (n=7)
G1013X	ND	-10±2 mV (n=6)	-14.5±2.5 mV (n=5)	-13±2 mV (n=7)
L1314P	ND	ND	-13.8±0.7 mV (n=6)	-16±2 mV (n=4)
T1420M	ND	-12.8±1.7 mV (n=5)	ND	-12.5±2.3 mV (n=6)
R1515X	ND	-13.8±1.9 mV (n=6)	-16.4±1.8 mV (n=6)	-15.3±1.8 mV (n=5)

Tableau 7: Potentiel de demi-inactivation (V_{half}) des mutations *SCN2A* responsables de TSA et des différentes conditions de co-expressions

	WT ou Mutant	WT + Mutant	WT+ Mutant + Difopéine	S487A+Mutant
WT ou S487A	-51.8±1.3 mV (n=24)	-52.1 ±1.2 mV (n=16)	-50.8±1.3 mV (n=8)	-48±2 mV (n=9)
AUTISME				
R379H	ND	-48.7±2.3mV * (n=5) p=0.03186	-49±1.2 mV (n=6)	-52.9±2.6 mV (n=6)
R937H	ND	-50.3±1.3 mV (n=3)	-54.6±1.8 mV (n=6)	-49.4±1.6 mV (n=6)
C959X	ND	-46.8±2.6 mV (n=3)	-51.5±1.7 mV (n=6)	-51.5±1.5 mV (n=6)
G1013X	ND	ND	-48.3±1.7 mV (n=5)	-48.2±1.8 mV (n=7)
L1314P	ND	ND	-50±1.5 mV (n=6)	-53.7±1.2 mV (n=5)
T1420M	ND	-48.6±1.7 mV (n=5)	ND	-52±2 mV (n=5)
R1515X	ND	-46.5±3.4 mV (n=3)	-51.4±0.8 mV (n=6)	-49.8±1.9 mV (n=5)

Les valeurs de potentiel présentées dans les différents résultats ne correspondent pas aux valeurs réelles car le potentiel de jonction n'a pas été mesuré et pris en compte pour les enregistrements en voltage-clamp et current-clamp.

1.4 Une mutation *SCN2A* responsable de TSA associés à une épilepsie conduit à une perte de fonction des canaux $\text{Na}_v1.2$ sans dominance négative

La mutation R1635Q est une mutation faux-sens *de novo* et hétérozygote. Elle est localisée au niveau du segment S4 de DIV (**Figure 45**).

Il s'agit d'une nouvelle mutation, identifiée par l'équipe du Dr Renzo Guerrini.

Elle a été identifiée chez un garçon de 6 ans qui présente un retard psychomoteur, des traits autistiques et une déficience intellectuelle modérée. L'EEG du patient révèle des décharges épileptiques durant le sommeil suggérant ainsi que le patient souffre de TSA associés à l'épilepsie.

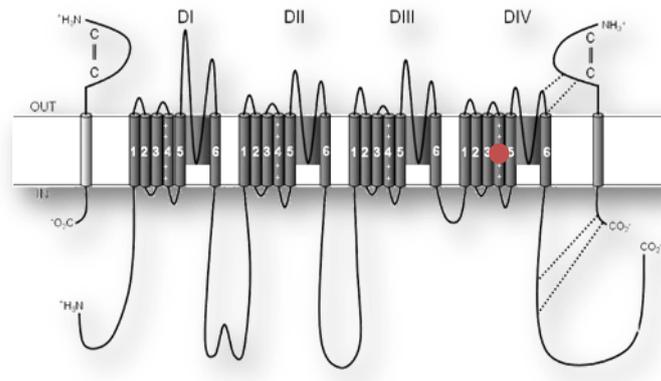


Figure 45 : Localisation de la mutation R1635Q responsable de TSA associés à l'épilepsie

Les enregistrements électrophysiologiques des neurones néocorticaux montrent que les canaux porteurs de la mutation R1635Q ont une densité de courant similaire à celle des canaux WT (WT: $46.6 \pm 6.8 \text{ pA/pF}$, $n=29$; R1635Q: $47.9 \pm 9.7 \text{ pA/pF}$, $n=8$) (**Figure 46A**). L'analyse des propriétés biophysiques des canaux mutés révèle que la mutation R1635Q n'altère pas l'activation du canal (WT: $-15.8 \pm 1.3 \text{ mV}$, $n=22$; R1635Q: $-17 \pm 1 \text{ mV}$, $n=7$), en revanche elle induit un déplacement important de la courbe d'inactivation ($\sim 10 \text{ mV}$) vers des potentiels plus hyperpolarisés conduisant à une perte de fonction des canaux $\text{Nav}1.2$ (WT: $-51.8 \pm 1.3 \text{ mV}$, $n=24$; R1635Q: $-66.1 \pm 3.4 \text{ mV}$, $n=8$, $p=1.65 \cdot 10^{-6}$) (**Figure 46B**). De plus, les courants Na^+ générés par les canaux mutés en réponse à une décharge neuronale ont une densité de courant réduite par rapport à ceux générés par les canaux WT (**Figure 46C-D**).

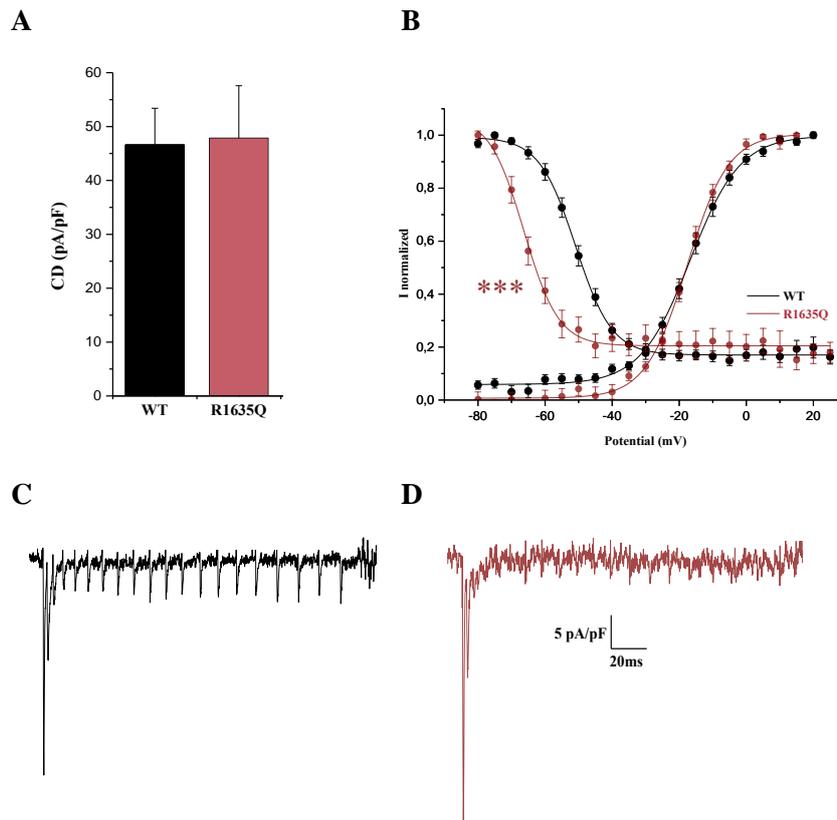


Figure 46 : La mutation R1635Q conduit à une perte de fonction des canaux Nav1.2 dans les neurones néocorticaux en culture. A/ Densités de courant des neurones exprimant les canaux WT ou porteurs de la mutation R1635Q (WT: 46.6 ± 6.8 pA/pF, $n=29$; R1635Q: 47.9 ± 9.7 pA/pF, $n=8$). B/ Courbes d'activation et d'inactivation des canaux WT et R1635Q (WT, $V_a = -15.8 \pm 1.3$ mV, $n=22$ et $V_h = -51.8 \pm 1.3$ mV, $n=24$; R1635Q, $V_a = -15.8 \pm 1.3$ mV, $n=22$ et $V_h = -66.1 \pm 3.4$ mV, $n=8$, $p=1.65 \cdot 10^{-6}$). C/ Courants Na enregistrés en réponse à une décharge neuronale pour les canaux WT et porteurs de la mutation R1635Q (dernier pic, WT : 6.4 ± 1.4 pA/pF, $n=11$; dernier R1635Q : 2.5 ± 1.2 pA/pF, $n=6$).

Compte tenu de la dominance négative observée pour les mutations *SCN2A* liées aux TSA sans épilepsie, nous avons co-exprimé les canaux porteurs de la mutation R1635Q avec les canaux WT dans les neurones néocorticaux en culture. La mutation R1635Q n'a aucun impact sur la densité de courant des canaux WT (**Figure 47A**). L'analyse des propriétés biophysiques de la co-expression des canaux WT+R1635Q révèle une courbe d'inactivation intermédiaire entre l'inactivation des canaux WT et l'inactivation des canaux mutés (**Figure 47C**). Ce résultat indique que les neurones contiennent bien autant de canaux WT que de canaux mutés. Les propriétés biophysiques des canaux S487A+R1635Q sont similaires à celles des canaux WT+R1635Q, confirmant ainsi l'absence d'effet de la mutation R1635Q sur les canaux WT (**Figure 47B-C**).

Au vu de ces résultats, il semblerait que la dominance négative soit spécifique des mutations *SCN2A* responsables de TSA sans phénotype épileptique associé.

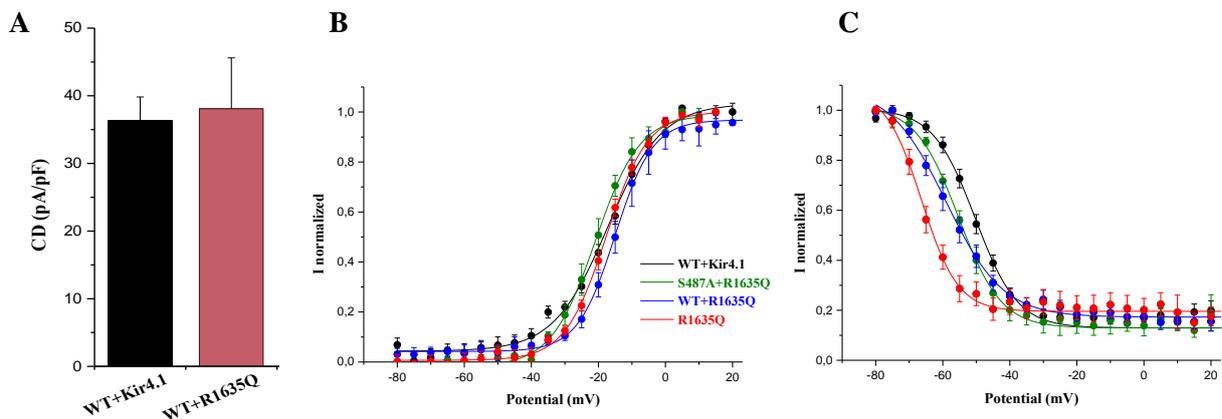


Figure 47: La mutation R1635Q associée aux TSA et à l'épilepsie n'exerce pas de dominance négative sur les canaux WT. A/ Densités de courant des neurones exprimant les canaux WT+ Kir4.1 ou WT+R1635Q (WT+Kir4.1: 36.3 ± 3.5 pA/pF, $n=49$; WT+R1635Q: 32.1 ± 4.5 pA/pF, $n=13$). B et C/ Courbes d'activation et d'inactivation des canaux WT+Kir4.1 et WT+R1635Q (WT+Kir4.1, $V_a = -15 \pm 1$ mV, $n=22$ et $V_h = -52.1 \pm 1.2$ mV, $n=16$; WT+R1635Q, $V_a = -16.6 \pm 2.7$ mV, $n=5$ et $V_h = -58.5 \pm 2.1$ mV, $n=6$, $p=0.00982$).

2. Les mutations *SCN2A* liées aux autres pathologies telles que les EE infantiles, la schizophrénie et les absences conduisent à une perte de fonction des canaux $Na_v1.2$ sans dominance négative

- Etude fonctionnelle de 5 mutations *SCN2A* liées aux EE infantiles dans les neurones néocorticaux en culture

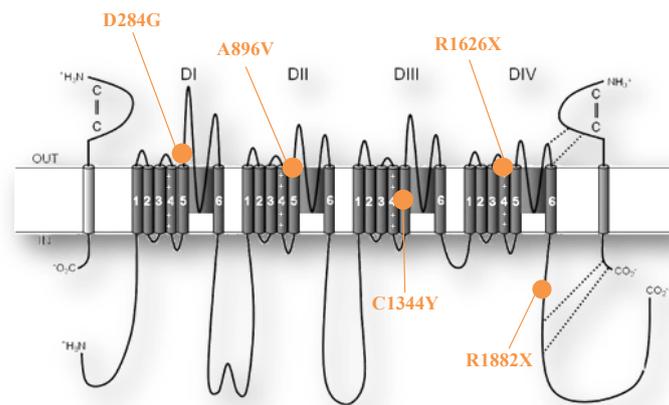


Figure 48 : Localisation des 5 mutations *SCN2A* responsables d'EE

Toutes les mutations étudiées dans ce groupe sont des mutations nouvellement identifiées par le groupe du Dr Renzo Guerrini.

Tableau 8: Liste des mutations *SCN2A* liées responsables d'EE

Mutations	Position orf	Phénotype
D284G faux-sens <i>de novo</i>	c.851 A>G	crises myocloniques dès 3 mois/résistance aux traitements/retard du développement sévère/absence du langage
A896V faux-sens <i>de novo</i>	c.2687 C>T	crises toniques dès 3 ^{ème} jour/résistance aux traitements/ retard du développement sévère/tétraplégie
C1344Y faux-sens <i>de novo</i>	c.4031 G>A	Spasmes dès 18 mois/ résistance aux traitements jusqu'à 3 ans/déficience intellectuelle sévère
R1626X non-sens <i>de novo</i>	c.4876 C>T	crises dès 2ans/résistance aux traitements/retard mental sévère/traits autistiques
R1882X non-sens, transmission autosomique dominante (transmise par le père)	c.5644 C>T	crises tonico-cloniques à partir de 3 ans et 9 mois/crises contrôlées avec l'acide valproïque/ retard du développement /EEG « slow spike and wave discharges »

Les enregistrements de patch-clamp montrent que les canaux porteurs de la mutation D284G et A896V ont une densité de courant similaire à celle des canaux WT tandis que les mutations C1344Y et R1882X conduisent à une réduction de la densité de courant. Enfin, les neurones exprimant la mutation R1626X ne génèrent pas de courant Na⁺ (**Figure 49A**).

Ensuite, avons étudié l'effet des mutations D284G et A896V sur les propriétés biophysiques des canaux Na_v1.2 seulement car les autres mutations génèrent des courants Na⁺ petits qui rendent l'analyse de l'activation et de l'inactivation difficile en configuration cellule entière.

La mutation D284G n'a aucun effet sur l'activation et l'inactivation des canaux Na_v1.2. En revanche, la mutation A896V entraîne un déplacement à la fois de l'activation et de l'inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés (**Figure 49C-D**). L'effet observé sur l'activation conduit à un gain de fonction des canaux tandis que celui observé sur l'inactivation conduit à une perte de fonction des canaux Na_v1.2. Les mutations D284G et A896V n'ont aucun effet sur le courant sodium persistant I_{NaP} tandis que les mutations C1344Y et R1882X conduisent à une augmentation significative de I_{NaP} (**Figure 49B**). Par conséquent, l'analyse des propriétés biophysiques montrent que les mutations A896V, C1344Y et R1882X conduisent à des effets divergents qui tendent à la fois vers une perte et un gain de fonction des canaux Na_v1.2.

Les enregistrements des courants Na⁺ en réponse à une décharge neuronale révèlent que les mutations A896V, C1344Y et R1882X conduisent à une réduction de la densité de courant du 1^{er} pic enregistré, suggérant ainsi que les mutations ont pour conséquence une perte de fonction des canaux Na_v1.2. En revanche, les courants Na⁺ enregistrés en fin de décharge ne sont pas réduits pour les mutants C1344Y et R1882X pour lesquels la densité de courant est fortement réduite. Cela peut s'expliquer par l'augmentation du courant persistant I_{NaP} qui se traduit dans les neurones par une capacité à soutenir les décharges (**Figure 49E**).

Nos résultats montrent que les mutations A896V, C1344Y, R1626X et R1882X induisent une perte de fonction des canaux Na_v1.2 dans les neurones néocorticaux en culture conduisant à une hypoexcitabilité du réseau neuronal.

Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence des effets de la mutations D284G sur les propriétés biophysiques du canal Na_v1.2.

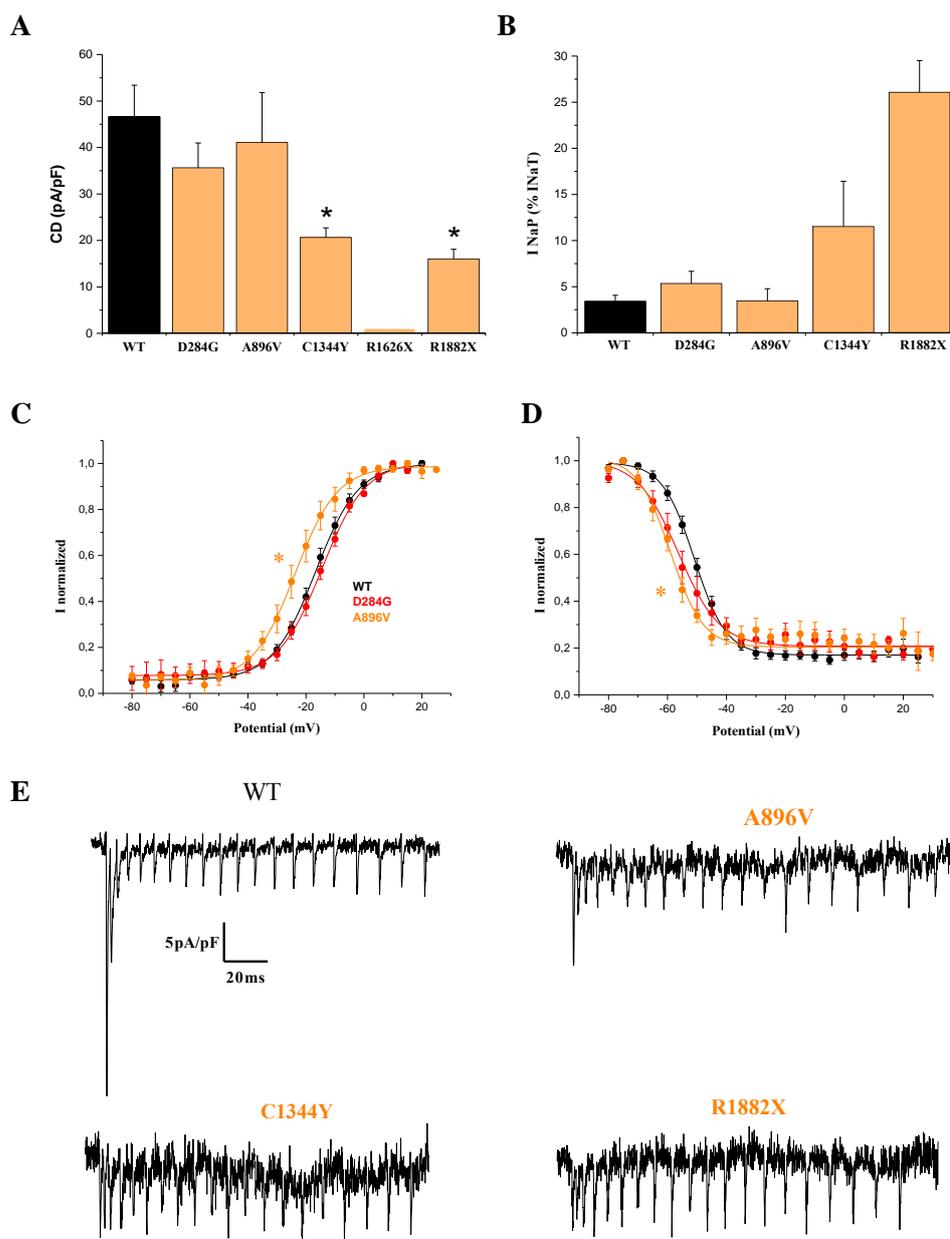


Figure 49 : Effets fonctionnels des mutations *SCN2A* responsables d'EE infantiles dans les neurones néocorticaux en culture. A/ Densités de courant des neurones exprimant les canaux WT ou porteurs des mutations D284G, A896V, C1344Y, R1626X ou R1882X (D284G : 35.6 ± 5.3 pA/pF, $n=16$; A896V : 41.1 ± 10.7 pA/pF, $n=16$; C1344Y : 16 ± 2 pA/pF, $n=7$, $p=0.04509$; R1626X : pas de courant ; R1882X : 17 ± 1 pA/pF, $n=5$, $p=0.02571$). B/ Courants Na^+ persistants des canaux WT ou porteurs des mutations D284G, A896V, C1344Y ou R1882X (% du courant INaT transitoire). C/ Courbes d'activation des canaux WT ou porteurs des mutations D284G ou A896V (WT : -15.8 ± 1.3 mV, $n=22$; D284G : -14.5 ± 1.1 mV, $n=9$; A896V : -22 ± 2 mV, $n=7$, $p=0.0251$). D/ Courbes d'inactivation des canaux WT ou porteurs des mutations D284G ou A896V (WT : -51.8 ± 1.3 mV, $n=24$; D284G : -56.6 ± 2.4 mV, $n=9$; A896V : -59.8 ± 1.6 mV, $n=8$, $p=0.01065$). E/ Courants Na^+ enregistrés en réponse à une décharge neuronale, dans les neurones exprimant les mutations *SCN2A* responsables d'encéphalopathies épileptiques. Densité de courant du 1er pic (WT : 34 ± 6 pA/pF, $n=11$; A896V : 15.8 ± 3.5 pA/pF, $n=6$, $p=0.00752$; C1344Y : 13.4 ± 1.5 pA/pF, $n=7$, $p=0.00178$; R1882X : 13.8 ± 2.3 pA/pF, $n=5$, $p=0.00537$).

- Etude fonctionnelle de 3 mutations *SCN2A* liées à la schizophrénie dans les neurones néocorticaux en culture

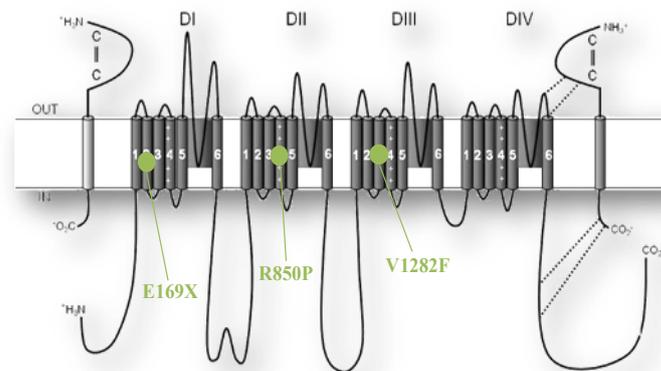


Figure 50 : Localisation de 3 mutations *SCN2A* liées à la schizophrénie

Les mutations E169X, R850P et V1282F ont été identifiées par Carroll et coll en 2016 (**Figure 50**). Les seules informations données sur les patients sont qu'ils souffrent de schizophrénie et sont âgés de 16ans au moins.

Les enregistrements électrophysiologiques des neurones transfectés révèlent que la mutation E169X conduit à une réduction totale de la densité de courant des canaux Na_v1.2. La mutation R850P conduit à une réduction partielle de la densité de courant et la mutation V1282F n'a aucun effet sur les courants générés par les canaux (**Figure 51A**). Les mutations R850P et V1282F n'affectent pas les propriétés biophysiques des canaux sodiques (**Tableau 9**).

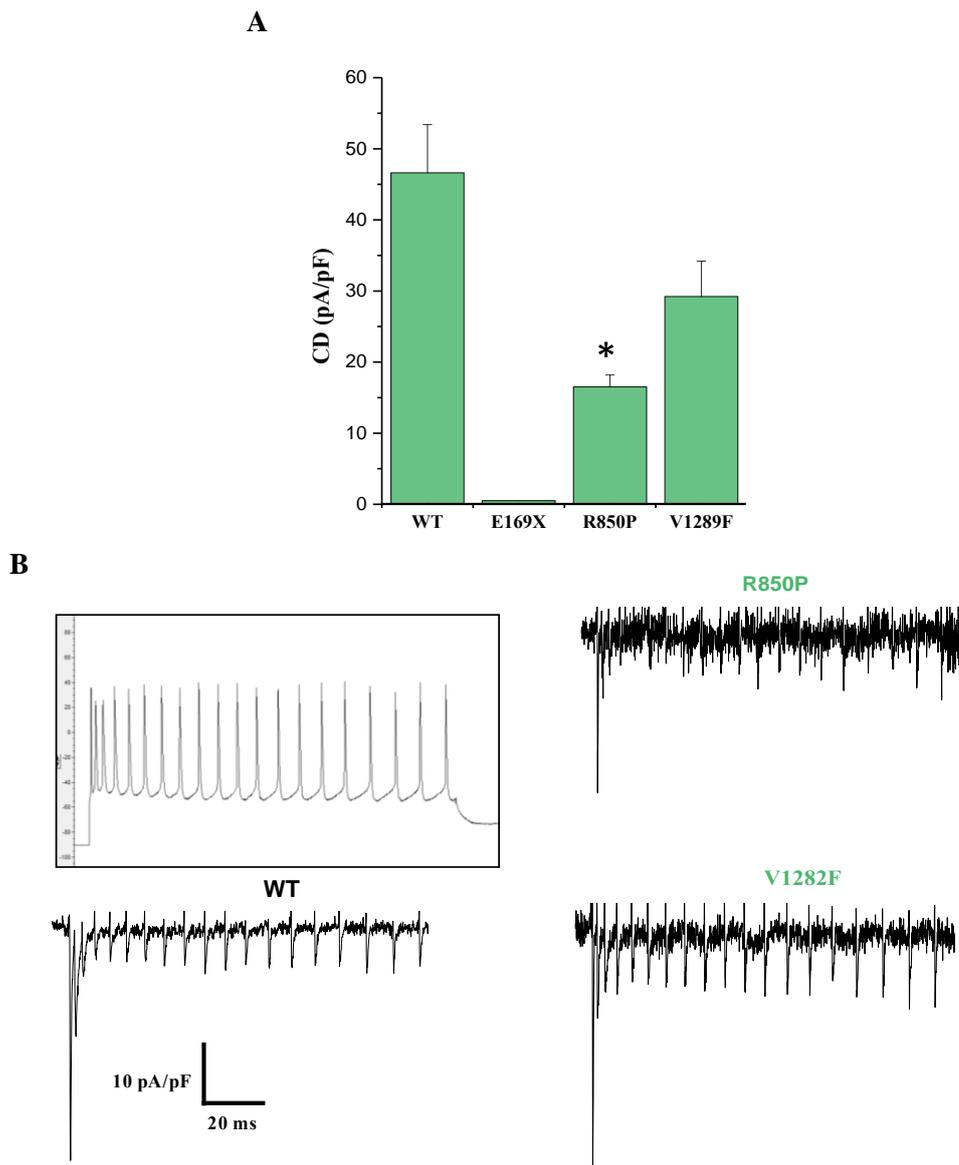


Figure 51 : Effets fonctionnels des mutations *SCN2A* identifiées chez des patients souffrant de schizophrénie. A/ Densités de courant des neurones exprimant les canaux WT ou porteurs des mutations E169X, R850P ou V1282F (WT : 46.6 ± 6.8 pA/pF, n=29 ; E169X : pas de courant ; R850P : 16.5 ± 1.7 pA/pF, n=6, p=0.02006 ; V1282F : 29 ± 5 pA/pF, n=14). B/ Courants Na⁺ enregistrés en réponse à une décharge neuronale, dans les neurones exprimant les mutations *SCN2A* liées à la schizophrénie.

- Etude fonctionnelle d'une mutation *SCN2A* liée aux absences dans les neurones néocorticaux en culture

La mutation G659D est une mutation faux-sens hétérozygote transmise selon le mode autosomique dominant par le père. Elle a été nouvellement identifiée par l'équipe du Dr Renzo Guerrini chez un garçon qui présente des absences depuis l'âge de deux ans. En dehors des absences, l'enfant est normal. C'est la première fois que ce phénotype est associé à une mutation du gène *SCN2A*.

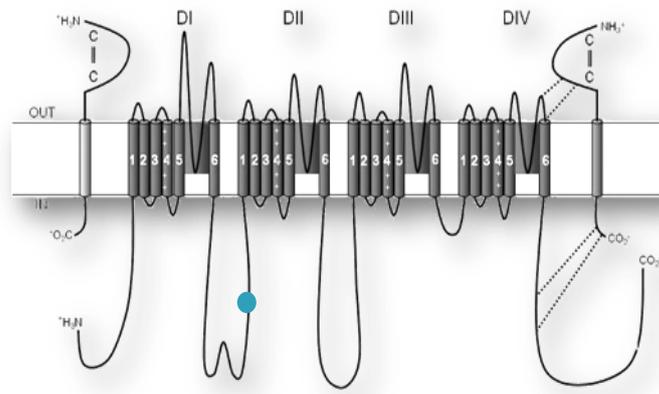


Figure 52 : Localisation de la mutation G659D liée aux absences

L'enregistrement des neurones néocorticaux en configuration cellule entière montre que les canaux porteurs de la mutation G659D ont une densité de courant fortement réduite comparée à celle des canaux WT (**Figure 53A**). De plus, les courants Na^+ générés par les canaux mutés en réponse à une décharge neuronale ont une densité de courant fortement réduite par rapport à ceux générés par les canaux WT et sont à peine détectables (**Figure 53B**), suggérant ainsi que la mutation G659D conduit à une perte de fonction quasi-totale des canaux $\text{Na}_v1.2$ dans les neurones néocorticaux en culture.

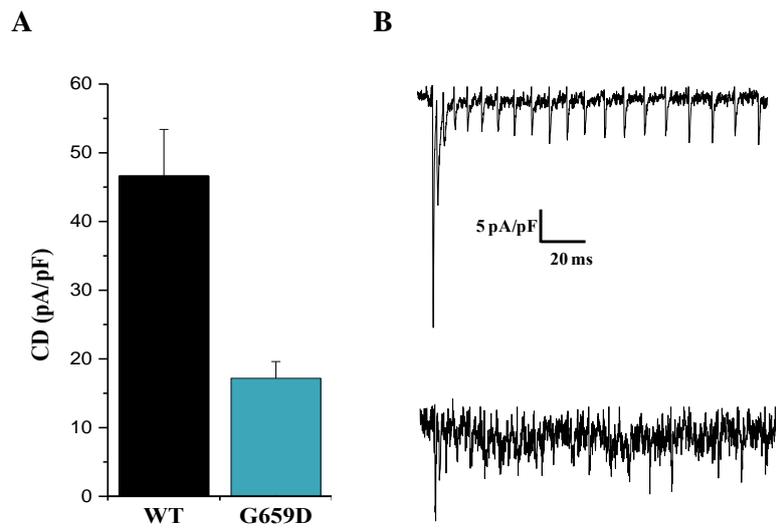


Figure 53 : La mutation *SCN2A* liée aux absences conduit à une perte de fonction nette des canaux $\text{Na}_v1.2$ dans les neurones néocorticaux en culture. A/ Densités de courant des neurones exprimant les canaux WT ou porteurs de la mutation G659D (WT: $46.6 \pm 6.8 \text{ pA/pF}$, $n=29$; G659D: $17.2 \pm 2.4 \text{ pA/pF}$, $n=10$, $p=0.06005$). B/ Courants Na^+ enregistrés en réponse à une décharge neuronale dans des neurones exprimant les canaux WT ou porteurs de la mutation G659D.

L'étude des mutations *SCN2A* responsables d'EE infantiles, de schizophrénie ou encore de crises d'absences a permis de démontrer que ces mutations conduisent à une perte de fonction des canaux $Na_v1.2$ dans la majorité des cas (7/9 mutations).

La perte de fonction observée est souvent la conséquence d'une réduction de la densité de courant des canaux comme cela a été décrit précédemment pour les mutations liées à l'autisme. En effet, les mutations G659D (absences), R850P (schizophrénie), C1344Y (EE), R1882X (EE) induisent une réduction partielle de la densité de courant et les mutations E169X (schizophrénie) et R1626X (EE) induisent une réduction totale de la densité de courant des canaux $Na_v1.2$.

- Etude de l'impact de ces 9 mutations *SCN2A* sur les canaux $Na_v1.2$ WT

Afin de savoir si la dominance négative est un mécanisme partagé par toutes les mutations *SCN2A* associées à une perte de fonction, nous avons co-transfectés les neurones néocorticaux avec le canal WT et un canal porteur d'une des 9 mutations (ratio1:1)

De manière intéressante, la densité de courant (**Figure 54**) et les propriétés biophysiques (**Tableau 9**) des canaux WT ne sont altérées par aucune de ces mutations.

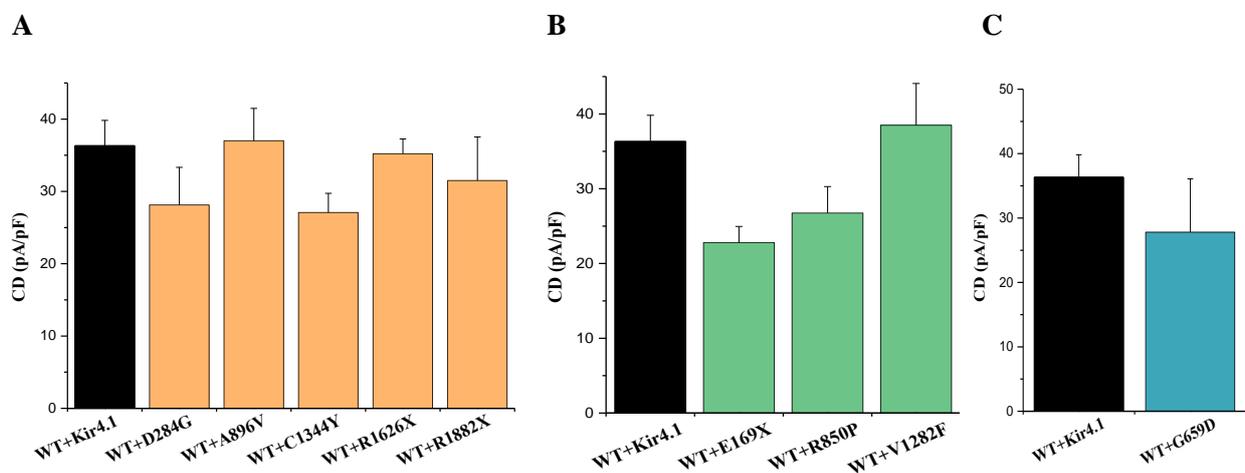


Figure 54 : Les mutations *SCN2A* responsables d'EE, de schizophrénie ou d'absences n'exercent pas de dominance négative sur les canaux WT. A/ Densités de courant des différentes co-expressions WT+Kir4.1, WT+D284G, WT+A896V, WT+C1344Y, WT+R1626X et WT+R1882X au ratio1:1 (WT+Kir4.1 : 36.3 ± 3.5 pA/pF, n=49 ; WT+D284G : 28.8±4.6 pA/pF, n=10 ; WT+A896V : 37±4 pA/pF, n=8 ; WT+C1344Y : 27.1±2.7 pA/pF, n=13 ; WT+R1626X : 35±2 pA/pF, n=5 ; WT+R1882X : 31±6 pA/pF, n=10. B/Densités de courant des neurones exprimant les canaux WT+Kir4.1, WT+E169X, WT+R850P ou WT+V1282F (WT+Kir4.1 : 36.3 ± 3.5 pA/pF, n=49 ; WT+E169X : 22.8 ± 2.2 pA/pF, n=5 ; WT+R850P : 26.7 ± 3.5 pA/pF, n=8 ; WT+V1282F : 38.5 ± 5.6 pA/pF, n=6). C/ Densités de courant des neurones exprimant les canaux WT+Kir4.1 ou WT+ G659D (WT+Kir4.1: 36.3±3.5pA/pF, n=49 ; WT+G659D: 27.8±8pA/pF, n=5).

L'ensemble de ces résultats révèle d'une part que les mutations *SCN2A* liées aux EE, à la schizophrénie et aux absences conduisent à une perte de fonction des canaux $Na_v1.2$ qui est la conséquence d'une réduction de la densité de courant dans la majorité des cas et d'autre part qu'aucune de ces mutations n'exerce un effet de dominance négative (0/9 mutations) sur les canaux WT comme cela a été montré pour les TSA (6/7 mutations).

Tableau 9 : Propriétés biophysiques des mutations *SCN2A* liées aux EE, à la schizophrénie et aux absences

	Densité de courant		Potentiel de demi-activation		Potentiel de demi-inactivation	
	WT ou MT	WT + MT	WT ou MT	WT + MT	WT ou MT	WT + MT
WT ou WT+Kir4.1	46.6 ±6.8 pA/pF (n=29)	36.3 ±3.5 pA/pF (n=49)	-15.8 ±1.3 mV (n=22)	-15 ±1 mV (n=22)	-51.8 ±1.3 mV (n=24)	-52.1 ±1.2 mV (n=16)
EE						
D284G	35.6±5.3 pA/pF (n=16)	28.8±4.6 pA/pF (n=10)	-14.5 ±1.1 mV (n=9)	-14.3 ±1.9 mV (n=8)	-56.6 ±2.4 mV (n=9)	-53 ±2 mV (n=7)
A896V	41.1±10.7 pA/pF (n=16)	37±4 pA/pF (n=8)	-22 ±2 mV (n=7) p=0.0251*	-15 ±2 mV (n=6)	-59.8 ±1.6 mV (n=8) p=0.01065*	-56.2±1.9 mV (n=5)
C1344Y	16±2 pA/pF (n=7) p=0.04509*	27.1±2.7 pA/pF (n=13)		-15.3±1.1 pA/pF (n=8)		-59.3±1.4 mV (n=6)
R1626X	Pas de courant	35±2 pA/pF (n=5)		-17.1±2.6 pA/pF (n=4)		-55.2±4.6 mV (n=4)
R1882X	17±1 pA/pF (n=5) p=0.02571*	31±6 pA/pF (n=10)		-18.5±1.1 pA/pF (n=7)		-56.6±2.8 mV (n=5)
Schizophrénie						
E169X	Pas de courant	22.8.1±2.2 pA/pF (n=5)		-14.7±3.2 mV (n=4)		-51.1 ±2.4 mV (n=4)
R850P	16.5±1.7 pA/pF (n=6) p=0.02006*	26.7±3.5 pA/pF (n=8)		-12.6 ±1.2 mV (n=6)		-50.4±1.8 mV (n=6)
V1282F	29±5 pA/pF (n=14)	38.5±5.6 pA/pF (n=6)	-12.7±1 mV (n=14)	-12.9 ±0.8 mV (n=6)	-49.2±2.5 mV (n=6)	-47.2±1.5 mV (n=6)
Absences						
G659D	17.2±2.4 pA/pF (n=6) p=0.06005	27.8±8 pA/pF (n=5)		-15.6 ±2.4 mV (n=5)		-54.6 ±3 mV (n=5)

Les valeurs de potentiel présentées dans les différents résultats ne correspondent pas aux valeurs réelles car le potentiel de jonction n'a pas été mesuré et pris en compte pour les enregistrements en voltage-clamp.

3. Les mutations *SCN2A* responsables du syndrome d'Ohtahara conduisent à un gain de fonction des canaux $Na_v1.2$

Toutes les mutations ont été identifiées par l'équipe du Dr Renzo Guerrini. Ce sont des mutations nouvellement identifiées et non publiées à ce jour.

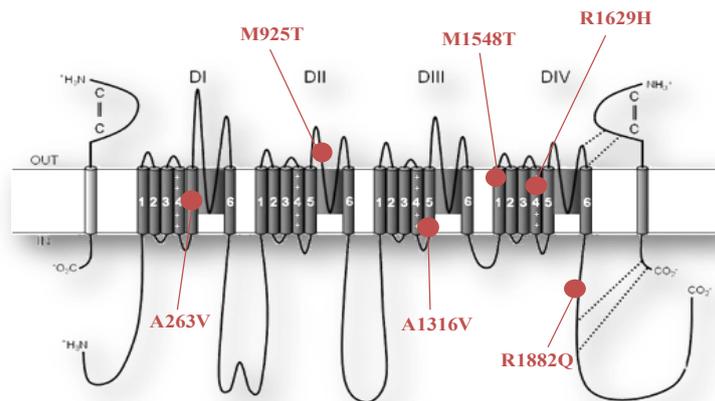


Figure 55 : Localisation de 6 mutations du gène *SCN2A* responsables du syndrome d'Ohtahara

Tableau 10: Liste des mutations *SCN2A* liées au syndrome d'Ohtahara

Mutations	Position orf	Phénotype
D284G faux-sens <i>de novo</i>	c.851 A>G	crises myocloniques dès 3 mois/résistance aux traitements/retard du développement sévère/absence du langage
A896V faux-sens <i>de novo</i>	c.2687 C>T	crises toniques dès 3 ^{ème} jour/résistance aux traitements/ retard du développement sévère/tétraplégie
C1344Y faux-sens <i>de novo</i>	c.4031 G>A	Spasmes dès 18 mois/ résistance aux traitements jusqu'à 3 ans/déficience intellectuelle sévère
R1626X non-sens <i>de novo</i>	c.4876 C>T	crises dès 2ans/résistance aux traitements/retard mental sévère/traits autistiques
R1882X non-sens, transmission autosomique dominante (transmise par le père)	c.5644 C>T	crises tonico-cloniques à partir de 3 ans et 9 mois/crises contrôlées avec l'acide valproïque/ retard du développement /EEG « slow spike and wave discharges »

Les neurones néocorticaux exprimant les mutations M925T, A1316V, M1548T, R1629H ou R1882Q ont une densité de courant similaire à celle enregistrée dans les neurones exprimant les canaux WT. En ce qui concerne la mutation A263V, elle conduit à une réduction non significative de la densité de courant (**Figure 56A**).

L'analyse des propriétés biophysiques des canaux telles que l'activation, l'inactivation et le courant persistant révèle que seule la mutation R1882Q entraîne une modification significative. En effet, les canaux porteurs de la mutation s'inactivent à des potentiels beaucoup plus dépolarisés conduisant à un gain de fonction important des canaux $\text{Na}_v1.2$ (**Figure 56D**).

Les enregistrements des courants Na^+ générés en réponse à une décharge neuronale montrent que la mutation M925T augmente la densité de courant du 1^{er} pic et que les mutations M1548T et R1629H augmentent la densité de courant du dernier pic enregistré suggérant ainsi que l'effet global de ces 3 mutations est un gain de fonction des canaux $\text{Na}_v1.2$.

Les mutations A263V et A1316V n'ont pas d'impact sur les courants Na^+ générés en réponse à une décharge neuronale (**Figure 57**).

L'ensemble de ces résultats montrent que les mutations M925T, M1548T, R1629H et R1882Q induisent à un gain de fonction des canaux $\text{Na}_v1.2$ dans les neurones néocorticaux en culture. Les canaux $\text{Na}_v1.2$ étant majoritairement exprimés au niveau du SIA des neurones excitateurs à la naissance, un gain de fonction conduit à une hyperexcitabilité de l'ensemble du réseau neuronal et à la génération de crises d'épilepsie chez le nouveau-né.

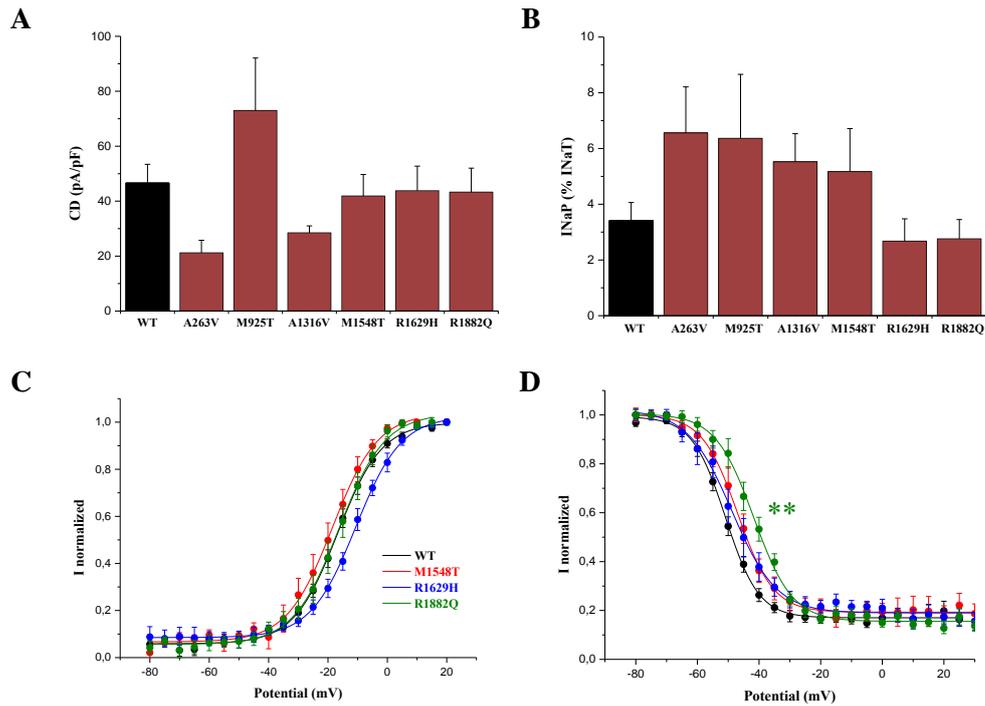


Figure 56 : Propriétés biophysiques des canaux porteurs de mutations *SCN2A* responsables du syndrome d'Ohtahara dans les neurones néocorticaux en culture. A/ Densités de courant des neurones exprimant les canaux WT ou porteurs des mutations A263V, M925T, A1316V, M1548T, R1629H ou R1882Q (WT : 46.6 ± 6.8 pA/pF, n=29 ; A263V : 16.9 ± 1.7 pA/pF, n=9, p=0.05094 ; M925T : 73 ± 19 pA/pF, n=15 ; A1316V : 28.5 ± 2.5 pA/pF, n=15 ; M1548T : 41.9 ± 7.8 pA/pF, n=15 ; R1629H : 43.8 ± 8.9 pA/pF, n=10 ; R1882Q : 43.3 ± 8.7 pA/pF, n=11). B/ Courants Na⁺ persistants des canaux WT ou porteurs des mutations A263V, M925T, A1316V, M1548T, R1629H ou R1882Q (% du courant INaT transitoire). C/ Courbes d'activation des canaux WT ou porteurs des mutations M1548T, R1629H ou R1882Q (WT : -15.8 ± 1.3 mV, n=22 ; M1548T : -18.7 ± 2.8 mV, n=8 ; R1629H : -10.2 ± 1.3 mV, n=9 ; R1882Q : -15.2 ± 1.9 mV, n=9). D/ Courbes d'inactivation des canaux WT ou porteurs des mutations M1548T, R1629H ou R1882Q (WT : -51.8 ± 1.3 mV, n=24 ; M1548T : -47.6 ± 1.8 mV, n=10 ; R1629H : -50 ± 3 mV, n=8 ; R1882Q : -42.8 ± 2 mV, n=11, p=0.0056).

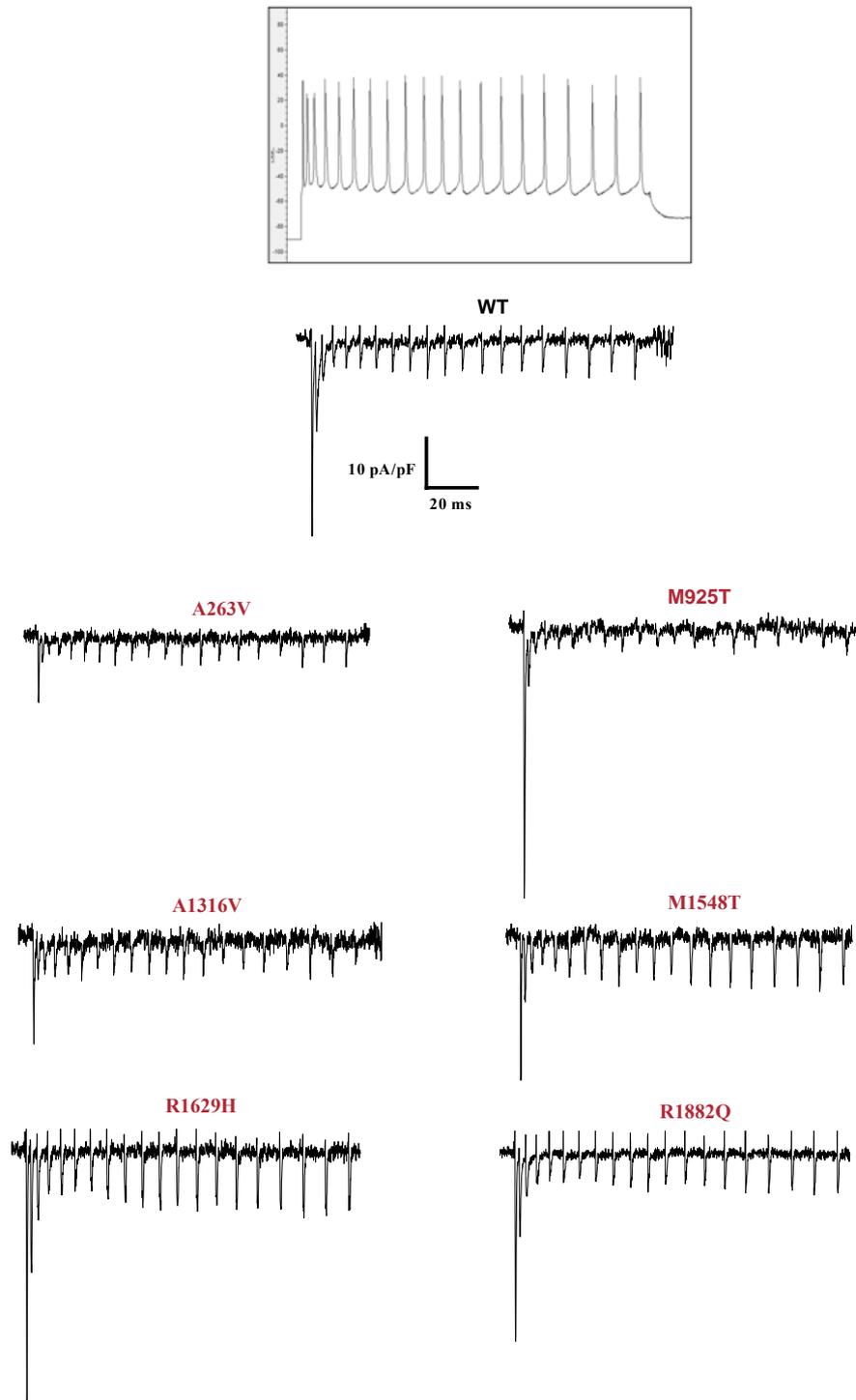


Figure 57 : Courants Na⁺ enregistrés en réponse à une décharge neuronale, dans les neurones exprimant les mutations SCN2A responsables du syndrome d'Ohtahara. Densités de courant du 1^{er} pic (WT: 34 ± 6 pA/pF, n=11 ; M925T: 93 ± 27 pA/pF, n=7, p=0.01524) et dernier pic enregistré (WT: 6.4 ± 1.4 pA/pF, n=11 ; M1548T: 14.8 ± 2.9 pA/pF, n=6, p=0.05021 ; R1629H: 17 ± 4 pA/pF, n=6, p=0.00379).

La co-expression du canal WT avec chaque canal porteur d'une des 5 mutations suivantes M925T, A1316V, M1548T, R1629H ou R1882Q n'altère pas la densité de courant des canaux WT (**Figure 58A**). Ces résultats ne sont pas surprenants car aucune de ces mutations ne conduit à une perte de fonction des canaux $Na_v1.2$ comme cela a été décrit pour toutes les autres pathologies étudiées précédemment. En ce qui concerne la mutation A263V qui conduit à une réduction partielle de la densité de courant, elle n'exerce pas de dominance négative sur les canaux WT (**Figure 58A, Tableau 11**).

L'analyse des propriétés biophysiques des différentes co-expressions montre que la mutation R1882Q modifie les propriétés biophysiques des canaux WT. En effet, les canaux WT et les canaux mutés co-exprimés dans les neurones s'inactivent à des potentiels très dépolarisés (gain de fonction) et quasi-identiques à ceux des canaux exprimant la mutation R1882Q (**Figure 58C**). La co-expression S487+ R1882Q supprime l'effet observé sur l'inactivation des canaux WT suggérant ainsi une interaction entre les canaux WT et mutés (**Figure 58E**).

L'ensemble de ces résultats montre que la mutation A263V, qui induit une réduction de la densité de courant, n'exerce pas de dominance négative sur les canaux WT et que la mutation R1882Q conduit à un gain de fonction des canaux WT dû à l'interaction entre les canaux à la membrane. Cet effet est l'inverse de la dominance négative observé dans l'autisme.

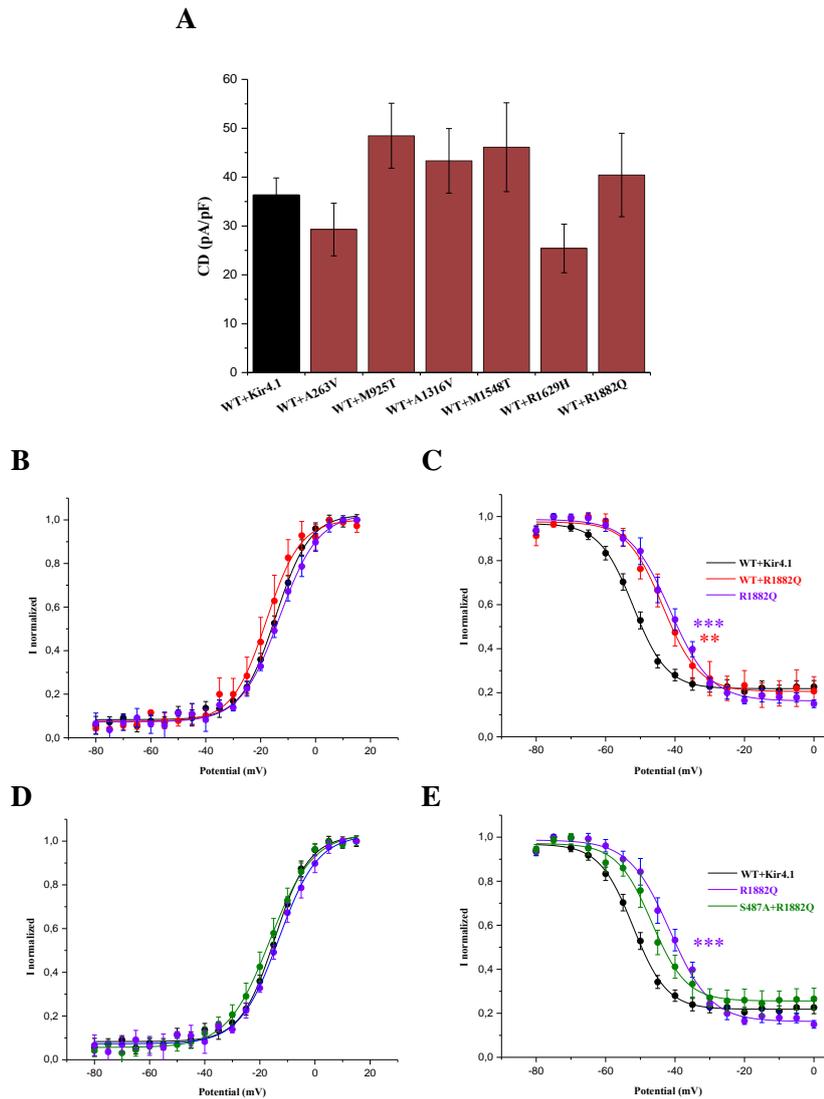


Figure 58: Effets des mutations *SCN2A* responsables du syndrome d'Ohtahara sur les canaux WT. A/ Densités de courant des différentes co-expressions WT+Kir4.1, WT+A263V, WT+M925T, WT+A1316V, WT+M1548T, WT+R1629H et WT+R1882Q (ratio1:1). B/ Courbes d'activation des différentes conditions WT+Kir4.1, WT+R1882Q et R1882Q (WT+Kir4.1: -15.2 ± 1.9 mV, $n=22$; WT+R1882Q: -16.6 ± 2.7 , $n=5$; R1882Q: -15.2 ± 1.9 mV, $n=9$, $p=3.71$). C/ Courbes d'inactivation des différentes conditions WT+Kir4.1, WT+R1882Q et R1882Q (WT+Kir4.1: -52.1 ± 1.2 mV, $n=16$; WT+R1882Q: -43.7 ± 1.7 , $n=7$, $p=0.00528$; R1882Q: -42.8 ± 2 mV, $n=11$, $p=3.71 \cdot 10^{-4}$). D/ Courbes d'activation des différentes conditions WT+Kir4.1, S487A+R1882Q et R1882Q (S487A+R1882Q: -12.9 ± 1.1 , $n=5$). E/ Courbes d'inactivation des différentes conditions WT+Kir4.1, S487A+R1882Q et R1882Q (S487A+R1882Q: -46.5 ± 1.5 mV, $n=5$).

Tableau 11 : Propriétés biophysiques des mutations SCN2A responsables du syndrome d'Ohtahara

	Densité de courant		Potentiel de demi-activation		Potentiel de demi-inactivation	
	WT ou MT	WT + MT	WT ou MT	WT + MT	WT ou MT	WT + MT
WT ou WT+Kir4.1	46.6 ±6.8 pA/pF (n=29)	36.3 ±3.5 pA/pF (n=49)	-15.8 ±1.3 mV (n=22)	-15 ±1 mV (n=22)	-51.8 ±1.3 mV (n=24)	-52.1 ±1.2 mV (n=16)
OS						
A263V	16.9±1.7 pA/pF (n=9) p=0.05094	30±4 pA/pF (n=17)	-18 ±2 mV (n=8)	-16.3±1.7 pA/pF (n=10)	-48 ±4 mV (n=6)	-50.5±2.5 pA/pF (n=10)
M925T	73±19 pA/pF (n=15)	48.5±6.6 pA/pF * (n=15) p=0.03297	-19.2 ±1.6 mV (n=9)	-18.5 ±1.1 mV (n=12)	-53 ±2 mV (n=7)	-56.6 ±2.8 mV (n=8)
A1316V	28.5±2.5 pA/pF (n=15)	43.3±6.6 pA/pF (n=9)	-15.9 ±0.9 mV (n=12)	-13.7 ±1.3 mV (n=7)	-53.4 ±1.1 mV (n=11)	-49.6 ±1.6 mV (n=7)
M1548T	41.9±7.8 pA/pF (n=15)	46.1±9.1 pA/pF (n=9)	-18.7 ±2.8 mV (n=8)	-11.4 ±0.7 mV (n=6)	-47.6 ±1.8 mV (n=10)	-51 ±2 mV (n=5)
R1629H	43.8±8.9 pA/pF (n=10)	25±5 pA/pF (n=5)	-10.2 ±1.3 mV (n=9)	-10.6 ±1.4 mV (n=5)	-50 ±3 mV (n=8)	-46.2 ±1.4 mV (n=5)
R1882Q	43.3±8.7 pA/pF (n=11)	40.4±8.5 pA/pF (n=7)	-15.2 ±1.9 mV (n=9)	-16.6 ±2.7 mV (n=5)	-42.8 ±2 mV (n=11) p=0.0056**	-43.7 ±1.7 mV (n=11)

4. La récupération de la densité de courant des canaux $\text{Na}_v1.1$ présentant des défauts d'adressage à la surface cellulaire n'est pas la conséquence d'une interaction α - α

Comme nous avons pu le voir précédemment, les mutations *SCN2A* dans l'autisme ont pour conséquence une réduction importante de la densité de courant des canaux $\text{Na}_v1.2$ dans les neurones néocorticaux en culture. Ce que nous observons pour les mutations *SCN1A* dans la migraine est différent. En effet, la densité de courant des canaux mutés présentant des défauts de repliement et/ou trafic cellulaire est partiellement ou totalement récupérée dans les neurones néocorticaux, suggérant ainsi une augmentation du nombre de canaux à la surface cellulaire.

De plus les mutations *SCN2A* exercent un effet de dominance négative sur les canaux WT. Notre hypothèse, sur laquelle nous travaillons actuellement à partir de marquages immunocytochimiques, repose sur le fait que les canaux mutés interagissent avec les canaux WT dans le RE avant d'être dégradés. Une partie des canaux WT est alors dégradée d'où la réduction de la densité de courant de ces canaux en présence des canaux mutés.

Par conséquent, le mécanisme identifié dans la MHF-3 pourrait être opposé à celui que nous proposons dans l'autisme. En effet, la récupération de la densité de courant dans les neurones des canaux porteurs de mutations *SCN1A* pourrait être aussi la conséquence d'une interaction entre les canaux mutés et les canaux $\text{Na}_v1.1$ endogènes. Cette interaction pourrait faciliter l'adressage des canaux mutés à la surface cellulaire.

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons co-transfecté les canaux porteurs de la mutation L1649Q ou L1670W et les canaux WT dans des cellules tsA-201 incubées à 37°C au ratio 1:1. Les canaux mutés sont résistants à la TTX (mutation F383S) contrairement aux canaux WT. Ainsi, en ajoutant 1 μ M de TTX dans notre solution extracellulaire d'enregistrement, nous pouvons bloquer les canaux WT et enregistrer seulement les canaux mutés. Comme condition contrôle, nous avons co-transfectés les canaux mutés avec un plasmide vide au ratio 1:1. Nos données révèlent que la densité de courant des canaux porteurs des mutations L1649Q ou L1670W n'est pas restaurée par la présence des canaux WT dans les cellules tsA-201 (**Figure 59**).

L'ensemble de ces résultats montre que la récupération de la densité de courant de ces 2 mutations dans les neurones néocorticaux en culture n'est pas la conséquence d'une interaction α - α .

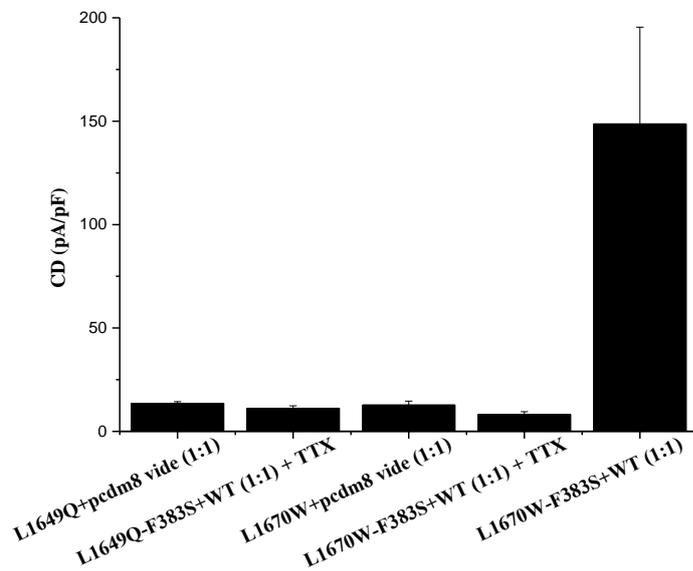


Figure 59: Densités de courant des co-expressions $\text{Na}_v1.1$ dans des cellules tsA-201 incubées à 37°C (L1649Q-F383S+pcdm8 vide: 13.6 ± 0.7 pA/pF, n=8 ; L1649Q-F383S+WT+TTX: 11.2 ± 1.1 pA/pF, n=9 ; L1670W-F383S+pcdm8 vide: 12.7 ± 1.9 pA/pF, n=4 ; L1670W-F383S+WT+TTX: 8.2 ± 1.3 pA/pF, n=5 ; L1670W-F383S+WT: 149 ± 47 pA/pF, n=3).

V. CONCLUSION GENERALE

La première partie de ma thèse a permis d'identifier la 2^{ème} mutation MHF-3 (L1670W) qui conduit à un gain de fonction après « correction » des défauts d'adressage à la surface cellulaire. Notre équipe a ainsi décrit deux mécanismes différents en ce qui concerne les mutations *SCN1A* qui présentent des défauts de repliement et/ou de trafic cellulaire et qui ne peuvent pas rejoindre la surface de la cellule. D'une part il y a les mutations *SCN1A* liées à l'épilepsie et qui conduisent à une perte de fonction des canaux Na_v1.1 même après « correction » des défauts et d'une autre part, les mutations *SCN1A* liées à la MHF-3 qui conduisent à un gain de fonction des canaux Na_v1.1 après « correction » des défauts d'adressage à la surface. Nous avons aussi montré que la récupération de la densité de courant de ces mutations dans les neurones néocorticaux en culture n'est pas due à une interaction entre les canaux mutés et les canaux Na_v1.1 endogènes.

La seconde partie de ma thèse a permis l'identification d'un nouveau mécanisme des mutations *SCN2A* liées aux TSA et appelé la dominance négative. Tout d'abord, nous avons montré que la majorité (6/7) des mutations *SCN2A* liées aux TSA conduit à une perte de fonction totale ou quasi-totale des canaux Na_v1.2. De plus, la co-expression des canaux mutés avec les canaux WT conduit à une réduction de la densité de courant des canaux WT, ce qui signifie qu'en plus de conduire à une perte de fonction importante, les mutations *SCN2A* exercent un effet de dominance négative sur les canaux WT.

De plus, nous avons montré que les mutations *SCN2A* responsables d'EE infantiles, de schizophrénie et d'absences conduisent dans la majorité des cas à une perte de fonction des canaux Na_v1.2 et qu'aucune de ces mutations n'exerce de dominance négative sur les canaux WT. Par conséquent, l'ensemble des résultats obtenus avec les mutations *SCN2A* permettent de définir la dominance négative comme étant un mécanisme spécifique des TSA. La perte de fonction dans les TSA est donc plus importante que celle observée dans les autres pathologies. Enfin, la majorité (4/6) des mutations *SCN2A* responsables du syndrome d'Ohtahara conduisent à un gain de fonction des canaux Na_v1.2.

Ainsi, nos résultats ont permis d'identifier un nouveau mécanisme pathologique des mutations *SCN2A* responsables de troubles du spectre de l'autisme et de mieux comprendre les mécanismes pathologiques des encéphalopathies épileptiques néonatales et infantiles.

VI. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Le gain de fonction des canaux $\text{Na}_v1.1$ présentant des défauts d'adressage à la surface cellulaire n'est pas la conséquence d'une interaction α - α

Nous avons identifié 2 mutations *SCN1A* à l'origine de la MHF-3 conduisant à la formation de canaux présentant des défauts d'adressage à la surface cellulaire. En transfectant les canaux mutés dans les neurones en culture, ces défauts sont en partie « corrigés » puisque nous récupérons partiellement la densité de courant. Alors que nous pensions que cette récupération pouvait être la conséquence d'une interaction entre les canaux mutés et les canaux WT endogènes, nos données montrent que ce n'est pas le cas. Par conséquent, d'autres protéines endogènes exprimées dans les neurones néocorticaux doivent interagir avec les canaux et leur permettre de rejoindre la surface de la cellule. En effet, la co-expression des protéines telles que les sous-unités β , l'ankyrine G et la calmoduline dans les cellules tsA-201 permet une récupération de la densité (Cestele et coll., 2013b).

En 2012, notre équipe a montré que des canaux $\text{Na}_v1.1$ porteurs de mutations responsables du syndrome de Dravet entraînent une réduction de la densité de courant des canaux $\text{Na}_v1.6$ (Bechi et coll., 2012). En effet, les séquences des sous-unités α sont homologues, ce qui suggère que les canaux $\text{Na}_v1.1$ mutés peuvent interagir avec les canaux $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ ou $\text{Na}_v1.6$ et impacter leur adressage à la surface cellulaire. Il serait intéressant d'étudier l'impact des mutations *SCN1A* responsables de l'épilepsie et de la MHF-3 conduisant à la formation de canaux avec des défauts de repliement et/ou trafic cellulaire sur les canaux sodiques potentiel-dépendants exprimés dans le cerveau.

2. La dominance négative : un mécanisme spécifique des troubles du spectre de l'autisme (TSA) sans épilepsie

Nous avons montré que les mutations *SCN2A* responsables de TSA entraînent une réduction importante de la densité de courant conduisant à une perte de fonction des canaux sodiques potentiel-dépendants $\text{hNa}_v1.2$. Ces canaux sont majoritairement exprimés dans les neurones excitateurs, ce qui signifie qu'une perte totale de leur fonction va entraîner une diminution de l'excitabilité neuronale.

La réduction de la densité de courant peut être la conséquence : 1/ de défauts de repliement du canal détectés par le contrôle qualité du réticulum endoplasmique (RE) entraînant les canaux à

la dégradation par le protéasome 2/ d'une modification de la conformation masquant un motif indispensable à l'adressage des canaux à la surface cellulaire ainsi ils s'accumulent dans le RE avant d'être dégradés 3/ de canaux pas conductibles mais exprimés à la membrane plasmique contrairement aux hypothèses 1 et 2 où les canaux ne rejoignent pas la surface de la cellule.

Nous proposons que les mutations *SCN2A* dans les TSA conduisent soit à des défauts de repliement soit à des défauts de trafic cellulaire ayant pour conséquence un défaut d'expression des canaux $Na_v1.2$.

Pour vérifier notre hypothèse, nous réalisons actuellement des marquages immunocytochimiques sur des cellules HEK transfectées avec les canaux WT ou mutés. Grâce à un marqueur membranaire spécifiques des lignées cellulaires, nous pouvons savoir si les canaux porteurs des mutations sont localisés à la membrane ou non. Un autre objectif est de marquer le RE avec un anticorps dirigé contre la calnexine et d'observer s'il y a ou non co-localisation des canaux mutés avec le RE.

De plus et pour la première fois, nous avons montré que les mutations *SCN2A* liées à l'autisme exercent une dominance négative sur les canaux WT. La co-expression des canaux WT avec chaque canal porteur d'une des 6 mutations, entraînant une perte de fonction, conduit à la réduction de la densité de courant des canaux WT. Cet effet peut être empêché par l'inhibition de l'interaction entre deux sous-unités α suggérant ainsi que la dominance négative observée dans l'autisme est la conséquence d'une interaction entre les canaux WT et les canaux mutés. Notre hypothèse est que cette interaction se déroule au niveau du RE avant que les canaux mutés ne soient dégradés par le protéasome, ce qui a pour conséquence d'entraîner certains canaux WT à la dégradation et donc d'en avoir moins à la membrane plasmique.

Des études récentes sur les mutations du gène *SCN5A* identifiées chez des patients atteints du syndrome de Brugada viennent renforcer nos résultats sur la dominance négative des mutations *SCN2A* dans l'autisme.

Le syndrome de Brugada fait partie des syndromes responsables de troubles du rythme cardiaque. Il se caractérise par un aspect anormal de l'électrocardiogramme et un risque de mort subite par trouble du rythme cardiaque gravissime (fibrillation ventriculaire).

En 2012, Clatot et coll ont étudié l'effet fonctionnel des mutations R104W et R121W situées sur le gène *SCN5A* de patients souffrant du syndrome de Brugada. A partir d'enregistrements électrophysiologiques sur des cellules HEK et de marquages immunocytochimiques sur des cardiomyocytes de rat transfectés, le groupe a montré d'une part que les mutations entraînent une réduction totale de la densité de courant des canaux $\text{Na}_v1.5$ et d'autre part que cette réduction est due à la rétention des canaux mutés dans le RE (Clatot et coll., 2012).

De plus, la co-expression des canaux WT et des canaux mutés (ratio 1:1) montre que les mutations R104W et R121W conduisent à une réduction de la densité de courant des canaux WT d'environ 80% suggérant ainsi un effet de dominance négative. Les auteurs montrent que la dominance négative exercée par ces mutations est la conséquence d'une altération du trafic cellulaire des canaux WT due à leur rétention dans le RE en présence des canaux mutés. Ces résultats sont cohérents avec notre hypothèse selon laquelle la dominance négative observée dans l'autisme est due à un défaut d'expression des canaux WT causé par leur rétention dans le RE en présence des canaux mutés.

En 2011, le groupe de Watanabe étudie l'effet fonctionnel de 3 mutations dont la mutation faux-sens hétérozygote R367H identifiée chez un patient atteint du syndrome de Brugada (Hong et coll, J Cardiovasc Electrophysiol 2004). Cette mutation est très intéressante pour notre étude car elle est homologue à la mutation R379H que nous avons étudié et qui, en plus de conduire à une perte de fonction quasi-totale, exerce un effet de dominance négative sur les canaux WT $\text{Na}_v1.2$. En effet, la boucle extracellulaire reliant les segments S5 et S6 de DI contient une partie réentrante formant le pore et qui se situe entre les résidus 358-382 et 370-394 pour les canaux $\text{Na}_v1.5$ et $\text{Na}_v1.2$ respectivement. La comparaison des séquences primaires indique que les résidus sont homologues.

Les enregistrements électrophysiologiques des cellules tsA-201 révèlent que la mutation R367H conduit à une réduction totale de la densité de courant des canaux $\text{Na}_v1.5$. (**Figure 60A**) (Selga et coll., 2018). Ces résultats sont similaires à ceux que nous avons obtenus pour la mutation R379H suggérant ainsi que les mutations situées sur des résidus hautement conservés peuvent avoir un mécanisme commun entre les différentes sous-unités α . En revanche, la biotinylation de la surface des cellules tsA-201 transfectées révèle que l'expression des canaux à la membrane n'est pas impactée par la mutation, suggérant ainsi que l'effet de dominance négative des canaux R367H sur les canaux WT a lieu au niveau de la surface cellulaire (**Figure 60B**).

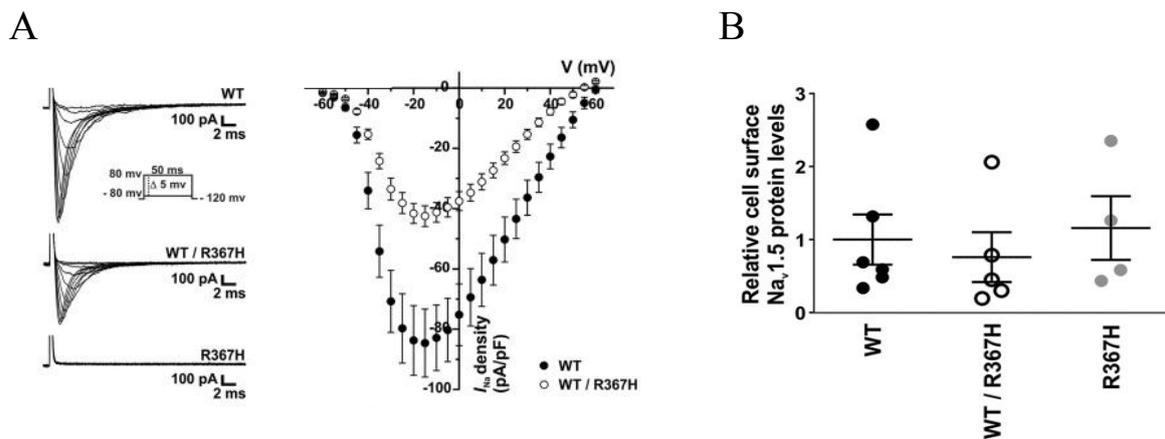


Figure 60: La mutation R367H située sur le gène *SCN5A* conduit à une réduction totale du courant Na⁺ et exerce une dominance négative sur les canaux WT. A/ gauche, traces représentatives des courants Na⁺ enregistrés en réponse à des potentiels dépolarisants dans des cellules tsA-201 transfectées avec le canal Nav1.5 WT soit avec le canal porteur de la mutation R367H soit avec les canaux WT+Mutants (ratio 1:1). A droite, courbes courant/voltage des canaux WT ou WT+Mutants. B/ Diagramme montrant l'expression relative des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire obtenue par détection Western Blot après biotinylation de la surface des cellules transfectées (Selga et coll., 2018).

L'ensemble des études suggèrent que la dominance négative peut être la conséquence d'une interaction entre les sous-unités α dans le RE ou à la surface cellulaire.

A ce jour, notre objectif principal est de quantifier le nombre de canaux WT présents à la membrane plasmique en présence des canaux mutés afin d'identifier le ou les mécanismes qui conduisent à la négative dominance des mutations *SCN2A*. Nous réalisons actuellement des marquages immunocytochimiques sur des cellules tsA-201 co-transfectées avec les canaux WT et mutés.

Les mutations T1420M et R1635Q conduisent à une perte de fonction des canaux Na_v1.2 mais n'exercent pas de dominance négative

La mutation T1420M identifiée chez un patient autiste conduit à une perte de fonction des canaux moins importante que pour les autres mutations *SCN2A* liées aux TSA car elle modifie les propriétés biophysiques du canal sans affecter son expression à la surface cellulaire. En revanche, la mutation n'exerce aucune dominance négative sur les canaux WT, que ce soit sur la densité de courant ou sur les propriétés biophysiques. Cela peut s'expliquer par le fait que les informations sur le phénotype du patient porteur de la mutation T1420M ne sont pas

détaillées : il s'agit d'un garçon de 9 ans autiste sans retard du développement (Iossifov et coll., 2014). Il n'est pas impossible qu'un phénotype épileptique soit passé inaperçu chez ce patient autiste. Ce détail est un élément clé car nous proposons la dominance négative comme mécanisme des TSA sans épilepsie.

En effet, dans notre étude, nous avons analysé l'effet fonctionnel de la mutation R1635Q. Cette mutation conduit à une perte de fonction importante des canaux $Na_v1.2$ (l'inactivation se met en place à des potentiels plus hyperpolarisés) mais n'exerce aucune dominance négative sur les canaux WT. Il est important de noter que cette mutation a été décrite dans un premier temps comme étant responsable de TSA « purs » mais une analyse approfondie du spectre phénotypique du patient a révélé des décharges épileptiques durant le sommeil suggérant ainsi que la mutation R1635Q est responsable de TSA associés à l'épilepsie. Nous avons obtenu ces données car cette mutation a été identifiée par l'équipe du Dr Renzo Guerrini avec qui nous collaborons. Il se peut donc que le patient porteur de la mutation T1420M décrite dans la littérature ait un phénotype similaire ce qui expliquerait l'absence de dominance négative.

La dominance négative : un mécanisme spécifique des TSA sans épilepsie

Les mutations *SCN2A* responsables de TSA sans épilepsie conduisent à la fois à une perte de fonction totale des canaux $Na_v1.2$ et à une dominance négative des canaux WT. Il en résulte une perte de fonction de plus de 50% des canaux $Na_v1.2$ dans les neurones excitateurs et une hypoexcitabilité plus importante du réseau neuronal.

De plus, nos données sont cohérentes avec celles obtenues sur le phénotype des souris hétérozygotes pour le gène *SCN2A*, proposées comme modèle de l'autisme. Les différentes études sur le comportement de ces souris révèlent des déficits mineurs au niveau de l'apprentissage chez les mâles, des déficits au niveau des préférences sociales chez les femelles seulement (Spratt et coll., 2019) ainsi que des déficits de la communication et de la mémoire mais qui s'atténuent à l'âge adulte (Lena and Mantegazza, 2019).

Par conséquent, les souris *SCN2A*^{+/-} ne reproduisent que partiellement le phénotype autistique. Ces résultats semblent cohérents à partir du moment où nous proposons une perte de fonction supérieure à 50% comme mécanisme pathologique des TSA.

Enfin, Spratt et coll ont montré que dans les neurones matures des souris hétérozygotes *SCN2A*^{+/-}, la rétropropagation des PA vers les dendrites et la fonction des synapses excitatrices sont altérées. Les neurones de ces souris *SCN2A*^{+/-} ont des épines dendritiques

morphologiquement immatures. Ce déficit observé au niveau des dendrites est souvent associé aux TSA. En effet, les données obtenues à partir de modèles animaux mais aussi à partir de cerveau humain post-mortem de patients autistes indiquent une réduction de la taille et du nombre des dendrites accompagnée d'une altération de leur morphologie (Martinez-Cerdeno, 2017).

L'étape suivante dans ce projet est donc la génération d'un modèle de souris transgénique exprimant sur un allèle une des 6 mutations *SCN2A* responsable d'une dominance négative sur les canaux WT. Il faudra étudier le comportement de ces souris afin de valider ou non le phénotype autistique sans épilepsie. Ensuite, il faudra comparer les propriétés électrophysiologiques des neurones corticaux excitateurs et inhibiteurs de ces souris avec celles des souris hétérozygotes *SCN2A*^{+/-} (Spratt et coll., 2019). Si la dominance négative se retrouve chez la souris, l'hypoexcitabilité des neurones excitateurs devrait être plus importante que celle observée chez les souris *SCN2A*^{+/-}, la transmission synaptique excitatrice encore plus impactée et le nombre de dendrites immatures pourrait être augmenté. L'aggravation de ces déficits pourrait conduire à un phénotype autistique plus prononcé que celui observé chez les souris haploinsuffisantes pour le gène *SCN2A*.

Nous avons utilisé deux stratégies différentes pour inhiber l'interaction entre les canaux via la protéine 14.3.3 : la difopéine pour bloquer la protéine ou l'insertion de la mutation S487A sur le canal WT pour empêcher sa fixation (Clatot et coll., 2017). Cela nous a permis de montrer que la dominance négative observée dans l'autisme était la conséquence d'une interaction α - α .

Mais la protéine 14.3.3 est une protéine ubiquitaire interagissant avec de nombreuses autres protéines et la bloquer *in vivo* entraînerait des effets délétères. C'est pour cela que nous avons élaboré une troisième stratégie pour inhiber l'interaction α - α *in vivo*.

Nous avons validé cette stratégie par des tests *in vitro* et nous pensons pouvoir l'appliquer *in vivo* afin de connaître l'effet de l'inhibition de l'interaction des canaux WT avec les canaux mutés sur le modèle animal. Pour des raisons de confidentialité, cette stratégie qui pourrait aboutir à une voie thérapeutique, n'est pas présentée dans le manuscrit.

Un autre point à souligner dans ces résultats est l'absence d'effet de la difopéine et de la mutation S487A sur les canaux WT suggérant ainsi que la dimérisation de ces canaux n'a aucun rôle physiologique, du moins à l'échelle cellulaire dans notre modèle d'étude.

Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la séparation des dimères formés par les canaux Na_v à partir d'enregistrements électrophysiologiques sur tranches et de marquages d'immunohistochimie. La dimérisation pourrait être importante pour la formation de clusters des canaux Na_v au SIA et aux nœuds de Ranvier, facilitant ainsi la génération et la propagation des PA le long de l'axone.

3. La majorité des mutations *SCN2A* responsables d'EE infantiles conduisent à une perte de fonction des canaux $Nav1.2$, sans dominance négative

Les mutations *SCN2A* responsables d'EE infantiles conduisent à une perte de fonction partielle (A896V, C1344Y et R1882X) ou totale (R1626X) des canaux $Na_v1.2$ dans les neurones néocorticaux en culture. Toutefois, il semble que les mutations C1344Y et R1882X aient une capacité à soutenir les décharges, cet effet pouvant être la conséquence d'une augmentation du courant sodium persistant. Les résultats obtenus ne sont cependant pas significatifs. De manière générale, nos résultats sont en accord avec ceux décrits récemment dans la littérature. En effet, en 2018, Berecki et coll étudiaient l'effet de la mutation récurrente de novo R853Q, retrouvée chez 12 patients atteints de spasmes infantiles associés à un retard développemental (Berecki et coll., 2018). Des expériences de patch-clamp sur lignées cellulaires et de dynamic-clamp ont permis de mettre en évidence que cette mutation induit une diminution de la densité de courant, un déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés et une diminution de la fréquence de décharge, le tout conduisant à une perte de fonction des canaux $Na_v1.2$.

De plus, les mutations C1344Y, R1626X et R1882X conduisant à une réduction de la densité de courant des canaux, comme la majorité des mutations *SCN2A* liées à l'autisme, n'exercent aucun effet de dominance négative sur les canaux WT. Il est possible que les canaux porteurs de ces mutations soient présents à la membrane. Nous travaillons actuellement sur cette hypothèse à partir de marquages immunocytochimiques.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les mutations responsables d'EE infantiles conduisent à une perte de fonction, inférieure ou égale à 50%, des canaux $Na_v1.2$.

La perte de fonction des canaux $Na_v1.2$, exprimés principalement dans les neurones excitateurs, entraîne une diminution de la composante excitatrice de l'ensemble du réseau neuronale.

Mais comment expliquer la génération des crises d'épilepsie chez ces patients si le réseau est hypoexcité ?

Les crises d'épilepsie chez les patients porteurs des mutations C1344Y, R1626X et R1882X apparaissent respectivement à l'âge de 18mois, 2ans et un peu moins de 4ans.

Or, entre la 2^{ème} et la 3^{ème} semaine post-natale chez la souris, les canaux Na_v1.2 au SIA distal sont remplacés par les canaux Na_v1.6 (Boiko et coll., 2003). Chez l'homme, cette période correspond à 1-2ans d'âge, ce qui signifie que lorsque les crises des patients apparaissent, les canaux Na_v1.2 ne sont plus les seuls responsables de l'initiation et de la propagation des PA dans les neurones. Par conséquent, la perte de fonction des canaux Na_v1.2 conduisant à une hypoexcitabilité des neurones excitateurs, allant à l'encontre de l'hyperexcitabilité corticale et du mécanisme pathologique de l'épilepsie, ne peut pas être directement responsable des crises chez les patients *SCN2A* atteints d'EE infantiles. La perte de fonction des canaux Na_v1.2 pourrait induire un mécanisme de compensation très tôt au cours du développement tel qu'une augmentation de l'expression des canaux sodiques potentiel-dépendants Na_v1.6 ou une réduction de l'expression des canaux potassiques potentiel-dépendants K_v7.2/K_v7.3 au SIA.

L'étude d'un modèle de souris transgénique exprimant une de ces mutations permettrait de quantifier l'expression des différents canaux et de confirmer ou non l'existence d'un mécanisme de compensation.

4. Les mutations *SCN2A* responsables du syndrome d'Ohtahara

Les mutations M925T, M1548T, R1629H et R1882Q conduisent à gain de fonction clair des canaux Na_v1.2. Il en résulte une hyperexcitabilité des neurones excitateurs pouvant être à l'origine des crises d'épilepsie chez les patients.

En effet, chez les patients atteints d'EE néonatales, les crises apparaissent dès le 1^{er} jour de vie et au plus tard une semaine après la naissance. A ce stade du développement, les canaux Na_v1.2 sont les seuls canaux sodiques potentiel-dépendants présents au SIA des neurones excitateurs. Cela signifie qu'un gain de fonction des canaux Na_v1.2 va entraîner une augmentation de l'excitabilité neuronale et la génération de crises d'épilepsie à un stade précoce du développement.

Ces résultats sont cohérents avec l'étude cliniques menée par Wolff et coll visant à comparer les effets des traitements anti-épileptiques sur des patients porteurs de mutations *SCN2A* et

atteints d'EE précoce ou tardive. L'étude fonctionnelle de 4 mutations leur permet de corréler le gain de fonction aux EE précoces et la perte de fonction aux EE tardives.

Les patients atteints d'EE précoces, avec des crises apparaissant avant l'âge de trois mois répondent bien aux bloqueurs des canaux sodium tandis que les patients présentant des formes d'apparition tardive (crises après 3mois) ne répondent pas bien aux bloqueurs des canaux sodiques suggérant ainsi une corrélation entre l'effet fonctionnel de la mutation, le début des crises et la réponse aux traitements (Wolff et coll., 2017).

Les mutations A263V et A1316V responsables du syndrome d'Ohtahara n'ont pas d'impact sur la fonction des canaux $Na_v1.2$

Les mutations A263V et A1316V ne conduisent pas à un gain de fonction des canaux $Na_v1.2$. Cela pourrait s'expliquer par le fait que certaines mutations des gènes codant pour les sous-unités α peuvent avoir un effet plus important lorsqu'elles sont exprimées dans l'isoforme néonatal. Récemment, Thompson et coll ont montré que les mutations T236S, E999K et S1336Y situées sur le gène *SCN2A* et identifiées chez des patients atteints d'EE précoces incluant le syndrome d'Ohtahara ont un effet plus prononcé dans l'isoforme néonatal (Thompson et coll., 2020). Les enregistrements électrophysiologiques de lignées cellulaires transfectées révèlent des dysfonctionnements plus importants dans l'isoforme néonatal par rapport à ceux observés dans l'isoforme adulte.

Ainsi, il n'est pas impossible que les mutations A263V et A1316V conduisent à un gain de fonction dans l'isoforme néonatal.

Dans notre étude, la mutation D284G a été regroupée dans les EE infantiles. Nos résultats indiquent que la mutation n'a aucun effet sur les canaux $Na_v1.2$ contrairement aux autres EE infantiles qui conduisent à une perte de fonction. Or, le patient présente des crises d'épilepsie dès l'âge de trois mois, ce qui correspond à la limite entre EE précoce et EE tardive proposée par Wolff et coll (Wolff et coll., 2017). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la mutation sur l'isoforme néonatal.

Il est important de noter que la mutation A263V, située sur le gène *SCN2A* et responsable du syndrome d'Ohtahara, a déjà été insérée dans un modèle de souris reproduisant le phénotype de la sclérose en plaque dans le but d'étudier le rôle des canaux sodiques Na_v dans la neuroinflammation. L'enregistrement des neurones pyramidaux de la région CA1 de

l'hippocampe entre P10-P12 montre que la mutation A263V augmente le nombre de PA générés en réponse une injection de courant suggérant ainsi que la mutation conduit à une hyperexcitabilité neuronale (Schattling et coll., 2016).

La mutation R1882Q responsables du syndrome d'Ohtahara induit un gain de fonction des canaux WT

La co-expression des canaux porteurs de la mutation R1882Q avec les canaux WT induit un déplacement de la courbe d'inactivation des canaux WT vers des potentiels dépolarisés pouvant être supprimé par l'inhibition de l'interaction entre les sous-unités α . Cela signifie que les canaux mutés conduisant à un gain de fonction, induisent aussi un gain de fonction des canaux WT. Ce « double » gain de fonction pourrait conduire à une hyperexcitabilité encore plus importante des neurones excitateurs à la naissance et donc à un phénotype encore plus grave. Dans notre étude, la mutation R1882Q est celle qui a l'effet le plus important sur les propriétés biophysiques des canaux $\text{Na}_v1.2$. Il n'est donc pas impossible que ce mécanisme se retrouve pour d'autres mutations Ohtahara dans l'isoforme néonatal dans lequel il a été montré que l'effet des mutations liées aux EE néonatales est plus prononcé (Thompson et coll., 2020).

5. Les mutations *SCN2A* liées aux autres pathologies

Les mutations *SCN2A* liées à la schizophrénie, E169X et R850P, conduisent à une perte de fonction des canaux $\text{Na}_v1.2$ tandis que la mutation V1282F ne semble pas avoir d'effet.

En revanche, elles n'induisent pas un effet de dominance négative des canaux WT. Cela signifie que les mécanismes sont à l'origine de la schizophrénie sont différents de ceux de l'autisme même si les patients partagent des symptômes communs tels que le retrait social et les problèmes de langage. De plus, il faudrait plus de mutations *SCN2A* liées à la schizophrénie pour définir un mécanisme pathologique mais aussi avoir plus de renseignements sur le phénotype des patients.

A ce jour, la mutation G659D responsable d'absences et identifiée par le Pr Renzo Guerrini est la seule mutation associée à ce phénotype. Tout comme les mutations *SCN2A* associées à la schizophrénie, il faudrait plus de mutations pour définir un mécanisme pathologique.

Pour conclure, nos résultats ouvrent la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les mutations du gène *SCN2A* responsables de l'autisme et à de nouvelles perspectives de

recherche pour les mutations *SCN2A* liées aux encéphalopathies épileptiques néonatales et infantiles.

Références

- (1989). Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 30, 389-399.
- Abidi, A., Devaux, J.J., Molinari, F., Alcaraz, G., Michon, F.X., Sutera-Sardo, J., Becq, H., Lacoste, C., Altuzarra, C., Afenjar, A., Mignot, C., Doummar, D., Isidor, B., Guyen, S.N., Colin, E., De La Vaissiere, S., Haye, D., Trauffer, A., Badens, C., Prieur, F., Lesca, G., Villard, L., Milh, M., and Aniksztejn, L. (2015). A recurrent KCNQ2 pore mutation causing early onset epileptic encephalopathy has a moderate effect on M current but alters subcellular localization of Kv7 channels. *Neurobiol Dis* 80, 80-92.
- Arzimanoglou, A., French, J., Blume, W.T., Cross, J.H., Ernst, J.P., Feucht, M., Genton, P., Guerrini, R., Kluger, G., Pellock, J.M., Perucca, E., and Wheless, J.W. (2009). Lennox-Gastaut syndrome: a consensus approach on diagnosis, assessment, management, and trial methodology. *Lancet Neurol* 8, 82-93.
- Baulac, S., Huberfeld, G., Gourfinkel-An, I., Mitropoulou, G., Beranger, A., Prud'homme, J.F., Baulac, M., Brice, A., Bruzzone, R., and Leguern, E. (2001). First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* 28, 46-48.
- Bean, B.P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 8, 451-465.
- Bechi, G., Rusconi, R., Cestele, S., Striano, P., Franceschetti, S., and Mantegazza, M. (2015). Rescuable folding defective NaV1.1 (SCN1A) mutants in epilepsy: properties, occurrence, and novel rescuing strategy with peptides targeted to the endoplasmic reticulum. *Neurobiol Dis* 75, 100-114.
- Bechi, G., Scalmani, P., Schiavon, E., Rusconi, R., Franceschetti, S., and Mantegazza, M. (2012). Pure haploinsufficiency for Dravet syndrome Na(V)1.1 (SCN1A) sodium channel truncating mutations. *Epilepsia* 53, 87-100.
- Beckh, S., Noda, M., Lubbert, H., and Numa, S. (1989). Differential regulation of three sodium channel messenger RNAs in the rat central nervous system during development. *EMBO J* 8, 3611-3616.
- Begemann, A., Acuna, M.A., Zweier, M., Vincent, M., Steindl, K., Bachmann-Gagescu, R., Hackenberg, A., Abela, L., Plecko, B., Kroell-Seger, J., Baumer, A., Yamakawa, K., Inoue, Y., Asadollahi, R., Sticht, H., Zeilhofer, H.U., and Rauch, A. (2019). Further corroboration of distinct functional features in SCN2A variants causing intellectual disability or epileptic phenotypes. *Mol Med* 25, 6.
- Ben-Shalom, R., Keeshen, C.M., Berrios, K.N., An, J.Y., Sanders, S.J., and Bender, K.J. (2017). Opposing Effects on NaV1.2 Function Underlie Differences Between SCN2A Variants Observed in Individuals With Autism Spectrum Disorder or Infantile Seizures. *Biol Psychiatry* 82, 224-232.
- Berecki, G., Howell, K.B., Deerasooriya, Y.H., Cilio, M.R., Oliva, M.K., Kaplan, D., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., and Petrou, S. (2018). Dynamic action potential clamp predicts functional separation in mild familial and severe de novo forms of SCN2A epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E5516-E5525.
- Berg, A.T. (2004). Stopping antiepileptic drugs after successful surgery: what do we know? And what do we still need to learn? *Epilepsia* 45, 101-102.
- Berg, A.T., Shinnar, S., Levy, S.R., Testa, F.M., Smith-Rapaport, S., and Beckerman, B. (2001). Early development of intractable epilepsy in children: a prospective study. *Neurology* 56, 1445-1452.

- Berkovic, S.F., Heron, S.E., Giordano, L., Marini, C., Guerrini, R., Kaplan, R.E., Gambardella, A., Steinlein, O.K., Grinton, B.E., Dean, J.T., Bordo, L., Hodgson, B.L., Yamamoto, T., Mulley, J.C., Zara, F., and Scheffer, I.E. (2004). Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy. *Ann Neurol* 55, 550-557.
- Bertaso, F., Zhang, C., Scheschonka, A., De Bock, F., Fontanaud, P., Marin, P., Huganir, R.L., Betz, H., Bockaert, J., Fagni, L., and Lerner-Natoli, M. (2008). PICK1 uncoupling from mGluR7a causes absence-like seizures. *Nat Neurosci* 11, 940-948.
- Bertelli, S., Barbieri, R., Pusch, M., and Gavazzo, P. (2019). Gain of function of sporadic/familial hemiplegic migraine-causing SCN1A mutations: Use of an optimized cDNA. *Cephalalgia* 39, 477-488.
- Biervert, C., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Berkovic, S.F., Propping, P., Jentsch, T.J., and Steinlein, O.K. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279, 403-406.
- Boiko, T., Rasband, M.N., Levinson, S.R., Caldwell, J.H., Mandel, G., Trimmer, J.S., and Matthews, G. (2001). Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon. *Neuron* 30, 91-104.
- Boiko, T., Van Wart, A., Caldwell, J.H., Levinson, S.R., Trimmer, J.S., and Matthews, G. (2003). Functional specialization of the axon initial segment by isoform-specific sodium channel targeting. *J Neurosci* 23, 2306-2313.
- Bolay, H., Reuter, U., Dunn, A.K., Huang, Z., Boas, D.A., and Moskowitz, M.A. (2002). Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 8, 136-142.
- Brachet, A., Leterrier, C., Irondelle, M., Fache, M.P., Racine, V., Sibarita, J.B., Choquet, D., and Dargent, B. (2010). Ankyrin G restricts ion channel diffusion at the axonal initial segment before the establishment of the diffusion barrier. *J Cell Biol* 191, 383-395.
- Brackenbury, W.J., and Isom, L.L. (2011). Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Front Pharmacol* 2, 53.
- Brechet, A., Fache, M.P., Brachet, A., Ferracci, G., Baude, A., Irondelle, M., Pereira, S., Leterrier, C., and Dargent, B. (2008). Protein kinase CK2 contributes to the organization of sodium channels in axonal membranes by regulating their interactions with ankyrin G. *J Cell Biol* 183, 1101-1114.
- Capes, D.L., Goldschen-Ohm, M.P., Arcisio-Miranda, M., Bezanilla, F., and Chanda, B. (2013). Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels. *J Gen Physiol* 142, 101-112.
- Carroll, L.S., Woolf, R., Ibrahim, Y., Williams, H.J., Dwyer, S., Walters, J., Kirov, G., O'donovan, M.C., and Owen, M.J. (2016). Mutation screening of SCN2A in schizophrenia and identification of a novel loss-of-function mutation. *Psychiatr Genet* 26, 60-65.
- Carpenter MB, Sutin J (1983) Human neuroanatomy, 8th edn. Williams & Wilkins, Baltimore
- Carvill, G.L., Weckhuysen, S., McMahon, J.M., Hartmann, C., Moller, R.S., Hjalgrim, H., Cook, J., Geraghty, E., O'roak, B.J., Petrou, S., Clarke, A., Gill, D., Sadleir, L.G., Muhle, H., Von Spiczak, S., Nikanorova, M., Hodgson, B.L., Gazina, E.V., Suls, A., Shendure, J., Dibbens, L.M., De Jonghe, P., Helbig, I., Berkovic, S.F., Scheffer, I.E., and Mefford, H.C. (2014). GABRA1 and STXBP1: novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology* 82, 1245-1253.
- Castro, M.J., Stam, A.H., Lemos, C., De Vries, B., Vanmolokot, K.R., Barros, J., Terwindt, G.M., Frants, R.R., Sequeiros, J., Ferrari, M.D., Pereira-Monteiro, J.M., and Van Den Maagdenberg, A.M. (2009). First mutation in the voltage-gated Nav1.1 subunit gene

- SCN1A with co-occurring familial hemiplegic migraine and epilepsy. *Cephalalgia* 29, 308-313.
- Catterall, W.A. (1986). Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu Rev Biochem* 55, 953-985.
- Catterall, W.A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13-25.
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., and Waxman, S.G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57, 397-409.
- Catterall, W.A., and Zheng, N. (2015). Deciphering voltage-gated Na(+) and Ca(2+) channels by studying prokaryotic ancestors. *Trends Biochem Sci* 40, 526-534.
- Cestele, S., Labate, A., Rusconi, R., Tarantino, P., Mumoli, L., Franceschetti, S., Annesi, G., Mantegazza, M., and Gambardella, A. (2013a). Divergent effects of the T1174S SCN1A mutation associated with seizures and hemiplegic migraine. *Epilepsia* 54, 927-935.
- Cestele, S., Qu, Y., Rogers, J.C., Rochat, H., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1998). Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron* 21, 919-931.
- Cestele, S., Scalmani, P., Rusconi, R., Terragni, B., Franceschetti, S., and Mantegazza, M. (2008). Self-limited hyperexcitability: functional effect of a familial hemiplegic migraine mutation of the Nav1.1 (SCN1A) Na⁺ channel. *J Neurosci* 28, 7273-7283.
- Cestele, S., Schiavon, E., Rusconi, R., Franceschetti, S., and Mantegazza, M. (2013b). Nonfunctional Nav1.1 familial hemiplegic migraine mutant transformed into gain of function by partial rescue of folding defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 17546-17551.
- Chahine, M., George, A.L., Jr., Zhou, M., Ji, S., Sun, W., Barchi, R.L., and Horn, R. (1994). Sodium channel mutations in paramyotonia congenita uncouple inactivation from activation. *Neuron* 12, 281-294.
- Chastan, N., Lebas, A., Legoff, F., Parain, D., and Guyant-Marechal, L. (2016). Clinical and electroencephalographic abnormalities during the full duration of a sporadic hemiplegic migraine attack. *Neurophysiol Clin* 46, 307-311.
- Chen, C., Bharucha, V., Chen, Y., Westenbroek, R.E., Brown, A., Malhotra, J.D., Jones, D., Avery, C., Gillespie, P.J., 3rd, Kazen-Gillespie, K.A., Kazarinova-Noyes, K., Shrager, P., Saunders, T.L., Macdonald, R.L., Ransom, B.R., Scheuer, T., Catterall, W.A., and Isom, L.L. (2002). Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel beta 2-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 17072-17077.
- Chen, C., Westenbroek, R.E., Xu, X., Edwards, C.A., Sorenson, D.R., Chen, Y., Mcewen, D.P., O'malley, H.A., Bharucha, V., Meadows, L.S., Knudsen, G.A., Vilaythong, A., Noebels, J.L., Saunders, T.L., Scheuer, T., Shrager, P., Catterall, W.A., and Isom, L.L. (2004). Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *J Neurosci* 24, 4030-4042.
- Chen, S.H., Fu, S.J., Huang, J.J., and Tang, C.Y. (2016). The episodic ataxia type 1 mutation I262T alters voltage-dependent gating and disrupts protein biosynthesis of human Kv1.1 potassium channels. *Sci Rep* 6, 19378.
- Choi, J.S., Cheng, X., Foster, E., Leffler, A., Tyrrell, L., Te Morsche, R.H., Eastman, E.M., Jansen, H.J., Huehne, K., Nau, C., Dib-Hajj, S.D., Drenth, J.P., and Waxman, S.G. (2010). Alternative splicing may contribute to time-dependent manifestation of inherited erythromelalgia. *Brain* 133, 1823-1835.

- Claes, L., Del-Favero, J., Ceulemans, B., Lagae, L., Van Broeckhoven, C., and De Jonghe, P. (2001). De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet* 68, 1327-1332.
- Clatot, J., Hoshi, M., Wan, X., Liu, H., Jain, A., Shinlapawittayatorn, K., Marionneau, C., Ficker, E., Ha, T., and Deschenes, I. (2017). Voltage-gated sodium channels assemble and gate as dimers. *Nat Commun* 8, 2077.
- Clatot, J., Zheng, Y., Girardeau, A., Liu, H., Laurita, K.R., Marionneau, C., and Deschenes, I. (2018). Mutant voltage-gated Na(+) channels can exert a dominant negative effect through coupled gating. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315, H1250-H1257.
- Clatot, J., Ziyadeh-Isleem, A., Maugendre, S., Denjoy, I., Liu, H., Dilanian, G., Hatem, S.N., Deschenes, I., Coulombe, A., Guicheney, P., and Neyroud, N. (2012). Dominant-negative effect of SCN5A N-terminal mutations through the interaction of Na(v)1.5 alpha-subunits. *Cardiovasc Res* 96, 53-63.
- Cone, T.E., Jr. (1970). On a peculiar form of infantile convulsions (hypsarrhythmia) as described in his own infant son by Dr. W.J. West in 1841. *Pediatrics* 46, 603.
- Connors, B.W., and Gutnick, M.J. (1990). Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci* 13, 99-104.
- Contreras, D. (2004). Electrophysiological classes of neocortical neurons. *Neural Netw* 17, 633-646.
- Cummins, T.R., and Sigworth, F.J. (1996). Impaired slow inactivation in mutant sodium channels. *Biophys J* 71, 227-236.
- De Crescenzo, F., Postorino, V., Siracusano, M., Riccioni, A., Armando, M., Curatolo, P., and Mazzone, L. (2019). Autistic Symptoms in Schizophrenia Spectrum Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Psychiatry* 10, 78.
- De Fusco, M., Marconi, R., Silvestri, L., Atorino, L., Rampoldi, L., Morgante, L., Ballabio, A., Aridon, P., and Casari, G. (2003). Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet* 33, 192-196.
- Deprez, L., Jansen, A., and De Jonghe, P. (2009). Genetics of epilepsy syndromes starting in the first year of life. *Neurology* 72, 273-281.
- Desroches, M., Faugeras, O., Krupa, M., and Mantegazza, M. (2019). Modeling cortical spreading depression induced by the hyperactivity of interneurons. *J Comput Neurosci* 47, 125-140.
- Dichgans, M., Freilinger, T., Eckstein, G., Babini, E., Lorenz-Depiereux, B., Biskup, S., Ferrari, M.D., Herzog, J., Van Den Maagdenberg, A.M., Pusch, M., and Strom, T.M. (2005). Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet* 366, 371-377.
- Dickinson, D., Straub, R.E., Trampush, J.W., Gao, Y., Feng, N., Xie, B., Shin, J.H., Lim, H.K., Ursini, G., Bigos, K.L., Kolachana, B., Hashimoto, R., Takeda, M., Baum, G.L., Rujescu, D., Callicott, J.H., Hyde, T.M., Berman, K.F., Kleinman, J.E., and Weinberger, D.R. (2014). Differential effects of common variants in SCN2A on general cognitive ability, brain physiology, and messenger RNA expression in schizophrenia cases and control individuals. *JAMA Psychiatry* 71, 647-656.
- Dravet, C., Bureau, M., Oguni, H., Fukuyama, Y., and Cokar, O. (2005). Severe myoclonic epilepsy in infancy: Dravet syndrome. *Adv Neurol* 95, 71-102.
- DRAVET, C. ; GUERRINI, R. 2011. Dravet syndrome, Montrouge, John Libbey Eurotext, 120 p.
- Ducros, A., Denier, C., Joutel, A., Cecillon, M., Lescoat, C., Vahedi, K., Darcel, F., Vicaut, E., Bousser, M.G., and Tournier-Lasserre, E. (2001). The clinical spectrum of familial

- hemiplegic migraine associated with mutations in a neuronal calcium channel. *N Engl J Med* 345, 17-24.
- Duflocq, A., Chareyre, F., Giovannini, M., Couraud, F., and Davenne, M. (2011). Characterization of the axon initial segment (AIS) of motor neurons and identification of a para-AIS and a juxtapara-AIS, organized by protein 4.1B. *BMC Biol* 9, 66.
- Eaholtz, G., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1994). Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 12, 1041-1048.
- Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y.J., Kim, Y.S., Kauchali, S., Marcin, C., Montiel-Nava, C., Patel, V., Paula, C.S., Wang, C., Yasamy, M.T., and Fombonne, E. (2012). Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res* 5, 160-179.
- Engel, J., Jr. (2001). Intractable epilepsy: definition and neurobiology. *Epilepsia* 42 Suppl 6, 3.
- Escayg, A., Heils, A., Macdonald, B.T., Haug, K., Sander, T., and Meisler, M.H. (2001). A novel SCN1A mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus--and prevalence of variants in patients with epilepsy. *Am J Hum Genet* 68, 866-873.
- Escayg, A., Macdonald, B.T., Meisler, M.H., Baulac, S., Huberfeld, G., An-Gourfinkel, I., Brice, A., Leguern, E., Moulard, B., Chaigne, D., Buresi, C., and Malafosse, A. (2000). Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet* 24, 343-345.
- Fache, M.P., Moussif, A., Fernandes, F., Giraud, P., Garrido, J.J., and Dargent, B. (2004). Endocytotic elimination and domain-selective tethering constitute a potential mechanism of protein segregation at the axonal initial segment. *J Cell Biol* 166, 571-578.
- Fan, C., Wolking, S., Lehmann-Horn, F., Hedrich, U.B., Freilinger, T., Lerche, H., Borck, G., Kubisch, C., and Jurkat-Rott, K. (2016). Early-onset familial hemiplegic migraine due to a novel SCN1A mutation. *Cephalalgia* 36, 1238-1247.
- Fleig, A., Fitch, J.M., Goldin, A.L., Rayner, M.D., Starkus, J.G., and Ruben, P.C. (1994). Point mutations in IIS4 alter activation and inactivation of rat brain IIA Na channels in *Xenopus* oocyte macropatches. *Pflugers Arch* 427, 406-413.
- Flores-Pajot, M.C., Ofner, M., Do, M.T., Lavigne, E., and Villeneuve, P.J. (2016). Childhood autism spectrum disorders and exposure to nitrogen dioxide, and particulate matter air pollution: A review and meta-analysis. *Environ Res* 151, 763-776.
- French, J.A. (1999). Vigabatrin. *Epilepsia* 40 Suppl 5, S11-16.
- Fromer, M., Pocklington, A.J., Kavanagh, D.H., Williams, H.J., Dwyer, S., Gormley, P., Georgieva, L., Rees, E., Palta, P., Ruderfer, D.M., Carrera, N., Humphreys, I., Johnson, J.S., Roussos, P., Barker, D.D., Banks, E., Milanova, V., Grant, S.G., Hannon, E., Rose, S.A., Chambert, K., Mahajan, M., Scolnick, E.M., Moran, J.L., Kirov, G., Palotie, A., Mccarroll, S.A., Holmans, P., Sklar, P., Owen, M.J., Purcell, S.M., and O'donovan, M.C. (2014). De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature* 506, 179-184.
- Garrido, J.J., Giraud, P., Carlier, E., Fernandes, F., Moussif, A., Fache, M.P., Debanne, D., and Dargent, B. (2003). A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science* 300, 2091-2094.
- Gastaut, H., Roger, J., Soulayrol, R., Saint-Jean, M., Tassinari, C.A., Regis, H., Bernard, R., Pinsard, N., and Dravet, C. (1966). [Epileptic encephalopathy of children with diffuse slow spikes and waves (alias "petit mal variant") or Lennox syndrome]. *Ann Pediatr (Paris)* 13, 489-499.

- Gazina, E.V., Leaw, B.T., Richards, K.L., Wimmer, V.C., Kim, T.H., Aumann, T.D., Featherby, T.J., Churilov, L., Hammond, V.E., Reid, C.A., and Petrou, S. (2015). 'Neonatal' Nav1.2 reduces neuronal excitability and affects seizure susceptibility and behaviour. *Hum Mol Genet* 24, 1457-1468.
- Go, C.Y., Mackay, M.T., Weiss, S.K., Stephens, D., Adams-Webber, T., Ashwal, S., Snead, O.C., 3rd, Child Neurology, S., and American Academy Of, N. (2012). Evidence-based guideline update: medical treatment of infantile spasms. Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 78, 1974-1980.
- Goldin, A.L. (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* 63, 871-894.
- Goldin, A.L., Barchi, R.L., Caldwell, J.H., Hofmann, F., Howe, J.R., Hunter, J.C., Kallen, R.G., Mandel, G., Meisler, M.H., Netter, Y.B., Noda, M., Tamkun, M.M., Waxman, S.G., Wood, J.N., and Catterall, W.A. (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28, 365-368.
- Gong, B., Rhodes, K.J., Bekele-Arcuri, Z., and Trimmer, J.S. (1999). Type I and type II Na(+) channel alpha-subunit polypeptides exhibit distinct spatial and temporal patterning, and association with auxiliary subunits in rat brain. *J Comp Neurol* 412, 342-352.
- Gordon, D., Merrick, D., Auld, V., Dunn, R., Goldin, A.L., Davidson, N., and Catterall, W.A. (1987). Tissue-specific expression of the RI and RII sodium channel subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8682-8686.
- Guerrini, R., Marini, C., and Mantegazza, M. (2014). Genetic epilepsy syndromes without structural brain abnormalities: clinical features and experimental models. *Neurotherapeutics* 11, 269-285.
- Guillaud, L., Setou, M., and Hirokawa, N. (2003). KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons. *J Neurosci* 23, 131-140.
- Guy, H.R., and Seetharamulu, P. (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 508-512.
- Hadjikhani, N., Sanchez Del Rio, M., Wu, O., Schwartz, D., Bakker, D., Fischl, B., Kwong, K.K., Cutrer, F.M., Rosen, B.R., Tootell, R.B., Sorensen, A.G., and Moskowitz, M.A. (2001). Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4687-4692.
- Hamati-Haddad, A., and Abou-Khalil, B. (1998). Epilepsy diagnosis and localization in patients with antecedent childhood febrile convulsions. *Neurology* 50, 917-922.
- Hancock, E.C., and Cross, H.H. (2009). Treatment of Lennox-Gastaut syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003277.
- Harkin, L.A., McMahon, J.M., Iona, X., Dibbens, L., Pelekanos, J.T., Zuberi, S.M., Sadleir, L.G., Andermann, E., Gill, D., Farrell, K., Connolly, M., Stanley, T., Harbord, M., Andermann, F., Wang, J., Batish, S.D., Jones, J.G., Seltzer, W.K., Gardner, A., Infantile Epileptic Encephalopathy Referral, C., Sutherland, G., Berkovic, S.F., Mulley, J.C., and Scheffer, I.E. (2007). The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain* 130, 843-852.
- Hartshorne, R.P., and Catterall, W.A. (1984). The sodium channel from rat brain. Purification and subunit composition. *J Biol Chem* 259, 1667-1675.
- Hayward, L.J., Brown, R.H., Jr., and Cannon, S.C. (1997). Slow inactivation differs among mutant Na channels associated with myotonia and periodic paralysis. *Biophys J* 72, 1204-1219.
- Headache Classification Subcommittee of the International Headache, S. (2004). The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia* 24 Suppl 1, 9-160.

- Hedrich, U.B.S., Lauxmann, S., and Lerche, H. (2019). SCN2A channelopathies: Mechanisms and models. *Epilepsia* 60 Suppl 3, S68-S76.
- Hell, S.W., et al. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* 19, 780-782
- Heron, S.E., Crossland, K.M., Andermann, E., Phillips, H.A., Hall, A.J., Bleasel, A., Shevell, M., Mercho, S., Seni, M.H., Guiot, M.C., Mulley, J.C., Berkovic, S.F., and Scheffer, I.E. (2002). Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. *Lancet* 360, 851-852.
- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1945). Resting and action potentials in single nerve fibres. *J Physiol* 104, 176-195.
- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116, 449-472.
- Hu, W., Tian, C., Li, T., Yang, M., Hou, H., and Shu, Y. (2009). Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci* 12, 996-1002.
- Huguet, G., Benabou, M., and Bourgeron, T. (2016). "The Genetics of Autism Spectrum Disorders," in *A Time for Metabolism and Hormones*, eds. P. Sassone-Corsi & Y. Christen. (Cham (CH)), 101-129.
- Iossifov, I., O'roak, B.J., Sanders, S.J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H.A., Witherspoon, K.T., Vives, L., Patterson, K.E., Smith, J.D., Paepker, B., Nickerson, D.A., Dea, J., Dong, S., Gonzalez, L.E., Mandell, J.D., Mane, S.M., Murtha, M.T., Sullivan, C.A., Walker, M.F., Waqar, Z., Wei, L., Willsey, A.J., Yamrom, B., Lee, Y.H., Grabowska, E., Dalkic, E., Wang, Z., Marks, S., Andrews, P., Leotta, A., Kendall, J., Hakker, I., Rosenbaum, J., Ma, B., Rodgers, L., Troge, J., Narzisi, G., Yoon, S., Schatz, M.C., Ye, K., McCombie, W.R., Shendure, J., Eichler, E.E., State, M.W., and Wigler, M. (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* 515, 216-221.
- Isom, L.L. (2001). Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* 7, 42-54.
- Isom, L.L., De Jongh, K.S., Patton, D.E., Reber, B.F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A.L., and Catterall, W.A. (1992). Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256, 839-842.
- Isom, L.L., Ragsdale, D.S., De Jongh, K.S., Westenbroek, R.E., Reber, B.F., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1995). Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 83, 433-442.
- Jain, A., Liu, R., Ramani, B., Arauz, E., Ishitsuka, Y., Ragunathan, K., Park, J., Chen, J., Xiang, Y.K., and Ha, T. (2011). Probing cellular protein complexes using single-molecule pull-down. *Nature* 473, 484-488.
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Rastam, M., Colineaux, C., Gillberg, I.C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., Bourgeron, T., and Paris Autism Research International Sibpair, S. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 34, 27-29.
- Jansen, F.E., Sadleir, L.G., Harkin, L.A., Vadlamudi, L., McMahon, J.M., Mulley, J.C., Scheffer, I.E., and Berkovic, S.F. (2006). Severe myoclonic epilepsy of infancy (Dravet syndrome): recognition and diagnosis in adults. *Neurology* 67, 2224-2226.
- Jansen, N.A., Dehghani, A., Linssen, M.M.L., Breukel, C., Tolner, E.A., and Van Den Maagdenberg, A. (2020). First FHM3 mouse model shows spontaneous cortical spreading depolarizations. *Ann Clin Transl Neurol* 7, 132-138.

- Jeng, C.J., Chen, Y.T., Chen, Y.W., and Tang, C.Y. (2006). Dominant-negative effects of human P/Q-type Ca²⁺ channel mutations associated with episodic ataxia type 2. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C1209-1220.
- Jiang, Y.H., Yuen, R.K., Jin, X., Wang, M., Chen, N., Wu, X., Ju, J., Mei, J., Shi, Y., He, M., Wang, G., Liang, J., Wang, Z., Cao, D., Carter, M.T., Chrysler, C., Drmic, I.E., Howe, J.L., Lau, L., Marshall, C.R., Merico, D., Nalpathamkalam, T., Thiruvahindrapuram, B., Thompson, A., Uddin, M., Walker, S., Luo, J., Anagnostou, E., Zwaigenbaum, L., Ring, R.H., Wang, J., Lajonchere, C., Wang, J., Shih, A., Szatmari, P., Yang, H., Dawson, G., Li, Y., and Scherer, S.W. (2013). Detection of clinically relevant genetic variants in autism spectrum disorder by whole-genome sequencing. *Am J Hum Genet* 93, 249-263.
- Kahlig, K.M., Rhodes, T.H., Pusch, M., Freilinger, T., Pereira-Monteiro, J.M., Ferrari, M.D., Van Den Maagdenberg, A.M., Dichgans, M., and George, A.L., Jr. (2008). Divergent sodium channel defects in familial hemiplegic migraine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9799-9804.
- Kamiya, K., Kaneda, M., Sugawara, T., Mazaki, E., Okamura, N., Montal, M., Makita, N., Tanaka, M., Fukushima, K., Fujiwara, T., Inoue, Y., and Yamakawa, K. (2004). A nonsense mutation of the sodium channel gene SCN2A in a patient with intractable epilepsy and mental decline. *J Neurosci* 24, 2690-2698.
- Kaplan, M.R., Cho, M.H., Ullian, E.M., Isom, L.L., Levinson, S.R., and Barres, B.A. (2001). Differential control of clustering of the sodium channels Na(v)1.2 and Na(v)1.6 at developing CNS nodes of Ranvier. *Neuron* 30, 105-119.
- Kaplan, R.E., and Lacey, D.J. (1983). Benign familial neonatal-infantile seizures. *Am J Med Genet* 16, 595-599.
- Kellaway, P., Hrachovy, R.A., Frost, J.D., Jr., and Zion, T. (1979). Precise characterization and quantification of infantile spasms. *Ann Neurol* 6, 214-218.
- Kellenberger, S., West, J.W., Catterall, W.A., and Scheuer, T. (1997). Molecular analysis of potential hinge residues in the inactivation gate of brain type IIA Na⁺ channels. *J Gen Physiol* 109, 607-617.
- Kovacevic, J., Maroteaux, G., Schut, D., Loos, M., Dubey, M., Pitsch, J., Rimmelink, E., Koopmans, B., Crowley, J., Cornelisse, L.N., Sullivan, P.F., Schoch, S., Toonen, R.F., Stiedl, O., and Verhage, M. (2018). Protein instability, haploinsufficiency, and cortical hyper-excitability underlie STXBP1 encephalopathy. *Brain* 141, 1350-1374.
- Laedermann, C.J., Syam, N., Pertin, M., Decosterd, I., and Abriel, H. (2013). beta1- and beta3- voltage-gated sodium channel subunits modulate cell surface expression and glycosylation of Nav1.7 in HEK293 cells. *Front Cell Neurosci* 7, 137.
- Lai, M.C., Lombardo, M.V., and Baron-Cohen, S. (2014). Autism. *Lancet* 383, 896-910.
- Lauritzen, M. (1994). Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 117 (Pt 1), 199-210.
- Lauxmann, S., Boutry-Kryza, N., Rivier, C., Mueller, S., Hedrich, U.B., Maljevic, S., Szepetowski, P., Lerche, H., and Lesca, G. (2013). An SCN2A mutation in a family with infantile seizures from Madagascar reveals an increased subthreshold Na(+) current. *Epilepsia* 54, e117-121.
- Lena, I., and Mantegazza, M. (2019). Nav1.2 haploinsufficiency in Scn2a knock-out mice causes an autistic-like phenotype attenuated with age. *Sci Rep* 9, 12886.
- Leterrier, C., and Dargent, B. (2014). No Pasaran! Role of the axon initial segment in the regulation of protein transport and the maintenance of axonal identity. *Semin Cell Dev Biol* 27, 44-51.

- Li, T., Tian, C., Scalmani, P., Frassoni, C., Mantegazza, M., Wang, Y., Yang, M., Wu, S., and Shu, Y. (2014). Action potential initiation in neocortical inhibitory interneurons. *PLoS Biol* 12, e1001944.
- Liao, Y., Deprez, L., Maljevic, S., Pitsch, J., Claes, L., Hristova, D., Jordanova, A., Ala-Mello, S., Bellan-Koch, A., Blazevic, D., Schubert, S., Thomas, E.A., Petrou, S., Becker, A.J., De Jonghe, P., and Lerche, H. (2010). Molecular correlates of age-dependent seizures in an inherited neonatal-infantile epilepsy. *Brain* 133, 1403-1414.
- Loomes, R., Hull, L., and Mandy, W.P.L. (2017). What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 56, 466-474.
- Lopez-Santiago, L.F., Meadows, L.S., Ernst, S.J., Chen, C., Malhotra, J.D., Mcewen, D.P., Speelman, A., Noebels, J.L., Maier, S.K., Lopatin, A.N., and Isom, L.L. (2007). Sodium channel *Scn1b* null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *J Mol Cell Cardiol* 43, 636-647.
- Lossin, C., Rhodes, T.H., Desai, R.R., Vanoye, C.G., Wang, D., Carniciu, S., Devinsky, O., and George, A.L., Jr. (2003). Epilepsy-associated dysfunction in the voltage-gated neuronal sodium channel *SCN1A*. *J Neurosci* 23, 11289-11295.
- Lux, A.L., and Osborne, J.P. (2004). A proposal for case definitions and outcome measures in studies of infantile spasms and West syndrome: consensus statement of the West Delphi group. *Epilepsia* 45, 1416-1428.
- Mackintosh, C. (2004). Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem J* 381, 329-342.
- Malhotra, J.D., Koopmann, M.C., Kazen-Gillespie, K.A., Fettman, N., Hortsch, M., and Isom, L.L. (2002). Structural requirements for interaction of sodium channel beta 1 subunits with ankyrin. *J Biol Chem* 277, 26681-26688.
- Mantegazza, M., and Broccoli, V. (2019). *SCN1A/NaV 1.1* channelopathies: Mechanisms in expression systems, animal models, and human iPSC models. *Epilepsia* 60 Suppl 3, S25-S38.
- Mantegazza, M., and Catterall, W.A. (2012). "Voltage-Gated Na(+) Channels: Structure, Function, and Pathophysiology," in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, eds. Th, J.L. Noebels, M. Avoli, M.A. Rogawski, R.W. Olsen & A.V. Delgado-Escueta. (Bethesda (MD)).
- Mantegazza, M., and Cestele, S. (2018). Pathophysiological mechanisms of migraine and epilepsy: Similarities and differences. *Neurosci Lett* 667, 92-102.
- Mantegazza, M., Yu, F.H., Powell, A.J., Clare, J.J., Catterall, W.A., and Scheuer, T. (2005). Molecular determinants for modulation of persistent sodium current by G-protein betagamma subunits. *J Neurosci* 25, 3341-3349.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5, 793-807.
- Martin, M.S., Dutt, K., Papale, L.A., Dube, C.M., Dutton, S.B., De Haan, G., Shankar, A., Tufik, S., Meisler, M.H., Baram, T.Z., Goldin, A.L., and Escayg, A. (2010). Altered function of the *SCN1A* voltage-gated sodium channel leads to gamma-aminobutyric acid-ergic (GABAergic) interneuron abnormalities. *J Biol Chem* 285, 9823-9834.
- Martinez-Cerdeno, V. (2017). Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models. *Dev Neurobiol* 77, 393-404.
- Mcphee, J.C., Ragsdale, D.S., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1995). A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. *J Biol Chem* 270, 12025-12034.

- Mezghrani, A., Monteil, A., Watschinger, K., Sinnegger-Brauns, M.J., Barrere, C., Bourinet, E., Nargeot, J., Striessnig, J., and Lory, P. (2008). A destructive interaction mechanism accounts for dominant-negative effects of misfolded mutants of voltage-gated calcium channels. *J Neurosci* 28, 4501-4511.
- Mi, Z., Yang, J., He, Q., Zhang, X., Xiao, Y., and Shu, Y. (2019). Alterations of Electrophysiological Properties and Ion Channel Expression in Prefrontal Cortex of a Mouse Model of Schizophrenia. *Front Cell Neurosci* 13, 554.
- Miceli, F., Soldovieri, M.V., Ambrosino, P., Barrese, V., Migliore, M., Cilio, M.R., and Tagliatela, M. (2013). Genotype-phenotype correlations in neonatal epilepsies caused by mutations in the voltage sensor of K(v)7.2 potassium channel subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 4386-4391.
- Miyazaki, H., Oyama, F., Inoue, R., Aosaki, T., Abe, T., Kiyonari, H., Kino, Y., Kurosawa, M., Shimizu, J., Ogiwara, I., Yamakawa, K., Koshimizu, Y., Fujiyama, F., Kaneko, T., Shimizu, H., Nagatomo, K., Yamada, K., Shimogori, T., Hattori, N., Miura, M., and Nukina, N. (2014). Singular localization of sodium channel beta4 subunit in unmyelinated fibres and its role in the striatum. *Nat Commun* 5, 5525.
- Mulley, J.C., Nelson, P., Guerrero, S., Dibbens, L., Iona, X., McMahon, J.M., Harkin, L., Schouten, J., Yu, S., Berkovic, S.F., and Scheffer, I.E. (2006). A new molecular mechanism for severe myoclonic epilepsy of infancy: exonic deletions in SCN1A. *Neurology* 67, 1094-1095.
- Noda, M., Ikeda, T., Kayano, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Kurasaki, M., Takahashi, H., and Numa, S. (1986). Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature* 320, 188-192.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., and Et Al. (1984). Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121-127.
- Noda, M., Suzuki, H., Numa, S., and Stuhmer, W. (1989). A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett* 259, 213-216.
- Nunes, D., and Kuner, T. (2018). Axonal sodium channel Nav1.2 drives granule cell dendritic GABA release and rapid odor discrimination. *PLoS Biol* 16, e2003816.
- Ogiwara, I., Ito, K., Sawaiishi, Y., Osaka, H., Mazaki, E., Inoue, I., Montal, M., Hashikawa, T., Shike, T., Fujiwara, T., Inoue, Y., Kaneda, M., and Yamakawa, K. (2009). De novo mutations of voltage-gated sodium channel alphaII gene SCN2A in intractable epilepsies. *Neurology* 73, 1046-1053.
- Ogiwara, I., Iwasato, T., Miyamoto, H., Iwata, R., Yamagata, T., Mazaki, E., Yanagawa, Y., Tamamaki, N., Hensch, T.K., Itohara, S., and Yamakawa, K. (2013). Nav1.1 haploinsufficiency in excitatory neurons ameliorates seizure-associated sudden death in a mouse model of Dravet syndrome. *Hum Mol Genet* 22, 4784-4804.
- Ogiwara, I., Miyamoto, H., Morita, N., Atapour, N., Mazaki, E., Inoue, I., Takeuchi, T., Itohara, S., Yanagawa, Y., Obata, K., Furuichi, T., Hensch, T.K., and Yamakawa, K. (2007). Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J Neurosci* 27, 5903-5914.
- Ogiwara, I., Miyamoto, H., Tatsukawa, T., Yamagata, T., Nakayama, T., Atapour, N., Miura, E., Mazaki, E., Ernst, S.J., Cao, D., Ohtani, H., Itohara, S., Yanagawa, Y., Montal, M., Yuzaki, M., Inoue, Y., Hensch, T.K., Noebels, J.L., and Yamakawa, K. (2018). Nav1.2 haploinsufficiency in excitatory neurons causes absence-like seizures in mice. *Commun Biol* 1, 96.

- Ohtahara, S., Yamatogi, Y., and Ohtsuka, Y. (1976). Prognosis of the Lennox syndrome-long-term clinical and electroencephalographic follow-up study, especially with special reference to relationship with the West syndrome. *Folia Psychiatr Neurol Jpn* 30, 275-287.
- Onwuli, D.O., and Beltran-Alvarez, P. (2016). An update on transcriptional and post-translational regulation of brain voltage-gated sodium channels. *Amino Acids* 48, 641-651.
- Ophoff, R.A., Terwindt, G.M., Vergouwe, M.N., Van Eijk, R., Oefner, P.J., Hoffman, S.M., Lamerdin, J.E., Mohrenweiser, H.W., Bulman, D.E., Ferrari, M., Haan, J., Lindhout, D., Van Ommen, G.J., Hofker, M.H., Ferrari, M.D., and Frants, R.R. (1996). Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell* 87, 543-552.
- Orhan, G., Bock, M., Schepers, D., Ilina, E.I., Reichel, S.N., Loffler, H., Jezutkovic, N., Weckhuysen, S., Mandelstam, S., Suls, A., Danker, T., Guenther, E., Scheffer, I.E., De Jonghe, P., Lerche, H., and Maljevic, S. (2014). Dominant-negative effects of KCNQ2 mutations are associated with epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* 75, 382-394.
- Pan, X., Li, Z., Zhou, Q., Shen, H., Wu, K., Huang, X., Chen, J., Zhang, J., Zhu, X., Lei, J., Xiong, W., Gong, H., Xiao, B., and Yan, N. (2018). Structure of the human voltage-gated sodium channel Nav1.4 in complex with beta1. *Science* 362.
- Park, D.S., Cerrone, M., Morley, G., Vasquez, C., Fowler, S., Liu, N., Bernstein, S.A., Liu, F.Y., Zhang, J., Rogers, C.S., Priori, S.G., Chinitz, L.A., and Fishman, G.I. (2015). Genetically engineered SCN5A mutant pig hearts exhibit conduction defects and arrhythmias. *J Clin Invest* 125, 403-412.
- Patino, G.A., Claes, L.R., Lopez-Santiago, L.F., Slat, E.A., Dondeti, R.S., Chen, C., O'malley, H.A., Gray, C.B., Miyazaki, H., Nukina, N., Oyama, F., De Jonghe, P., and Isom, L.L. (2009). A functional null mutation of SCN1B in a patient with Dravet syndrome. *J Neurosci* 29, 10764-10778.
- Payandeh, J., Gamal El-Din, T.M., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2012). Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* 486, 135-139.
- Petilla Interneuron Nomenclature, G., Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsaki, G., Cauli, B., Defelipe, J., Fairen, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fregnac, Y., Freund, T.F., Gardner, D., Gardner, E.P., Goldberg, J.H., Helmstaedter, M., Hestrin, S., Karube, F., Kisvarday, Z.F., Lambolez, B., Lewis, D.A., Marin, O., Markram, H., Munoz, A., Packer, A., Petersen, C.C., Rockland, K.S., Rossier, J., Rudy, B., Somogyi, P., Staiger, J.F., Tamas, G., Thomson, A.M., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., West, D.C., and Yuste, R. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9, 557-568.
- Pusch, M., Noda, M., Stuhmer, W., Numa, S., and Conti, F. (1991). Single point mutations of the sodium channel drastically reduce the pore permeability without preventing its gating. *Eur Biophys J* 20, 127-133.
- Rasband, M.N. (2010). The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci* 11, 552-562.
- Rohl, C.A., Boeckman, F.A., Baker, C., Scheuer, T., Catterall, W.A., and Klevit, R.E. (1999). Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry* 38, 855-861.
- Rossignol, D.A., Genuis, S.J., and Frye, R.E. (2014). Environmental toxicants and autism spectrum disorders: a systematic review. *Transl Psychiatry* 4, e360.
- Rubenstein, J.L., and Merzenich, M.M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* 2, 255-267.

- Rusconi, R., Combi, R., Cestele, S., Grioni, D., Franceschetti, S., Dalpra, L., and Mantegazza, M. (2009). A rescuable folding defective Nav1.1 (SCN1A) sodium channel mutant causes GEFS+: common mechanism in Nav1.1 related epilepsies? *Hum Mutat* 30, E747-760.
- Rusconi, R., Scalmani, P., Cassulini, R.R., Giunti, G., Gambardella, A., Franceschetti, S., Annesi, G., Wanke, E., and Mantegazza, M. (2007). Modulatory proteins can rescue a trafficking defective epileptogenic Nav1.1 Na⁺ channel mutant. *J Neurosci* 27, 11037-11046.
- Saitsu, H., Kato, M., Mizuguchi, T., Hamada, K., Osaka, H., Tohyama, J., Uruno, K., Kumada, S., Nishiyama, K., Nishimura, A., Okada, I., Yoshimura, Y., Hirai, S., Kumada, T., Hayasaka, K., Fukuda, A., Ogata, K., and Matsumoto, N. (2008). De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet* 40, 782-788.
- Salgueiro-Pereira, A.R., Duprat, F., Pousinha, P.A., Loucif, A., Douchamps, V., Regondi, C., Ayrault, M., Eugie, M., Stunault, M.I., Escayg, A., Goutagny, R., Gnatkovsky, V., Frassoni, C., Marie, H., Bethus, I., and Mantegazza, M. (2019). A two-hit story: Seizures and genetic mutation interaction sets phenotype severity in SCN1A epilepsies. *Neurobiol Dis* 125, 31-44.
- Sanders, S.J., He, X., Willsey, A.J., Ercan-Sencicek, A.G., Samocha, K.E., Cicek, A.E., Murtha, M.T., Bal, V.H., Bishop, S.L., Dong, S., Goldberg, A.P., Jinlu, C., Keaney, J.F., 3rd, Klei, L., Mandell, J.D., Moreno-De-Luca, D., Poultney, C.S., Robinson, E.B., Smith, L., Solli-Nowlan, T., Su, M.Y., Teran, N.A., Walker, M.F., Werling, D.M., Beaudet, A.L., Cantor, R.M., Fombonne, E., Geschwind, D.H., Grice, D.E., Lord, C., Lowe, J.K., Mane, S.M., Martin, D.M., Morrow, E.M., Talkowski, M.E., Sutcliffe, J.S., Walsh, C.A., Yu, T.W., Autism Sequencing, C., Ledbetter, D.H., Martin, C.L., Cook, E.H., Buxbaum, J.D., Daly, M.J., Devlin, B., Roeder, K., and State, M.W. (2015). Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron* 87, 1215-1233.
- Sanders, S.J., Murtha, M.T., Gupta, A.R., Murdoch, J.D., Raubeson, M.J., Willsey, A.J., Ercan-Sencicek, A.G., Dilullo, N.M., Parikshak, N.N., Stein, J.L., Walker, M.F., Ober, G.T., Teran, N.A., Song, Y., El-Fishawy, P., Murtha, R.C., Choi, M., Overton, J.D., Bjornson, R.D., Carriero, N.J., Meyer, K.A., Bilguvar, K., Mane, S.M., Sestan, N., Lifton, R.P., Gunel, M., Roeder, K., Geschwind, D.H., Devlin, B., and State, M.W. (2012). De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* 485, 237-241.
- Satterstrom, F.K., Kosmicki, J.A., Wang, J., Breen, M.S., De Rubeis, S., An, J.Y., Peng, M., Collins, R., Grove, J., Klei, L., Stevens, C., Reichert, J., Mulhern, M.S., Artomov, M., Gerges, S., Sheppard, B., Xu, X., Bhaduri, A., Norman, U., Brand, H., Schwartz, G., Nguyen, R., Guerrero, E.E., Dias, C., Autism Sequencing, C., I, P.-B.C., Betancur, C., Cook, E.H., Gallagher, L., Gill, M., Sutcliffe, J.S., Thurm, A., Zwick, M.E., Borglum, A.D., State, M.W., Cicek, A.E., Talkowski, M.E., Cutler, D.J., Devlin, B., Sanders, S.J., Roeder, K., Daly, M.J., and Buxbaum, J.D. (2020). Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell* 180, 568-584 e523.
- Scalmani, P., Rusconi, R., Armatura, E., Zara, F., Avanzini, G., Franceschetti, S., and Mantegazza, M. (2006). Effects in neocortical neurons of mutations of the Na(v)1.2 Na⁺ channel causing benign familial neonatal-infantile seizures. *J Neurosci* 26, 10100-10109.

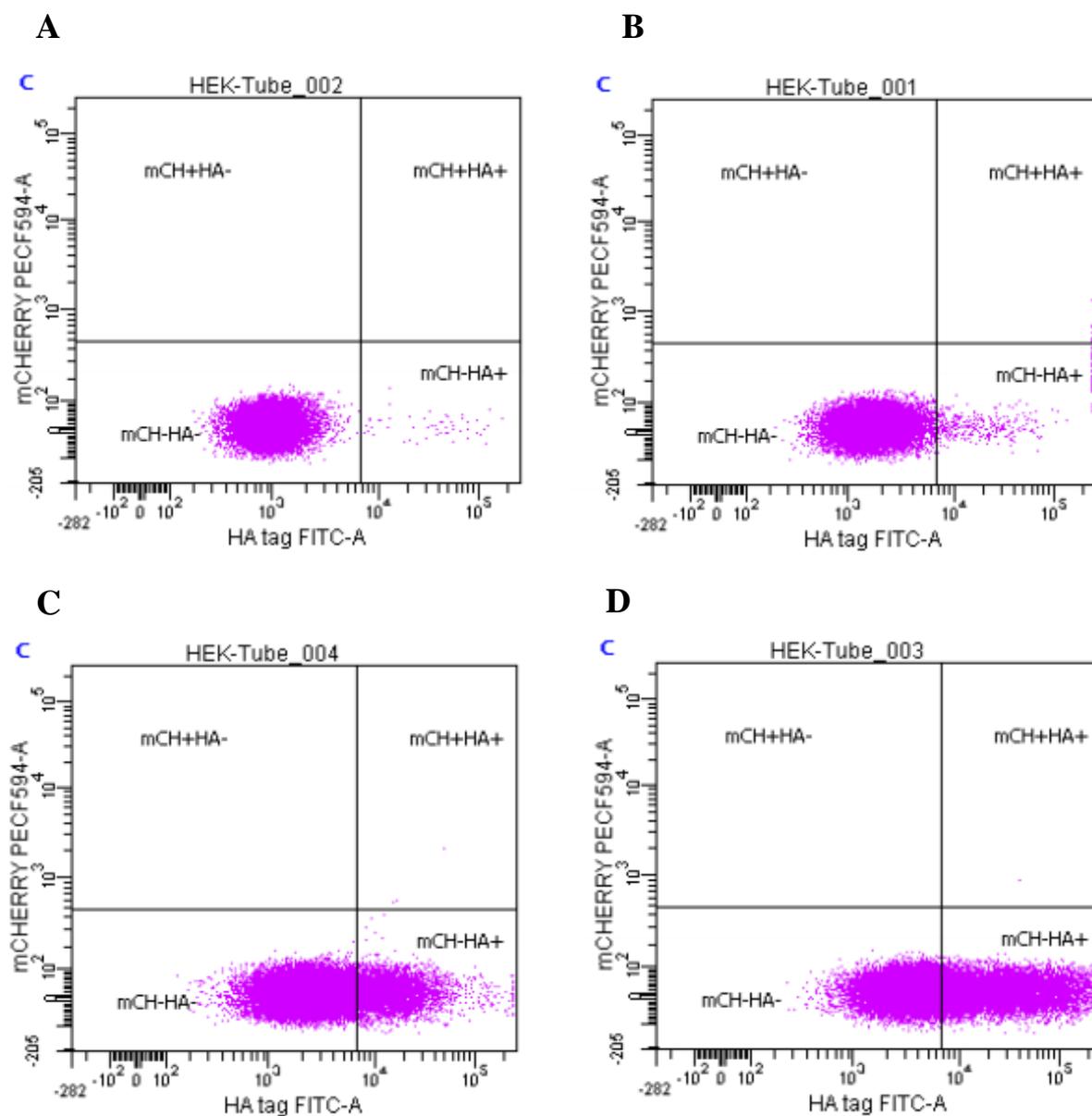
- Schattling, B., Fazeli, W., Engeland, B., Liu, Y., Lerche, H., Isbrandt, D., and Friese, M.A. (2016). Activity of NaV1.2 promotes neurodegeneration in an animal model of multiple sclerosis. *JCI Insight* 1, e89810.
- Scheffer, I.E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M.B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G.W., Moshe, S.L., Nordli, D.R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y.H., and Zuberi, S.M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 58, 512-521.
- Scheffer, I.E., and Berkovic, S.F. (1997). Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain* 120 (Pt 3), 479-490.
- Schubert, V., Auffenberg, E., Biskup, S., Jurkat-Rott, K., and Freilinger, T. (2018). Two novel families with hemiplegic migraine caused by recurrent SCN1A mutation p.F1499L. *Cephalalgia* 38, 1503-1508.
- Segall, L., Mezzetti, A., Scanzano, R., Gargus, J.J., Purisima, E., and Blostein, R. (2005). Alterations in the alpha2 isoform of Na,K-ATPase associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11106-11111.
- Selga, E., Sendfeld, F., Martinez-Moreno, R., Medine, C.N., Tura-Ceide, O., Wilmut, S.I., Perez, G.J., Scornik, F.S., Brugada, R., and Mills, N.L. (2018). Sodium channel current loss of function in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a Brugada syndrome patient. *J Mol Cell Cardiol* 114, 10-19.
- Shin, W., Kweon, H., Kang, R., Kim, D., Kim, K., Kang, M., Kim, S.Y., Hwang, S.N., Kim, J.Y., Yang, E., Kim, H., and Kim, E. (2019). Scn2a Haploinsufficiency in Mice Suppresses Hippocampal Neuronal Excitability, Excitatory Synaptic Drive, and Long-Term Potentiation, and Spatial Learning and Memory. *Front Mol Neurosci* 12, 145.
- Singh, R., Andermann, E., Whitehouse, W.P., Harvey, A.S., Keene, D.L., Seni, M.H., Crossland, K.M., Andermann, F., Berkovic, S.F., and Scheffer, I.E. (2001). Severe myoclonic epilepsy of infancy: extended spectrum of GEFS+? *Epilepsia* 42, 837-844.
- Smith, M.R., and Goldin, A.L. (1997). Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5. *Biophys J* 73, 1885-1895.
- Sohal, V.S., and Rubenstein, J.L.R. (2019). Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 24, 1248-1257.
- Sottas, V., and Abriel, H. (2016). Negative-dominance phenomenon with genetic variants of the cardiac sodium channel Nav1.5. *Biochim Biophys Acta* 1863, 1791-1798.
- Spratt, P.W.E., Ben-Shalom, R., Keeshen, C.M., Burke, K.J., Jr., Clarkson, R.L., Sanders, S.J., and Bender, K.J. (2019). The Autism-Associated Gene Scn2a Contributes to Dendritic Excitability and Synaptic Function in the Prefrontal Cortex. *Neuron* 103, 673-685 e675.
- Srinivasan, J., Schachner, M., and Catterall, W.A. (1998). Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15753-15757.
- Stuart, G., Schiller, J., and Sakmann, B. (1997). Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 505 (Pt 3), 617-632.
- Stuhmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X.D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., and Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339, 597-603.
- Subkhankulova, T., Yano, K., Robinson, H.P., and Livesey, F.J. (2010). Grouping and classifying electrophysiologically-defined classes of neocortical neurons by single cell, whole-genome expression profiling. *Front Mol Neurosci* 3, 10.

- Suddaby, J.S., Silver, J., and So, J. (2019). Understanding the schizophrenia phenotype in the first patient with the full SCN2A phenotypic spectrum. *Psychiatr Genet* 29, 91-94.
- Tarabeux, J., Champagne, N., Brustein, E., Hamdan, F.F., Gauthier, J., Lapointe, M., Maios, C., Piton, A., Spiegelman, D., Henrion, E., Synapse to Disease, T., Millet, B., Rapoport, J.L., Delisi, L.E., Joobor, R., Fathalli, F., Fombonne, E., Mottron, L., Forget-Dubois, N., Boivin, M., Michaud, J.L., Lafreniere, R.G., Drapeau, P., Krebs, M.O., and Rouleau, G.A. (2010). De novo truncating mutation in Kinesin 17 associated with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 68, 649-656.
- Tavassoli, T., Kolevzon, A., Wang, A.T., Curchack-Lichtin, J., Halpern, D., Schwartz, L., Soffes, S., Bush, L., Grodberg, D., Cai, G., and Buxbaum, J.D. (2014). De novo SCN2A splice site mutation in a boy with Autism spectrum disorder. *BMC Med Genet* 15, 35.
- Terlau, H., Heinemann, S.H., Stuhmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K., and Numa, S. (1991). Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* 293, 93-96.
- Terragni, B., Scalmani, P., Franceschetti, S., Cestele, S., and Mantegazza, M. (2018). Post-translational dysfunctions in channelopathies of the nervous system. *Neuropharmacology* 132, 31-42.
- Thompson, C.H., Ben-Shalom, R., Bender, K.J., and George, A.L. (2020). Alternative splicing potentiates dysfunction of early-onset epileptic encephalopathy SCN2A variants. *J Gen Physiol* 152.
- Thomson, A.M. (2010). Neocortical layer 6, a review. *Front Neuroanat* 4, 13.
- Tian, C., Wang, K., Ke, W., Guo, H., and Shu, Y. (2014). Molecular identity of axonal sodium channels in human cortical pyramidal cells. *Front Cell Neurosci* 8, 297.
- Vahedi, K., Depienne, C., Le Fort, D., Riant, F., Chaîne, P., Trouillard, O., Gaudric, A., Morris, M.A., Leguern, E., Tournier-Lasserre, E., and Bousser, M.G. (2009). Elicited repetitive daily blindness: a new phenotype associated with hemiplegic migraine and SCN1A mutations. *Neurology* 72, 1178-1183.
- Van Den Maagdenberg, A.M., Pietrobon, D., Pizzorusso, T., Kaja, S., Broos, L.A., Cesetti, T., Van De Ven, R.C., Tottene, A., Van Der Kaa, J., Plomp, J.J., Frants, R.R., and Ferrari, M.D. (2004). A Cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 41, 701-710.
- Vanmolkot, K.R., Babini, E., De Vries, B., Stam, A.H., Freilinger, T., Terwindt, G.M., Norris, L., Haan, J., Frants, R.R., Ramadan, N.M., Ferrari, M.D., Pusch, M., Van Den Maagdenberg, A.M., and Dichgans, M. (2007). The novel p.L1649Q mutation in the SCN1A epilepsy gene is associated with familial hemiplegic migraine: genetic and functional studies. Mutation in brief #957. Online. *Hum Mutat* 28, 522.
- Vassilev, P.M., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1988). Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 241, 1658-1661.
- Verhage, M., Maia, A.S., Plomp, J.J., Brussaard, A.B., Heeroma, J.H., Vermeer, H., Toonen, R.F., Hammer, R.E., Van Den Berg, T.K., Missler, M., Geuze, H.J., and Sudhof, T.C. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287, 864-869.
- Vilin, Y.Y., Fujimoto, E., and Ruben, P.C. (2001). A single residue differentiates between human cardiac and skeletal muscle Na⁺ channel slow inactivation. *Biophys J* 80, 2221-2230.
- Wallace, R.H., Scheffer, I.E., Barnett, S., Richards, M., Dibbens, L., Desai, R.R., Lerman-Sagie, T., Lev, D., Mazarib, A., Brand, N., Ben-Zeev, B., Goikhman, I., Singh, R., Kremmidiotis, G., Gardner, A., Sutherland, G.R., George, A.L., Jr., Mulley, J.C., and

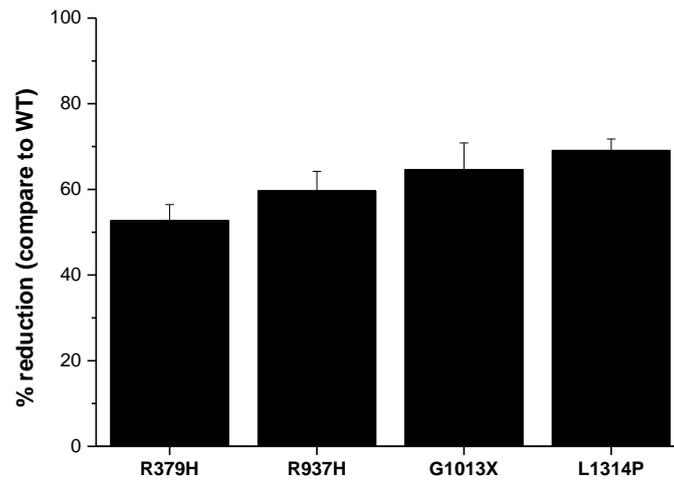
- Berkovic, S.F. (2001). Neuronal sodium-channel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet* 68, 859-865.
- Wallace, R.H., Wang, D.W., Singh, R., Scheffer, I.E., George, A.L., Jr., Phillips, H.A., Saar, K., Reis, A., Johnson, E.W., Sutherland, G.R., Berkovic, S.F., and Mulley, J.C. (1998). Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet* 19, 366-370.
- Wang, B., Ke, W., Guang, J., Chen, G., Yin, L., Deng, S., He, Q., Liu, Y., He, T., Zheng, R., Jiang, Y., Zhang, X., Li, T., Luan, G., Lu, H.D., Zhang, M., Zhang, X., and Shu, Y. (2016). Firing Frequency Maxima of Fast-Spiking Neurons in Human, Monkey, and Mouse Neocortex. *Front Cell Neurosci* 10, 239.
- Watanabe, I., Zhu, J., Recio-Pinto, E., and Thornhill, W.B. (2015). The degree of N-glycosylation affects the trafficking and cell surface expression levels of Kv1.4 potassium channels. *J Membr Biol* 248, 187-196.
- Weckhuysen, S., Mandelstam, S., Suls, A., Audenaert, D., Deconinck, T., Claes, L.R., Deprez, L., Smets, K., Hristova, D., Yordanova, I., Jordanova, A., Ceulemans, B., Jansen, A., Hasaerts, D., Roelens, F., Lagae, L., Yendle, S., Stanley, T., Heron, S.E., Mulley, J.C., Berkovic, S.F., Scheffer, I.E., and De Jonghe, P. (2012). KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* 71, 15-25.
- Weller, C.M., Pelzer, N., De Vries, B., Lopez, M.A., De Fabregues, O., Pascual, J., Arroyo, M.A., Koelewijn, S.C., Stam, A.H., Haan, J., Ferrari, M.D., Terwindt, G.M., and Van Den Maagdenberg, A.M. (2014). Two novel SCN1A mutations identified in families with familial hemiplegic migraine. *Cephalalgia* 34, 1062-1069.
- West, J.W., Patton, D.E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A.L., and Catterall, W.A. (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁽⁺⁾-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10910-10914.
- Westenbroek, R.E., Merrick, D.K., and Catterall, W.A. (1989). Differential subcellular localization of the RI and RII Na⁺ channel subtypes in central neurons. *Neuron* 3, 695-704.
- Wisedchaisri, G., Tonggu, L., Mccord, E., Gamal El-Din, T.M., Wang, L., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2019). Resting-State Structure and Gating Mechanism of a Voltage-Gated Sodium Channel. *Cell* 178, 993-1003 e1012.
- Wolff, M., Johannesen, K.M., Hedrich, U.B.S., Masnada, S., Rubboli, G., Gardella, E., Lesca, G., Ville, D., Milh, M., Villard, L., Afenjar, A., Chantot-Bastarud, S., Mignot, C., Lardennois, C., Nava, C., Schwarz, N., Gerard, M., Perrin, L., Doummar, D., Auvin, S., Miranda, M.J., Hempel, M., Brilstra, E., Knoers, N., Verbeek, N., Van Kempen, M., Braun, K.P., Mancini, G., Biskup, S., Hortnagel, K., Docker, M., Bast, T., Loddenkemper, T., Wong-Kisiel, L., Baumeister, F.M., Fazeli, W., Striano, P., Dilena, R., Fontana, E., Zara, F., Kurlmann, G., Klepper, J., Thoene, J.G., Arndt, D.H., Deconinck, N., Schmitt-Mechelke, T., Maier, O., Muhle, H., Wical, B., Finetti, C., Bruckner, R., Pietz, J., Golla, G., Jillella, D., Linnet, K.M., Charles, P., Moog, U., Oiglane-Shlik, E., Mantovani, J.F., Park, K., Deprez, M., Lederer, D., Mary, S., Scalais, E., Selim, L., Van Coster, R., Lagae, L., Nikanorova, M., Hjalgrim, H., Korenke, G.C., Trivisano, M., Specchio, N., Ceulemans, B., Dorn, T., Helbig, K.L., Hardies, K., Stamberger, H., De Jonghe, P., Weckhuysen, S., Lemke, J.R., Krageloh-Mann, I., Helbig, I., Kluger, G., Lerche, H., and Moller, R.S. (2017). Genetic and phenotypic heterogeneity suggest therapeutic implications in SCN2A-related disorders. *Brain* 140, 1316-1336.
- Wonders, C.P., and Anderson, S.A. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci* 7, 687-696.

- Wong-Kisiel, L.C., and Nickels, K. (2013). Electroencephalogram of age-dependent epileptic encephalopathies in infancy and early childhood. *Epilepsy Res Treat* 2013, 743203.
- Xiao, B., Smerdon, S.J., Jones, D.H., Dodson, G.G., Soneji, Y., Aitken, A., and Gamblin, S.J. (1995). Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* 376, 188-191.
- Xu, R., Thomas, E.A., Jenkins, M., Gazina, E.V., Chiu, C., Heron, S.E., Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., and Petrou, S. (2007). A childhood epilepsy mutation reveals a role for developmentally regulated splicing of a sodium channel. *Mol Cell Neurosci* 35, 292-301.
- Yamagata, T., Ogiwara, I., Mazaki, E., Yanagawa, Y., and Yamakawa, K. (2017). Nav1.2 is expressed in caudal ganglionic eminence-derived disinhibitory interneurons: Mutually exclusive distributions of Nav1.1 and Nav1.2. *Biochem Biophys Res Commun* 491, 1070-1076.
- Yamatogi, Y., and Ohtahara, S. (2002). Early-infantile epileptic encephalopathy with suppression-bursts, Ohtahara syndrome; its overview referring to our 16 cases. *Brain Dev* 24, 13-23.
- Yu, F.H., Mantegazza, M., Westenbroek, R.E., Robbins, C.A., Kalume, F., Burton, K.A., Spain, W.J., Mcknight, G.S., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2006). Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci* 9, 1142-1149.
- Yu, F.H., Westenbroek, R.E., Silos-Santiago, I., McCormick, K.A., Lawson, D., Ge, P., Ferriera, H., Lilly, J., Distefano, P.S., Catterall, W.A., Scheuer, T., and Curtis, R. (2003). Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci* 23, 7577-7585.

Annexes



Annexe 1 : Graphique à points des cellules tsA-201 transfectées avec le canal Nav1.2-HA (A et B) ou TREK-HA (C et D). En bas à gauche sont représentées les cellules négatives (non marquées par l'anticorps anti-HA) et en bas à droite sont représentées les cellules positives au tag HA. Dans les conditions A et C, le tag HA est marqué avec un anti-tag HA conjugué au FITC et dans les conditions B et D le tag HA est marqué avec un anti-tag HA mouse puis un anti-mouse Alexa 488.



Annexe 2 : Quantification de l'intensité de fluorescence des marquages immunocytochimiques des neurones transfectés avec les canaux R379H, R937H, G1013X ou L1314P. L'analyse a été réalisée sur Image J. L'intensité de fluorescence des canaux mutés est normalisée par rapport à l'intensité d'un marquage somato-dendritique anti-MAP2.