



HAL
open science

Corrélations génotype-phénotype dans le groupe de pathologies liées au gène SLC25A22. À partir de trois nouveaux individus et revue de la littérature

Camille Lemattre-Cenni

► **To cite this version:**

Camille Lemattre-Cenni. Corrélations génotype-phénotype dans le groupe de pathologies liées au gène SLC25A22. À partir de trois nouveaux individus et revue de la littérature. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03327315

HAL Id: dumas-03327315

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03327315>

Submitted on 27 Aug 2021

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER
FACULTE DE MEDECINE MONTPELLIER-NIMES

THESE

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par

Madame Camille LEMATTRE-CENNI

Le Jeudi 1 Juillet 2021

**Corrélations génotype-phénotype dans le groupe de pathologies
liées au gène *SLC25A22*.**

A partir de trois nouveaux individus et revue de la littérature.

Directeur de thèse : Professeur David GENEVIEVE

JURY

Président : Professeur David GENEVIEVE

Assesseurs : Professeur Michel KOENIG

Professeur Agathe ROUBERTIE

4° membre : Docteur Patricia BLANCHET

Liste du corps enseignant



ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs Honoraires

ALBAT Bernard	BRUNEL Michel	HUMEAU Claude	MIRO Luis
ALLIEU Yves	CANAUD Bernard	JAFFIOL Claude	NAVARRO Maurice
ALRIC Robert	CHAPTAL Paul-André	JANBON Charles	NAVRATIL Henri
ARNAUD Bernard	CIURANA Albert-Jean	JANBON François	OTHONIEL Jacques
ASENCIO Gérard	CLOT Jacques	JARRY Daniel	PAGES Michel
ASTRUC Jacques	COSTA Pierre	JOURDAN Jacques	PEGURET Claude
AUSSILLOUX Charles	D'ATHIS Françoise	KLEIN Bernard	PELISSIER Jacques
AVEROUS Michel	DEMAILLE Jacques	LAFFARGUE François	PETIT Pierre
AYRAL Guy	DESCOMPS Bernard	LALLEMANT Jean Gabriel	POUGET Régis
BAILLAT Xavier	DIMEGLIO Alain	LAMARQUE Jean-Louis	PUJOL Henri
BALDET Pierre	DUBOIS Jean Bernard	LAPEYRIE Henri	RABISCHONG Pierre
BALDY-MOULINIER Michel	DUJOLS Pierre	LEROUX Jean-Louis	RAMUZ Michel
BALMES Jean-Louis	DUMAS Robert	LESBROS Daniel	REBOUL Jean
BANSARD Nicole	DUMAZER Romain	LOPEZ François Michel	RIEU Daniel
BAYLET René	ECHENNE Bernard	LORiot Jean	ROCHEFORT Henri
BILLIARD Michel	FABRE Serge	LOUBATIERES Marie Madeleine	ROUANET DE VIGNE LAVIT Jean Pierre
BLARD Jean-Marie	FREREBEAU Philippe	MAGNAN DE BORNIER Bernard	SAINT AUBERT Bernard
BLAYAC Jean Pierre	GALIFER René Benoît	MARTY ANE Charles	SANCHO-GARNIER Héléne
BLOTMAN Francis	GODLEWSKI Guilhem	MARY Henri	SANY Jacques
BONNEL François	GRASSET Daniel	MATHIEU-DAUDE Pierre	SEGNARBIEUX François
BOURGEOIS Jean-Marie	GUILHOU Jean-Jacques	MEYNADIER Jean	SENAC Jean-Paul
BOUSQUET Jean	GUITER Pierre	MICHEL François-Bernard	SERRE Arlette
BRUEL Jean Michel	HEDON berbard	MION Charles	SOLASSOL Claude
BUREAU Jean-Paul	HERTAULT Jean	MION Henri	VIDAL Jacques
			VISIÉ Jean Pierre

Professeurs Emérites

ARTUS Jean-Claude	LE QUELLEC Alain
BLANC François	MARES Pierre
BONAFE Alain	MAUDELONDE Thierry
BOULENGER Jean-Philippe	MAURY Michèle
BOURREL Gérard	MESSNER Patrick
BRINGER Jacques	MILLAT Bertrand
CLAUSTRES Mireille	MONNIER Louis
DAURES Jean-Pierre	MOURAD Georges
DAUZAT Michel	PREFAUT Christian
DAVY Jean-Marc	PUJOL Rémy
DEDET Jean-Pierre	RIBSTEIN Jean
ELEDJAM Jean-Jacques	SCHVED Jean-François
GROLLEAU RAOUX Robert	SULTAN Charles
GUERRIER Bernard	TOUCHON Jacques
GUILLOT Bernard	UZIEL Alain
JONQUET Olivier	VOISIN Michel
LANDAIS Paul	ZANCA Michel
LARREY Dominique	

Docteurs Emérites

PRAT Dominique
PUJOL Joseph

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

PU-PH de classe exceptionnelle

ALRIC Pierre	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option chirurgie vasculaire)
BACCINO Eric	Médecine légale et droit de la santé
BASTIEN Patrick	Parasitologie et mycologie
BEREGI Jean-Paul	Radiologie et imagerie médicale
BLAIN Hubert	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
BOULOT Pierre	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
CAPDEVILA Xavier	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
CHAMMAS Michel	Chirurgie orthopédique et traumatologique
COLSON Pascal	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
COMBE Bernard	Rhumatologie
COSTES Valérie	Anatomie et cytologie pathologiques
COTTALORDA Jérôme	Chirurgie infantile
COUBES Philippe	Neurochirurgie
COURTET Philippe	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
CRAMPETTE Louis	Oto-rhino-laryngologie
CRISTOL Jean Paul	Biochimie et biologie moléculaire
CYTEVAL Catherine	Radiologie et imagerie médicale
DE LA COUSSAYE Jean Emmanuel	Médecine d'urgence
DE WAZIERES Benoît	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
DELAPORTE Eric	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
DEMOLY Pascal	Pneumologie ; addictologie
DOMERGUE Jacques	Chirurgie viscérale et digestive

DUFFAU Hugues	Neurochirurgie
ELIAOU Jean François	Immunologie
FABRE Jean Michel	Chirurgie viscérale et digestive
FRAPIER Jean-Marc	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
HAMAMAH Samir	Biologie et Médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
HERISSON Christian	Médecine physique et de réadaptation
JABER Samir	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
JEANDEL Claude	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
JORGENSEN Christian	Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie
KOTZKI Pierre Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
LABAUGE Pierre	Neurologie
LEFRANT Jean-Yves	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
LEHMANN Sylvain	Biochimie et biologie moléculaire
LUMBROSO Serge	Biochimie et Biologie moléculaire
MERCIER Jacques	Physiologie
MEUNIER Laurent	Dermato-vénéréologie
MONDAIN Michel	Oto-rhino-laryngologie
MORIN Denis	Pédiatrie
PAGEAUX Georges-Philippe	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PUJOL Pascal	Biologie cellulaire
QUERE Isabelle	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option médecine vasculaire)
RENARD Eric	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale
REYNES Jacques	Maladies infectieuses, maladies tropicales
RIPART Jacques	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
ROUANET Philippe	Cancérologie ; radiothérapie
SOTTO Albert	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
TAOUREL Patrice	Radiologie et imagerie médicale

TOUITOU Isabelle	Génétique
VANDE PERRE Philippe	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
YCHOU Marc	Cancérologie ; radiothérapie

PU-PH de 1^{re} classe

AGUILAR MARTINEZ Patricia	Hématologie ; transfusion
ASSENAT Éric	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
AVIGNON Antoine	Nutrition
AZRIA David	Cancérologie ; radiothérapie
BAGHDADLI Amaria	Pédopsychiatrie ; addictologie
BLANC Pierre	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
BORIE Frédéric	Chirurgie viscérale et digestive
BOURDIN Arnaud	Pneumologie ; addictologie
CAMBONIE Gilles	Pédiatrie
CAMU William	Neurologie
CANOVAS François	Anatomie
CAPTIER Guillaume	Anatomie
CARTRON Guillaume	Hématologie ; transfusion
CAYLA Guillaume	Cardiologie
CHANQUES Gérald	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
CORBEAU Pierre	Immunologie
COULET Bertrand	Chirurgie orthopédique et traumatologique
CUVILLON Philippe	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
DADURE Christophe	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
DAUVILLIERS Yves	Physiologie
DE TAYRAC Renaud	Gynécologie-obstétrique, gynécologie médicale
DE VOS John	Histologie, embryologie et cytogénétique

DEMARIA Roland	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
DEREURE Olivier	Dermatologie - vénéréologie
DROUPY Stéphane	Urologie
DUCROS Anne	Neurologie
DUPEYRON Arnaud	Médecine physique et de réadaptation
FESLER Pierre	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
GARREL Renaud	Oto-rhino-laryngologie
GENEVIEVE David	Génétique
GUILLAUME Sébastien	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
GUIU Boris	Radiologie et imagerie médicale
HAYOT Maurice	Physiologie
HOUEDE Nadine	Cancérologie ; radiothérapie
KLOUCHE Kada	Médecine intensive-réanimation
KOENIG Michel	Génétique
KOUYOUMDJIAN Pascal	Chirurgie orthopédique et traumatologique
LAFFONT Isabelle	Médecine physique et de réadaptation
LAVABRE-BERTRAND Thierry	Histologie, embryologie et cytogénétique
LAVIGNE Jean-Philippe	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
LE MOING Vincent	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
LECLERCQ Florence	Cardiologie
MARIANO-GOULART Denis	Biophysique et médecine nucléaire
MATECKI Stéfan	Physiologie
MORANNE Olivier	Néphrologie
MOREL Jacques	Rhumatologie
NAVARRO Francis	Chirurgie viscérale et digestive
NOCCA David	Chirurgie viscérale et digestive
PASQUIE Jean-Luc	Cardiologie

PERNEY Pascal	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
PRUDHOMME Michel	Anatomie
PUJOL Jean Louis	Pneumologie ; addictologie
PURPER-OUAKIL Diane	Pédopsychiatrie ; addictologie
ROGER Pascal	Anatomie et cytologie pathologiques
TRAN Tu-Anh	Pédiatrie
VERNHET Héléne	Radiologie et imagerie médicale

PU-PH de 2ème classe

BOURGIER Céline	Cancérologie; radiothérapie
CANAUD Ludovic	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option chirurgie vasculaire)
CAPDEVIELLE Delphine	Psychiatrie d'Adultes ; addictologie
CLARET Pierre-Géraud	Médecine d'urgence
COLOMBO Pierre-Emmanuel	Cancérologie ; radiothérapie
COSTALAT Vincent	Radiologie et imagerie médicale
DAIEN Vincent	Ophthalmologie
DORANDEU Anne	Médecine légale et droit de la santé
FAILLIE Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
FUCHS Florent	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
GABELLE DELOUSTAL Audrey	Neurologie
GAUJOUX Viala Cécile	Rhumatologie
GODREUIL Sylvain	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
GUILPAIN Philippe	Médecine Interne, gériatrie et biologie du vieillissement; addictologie
HERLIN Christian	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brulologie
IMMEDIATO DAIEN Claire	Rhumatologie
JACOT William	Cancérologie ; Radiothérapie
JEZIORSKI Eric	Pédiatrie

JUNG Boris	Médecine intensive-réanimation
KALFA Nicolas	Chirurgie infantile
LACHAUD Laurence	Parasitologie et mycologie
LALLEMANT Benjamin	Oto-rhino-laryngologie
LE QUINTREC DONNETTE Moglie	Néphrologie
LETOUZEY Vincent	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
LONJON Nicolas	Neurochirurgie
LOPEZ CASTROMAN Jorge	Psychiatrie d'Adultes ; addictologie
LUKAS Cédric	Rhumatologie
MENJOT de CHAMPFLEUR Nicolas	Radiologie et imagerie médicale
MILLET Ingrid	Radiologie et imagerie médicale
MURA Thibault	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication
NAGOT Nicolas	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication
OLIE Emilie	Psychiatrie d'adultes; addictologie
PANARO Fabrizio	Chirurgie viscérale et digestive
PARIS Françoise	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PELLESTOR Franck	Histologie, embryologie et cytogénétique
PEREZ MARTIN Antonia	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option médecine vasculaire)
POUDEROUX Philippe	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
RIGAU Valérie	Anatomie et cytologie pathologiques
RIVIER François	Pédiatrie
ROSSI Jean François	Hématologie ; transfusion
ROUBILLE François	Cardiologie
SEBBANE Mustapha	Médecine d'urgence
SIRVENT Nicolas	Pédiatrie
SOLASSOL Jérôme	Biologie cellulaire
STOEBNER Pierre	Dermato-vénéréologie



SULTAN Ariane	Nutrition
THOUVENOT Éric	Neurologie
THURET Rodolphe	Urologie
TUAILLON Edouard	Bactériologie-virologie; hygiène hospitalière
VENAIL Frédéric	Oto-rhino-laryngologie
VILLAIN Max	Ophtalmologie
VINCENT Denis	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
VINCENT Thierry	Immunologie
WOJTUSCISZYN Anne	Endocrinologie-diabétologie-nutrition

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

1^{re} classe :

COLINGE Jacques (Cancérologie, Signalisation cellulaire et systèmes complexes)

LAOUDJ CHENIVESSE Dalila (Biochimie et biologie moléculaire)

VISIER Laurent (Sociologie, démographie)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - Médecine générale

1^{re} classe :

LAMBERT Philippe

AMOUYAL Michel

PROFESSEURS ASSOCIES - Médecine Générale

CLARY Bernard

DAVID Michel

GARCIA Marc



PROFESSEURS ASSOCIES - Médecine

BESSIS Didier (Dermato-vénérologie)

MEUNIER Isabelle (Ophtalmologie)

MULLER Laurent (Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire)

PERRIGAULT Pierre-François (Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire)

QUANTIN Xavier (Pneumologie)

ROUBERTIE Agathe (Pédiatrie)

VIEL Eric (Soins palliatifs et traitement de la douleur)

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021

PERSONNEL ENSEIGNANT

Maîtres de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers

MCU-PH Hors classe - Echelon Exceptionnel

RICHARD Bruno	Médecine palliative
SEGONDY Michel	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

MCU-PH Hors classe

BADIOU Stéphanie	Biochimie et biologie moléculaire
BOULLE Nathalie	Biologie cellulaire
CACHEUX-RATABOUL Valère	Génétique
CARRIERE Christian	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
CHARACHON Sylvie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
FABBRO-PERAY Pascale	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
GIANSILY-BLAIZOT Muriel	Hématologie ; transfusion

MCU-PH de 1^{re} classe

BERTRAND Martin	Anatomie
BOUDOUSQ Vincent	Biophysique et médecine nucléaire
BRET Caroline	Hématologie biologique
BROUILLET Sophie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
COSSEE Mireille	Génétique
GIRARDET-BESSIS Anne	Biochimie et biologie moléculaire
LAVIGNE Géraldine	Hématologie ; transfusion
LESAGE François-Xavier	Médecine et Santé au Travail
MARTRILLE Laurent	Médecine légale et droit de la santé
MATHIEU Olivier	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie

MOUZAT Kévin Biochimie et biologie moléculaire

PANABIÈRES Catherine Biologie cellulaire

RAVEL Christophe Parasitologie et mycologie

SCHUSTER-BECK Iris Physiologie

STERKERS Yvon Parasitologie et mycologie

THEVENIN-RENE Céline Immunologie

MCU-PH de 2^{ème} classe

BERGOUX Anne Génétique

CHIRIAC Anca Immunologie

DE JONG Audrey Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire

DU THANH Aurélie Dermato-vénéréologie

FITENI Frédéric Cancérologie ; radiothérapie

GOUZI Farès Physiologie

HERRERO Astrid Chirurgie viscérale et digestive

HUBERLANT Stéphanie Gynécologie-obstétrique ; Gynécologie médicale

KUSTER Nils Biochimie et biologie moléculaire

MAKINSON Alain Maladies infectieuses, Maladies tropicales

PANTEL Alix Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

PERS Yves-Marie Thérapeutique; addictologie

ROUBILLE Camille Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie

SZABLEWSKY Anatomie et cytologie pathologiques



Maîtres de Conférences des Universités - Médecine Générale

MCU-MG de 1^{re} classe

COSTA David

OUDE ENGBERINK Agnès

MCU-MG de 2^{ème} classe

FOLCO-LOGNOS Béatrice

CARBONNEL François

Maîtres de Conférences associés - Médecine Générale

CAMPAGNAC Jérômes

LOPEZ Antonio

MILLION Elodie

PAVAGEAU Sylvain

REBOUL Marie-Catherine

SERAYET Philippe

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021

PERSONNEL ENSEIGNANT

Maitres de Conférences des Universités

Maitres de Conférences hors classe

BADIA Eric	Sciences biologiques fondamentales et cliniques
CHAZAL Nathalie	Biologie cellulaire

Maitres de Conférences de classe normale

BECAMEL Carine	Neurosciences
BERNEX Florence	Physiologie
CHAUMONT-DUBEL Séverine	Sciences du médicament et des autres produits de santé
DELABY Constance	Biochimie et biologie moléculaire
GUGLIELMI Laurence	Sciences biologiques fondamentales et cliniques
HENRY Laurent	Sciences biologiques fondamentales et cliniques
HERBET Guillaume	Neurosciences
LADRET Véronique	Mathématiques appliquées et applications des mathématiques
LAINE Sébastien	Sciences du Médicament et autres produits de santé
LE GALLIC Lionel	Sciences du médicament et autres produits de santé
LOZZA Catherine	Sciences physico-chimiques et technologies pharmaceutiques
MAIMOUN Laurent	Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé
MOREAUX Jérôme	Science biologiques, fondamentales et cliniques
MORITZ-GASSER Sylvie	Neurosciences
MOUTOT Gilles	Philosophie
PASSERIEUX Emilie	Physiologie
RAMIREZ Jean-Marie	Histologie
RAYNAUD Fabrice	Sciences du Médicament et autres produits de santé
TAULAN Magali	Biologie Cellulaire

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021

PERSONNEL ENSEIGNANT

PH chargés d'enseignements

ABOUKRAT Patrick	BLANCHET Catherine	COROIAN Flavia-Oana	GINIES Patrick
AKKARI Mohamed	BLATIERE Véronique	COUDRAY Sarah	GRECO Frédéric
ALRIC Jérôme	BOBBIA Xavier	CRANSAC Frédéric	GUEDJ Anne Marie
AMEDRO Pascal	BOGE Gudrun	CUNTZ Danielle	GUYON Gaël
AMOUREUX Cyril	BOURRAIN Jean Luc	DARDALHON Brigitte	HENRY Vincent
ANTOINE Valéry	BOUYABRINE Hassan	DAVID Aurore	JAMMET Patrick
ARQUIZAN Caroline	BRINGER-DEUTSCH Sophie	DE BOUTRAY Marie	JEDRYKA François
ATTALIN Vincent	BRINGUIER BRANCHEREAU Sophie	DE LA TRIBONNIÈRE Xavier	JREIGE Riad
AYRIGNAC Xavier	BRISOT Dominique	DEBIEN Blaise	KINNE Mélanie
BADR Maliha	BRONER Jonathan	DELPONT Marion	LABARIAS Coralie
BAIS Céline	CADE Stéphane	DENIS Hélène	LACAMBRE Mathieu
BARBAR Saber Davide	CAIMMI Davide Paolo	DEVILLE de PERIERE Gilles	LANG Philippe
BASSET Didier	CARR Julie	DJANIKIAN Flora	LAZERGES Cyril
BATIFOL Dominique	CARTIER César	DONNADIEU-RIGOLE Hélène	LE GUILLOU Cédric
BATTISTELLA Pascal	CASPER Thierry	FAIDHERBE Jacques	LEGLISE Marie Suzanne
BAUCHET Luc	CASSINOTTO Christophe	FATTON Brigitte	LOPEZ Régis
BENEZECH Jean-Pierre	CATHALA Philippe	FAUCHERRE Vincent	LUQUIENS Amandine
BENNYS Karim	CAZABAN Michel	FILLERON Anne	MANZANERA Cyril
BERNARD Nathalie	CHARBIT Jonathan	FITENI Frédéric	MARGUERITTE Emmanuel
BERTCHANSKY Ivan	CHEVALLIER Thierry	FOURNIER Philippe	MARTIN Lucille
BIBOULET Philippe	CHEVALLIER-MICHAUD Josyane	GAILLARD Nicolas	MATTATIA Laurent
BIRON-ANDREANI Christine	COLIN Olivier	GALMICHE Sophie	MEROUEH Fadi
BLANC Brigitte	CONSEIL Mathieu	GENY Christian	MEYER Pierre
BLANCHARD Sylvie	CORBEAU Catherine	GERONIMI Laetitia	MILESI Christophe



MORAU Estelle	SEGURET Fabienne
MOSER Camille	SENESSE Pierre
MOUSTY Eve	SKALLI El Medhi
MOUTERDE Gaël	SOLA Christelle
PANSARD Nicole	SOULLIER Camille
PERNIN Vincent	STOEBNER DELBARRE Anne
PERRIGAULT Pierre François	TEOT Luc
PEYRON Pierre-Antoine	THIRION Marina
PICARD Eric	VACHIERY-LAHAYE Florence
PICOT Marie Christine	VERNES Eric
PIERONI Laurence	VINCENT Laure
POQUET Hélène	WAGNER Laurent
PUJOL Sarah-Lise	ZERKOWSKI Laetitia
PUPIER Florence	
QUANTIN Xavier	
RAFFARD Laurence	
RAPIDO Francesca	
RIBRAULT Alice	
RICHAUD-MOREL Brigitte	
RIDOLFO Jérôme	
RIPART Sylvie	
RONGIERES Michel	
ROULET Agnès	
RUBENOVITCH Josh	
SANTONI Fannie	
SASSO Milène	
SCHULDINER Sophie	

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021

PERSONNEL ENSEIGNANT

Praticiens Hospitaliers Universitaires

BARATEAU Lucie	Physiologie
BASTIDE Sophie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
CAZAUBON Yoann	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
DAGNEAUX Louis	Chirurgie orthopédique et traumatologique
DUFLOS Claire	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication
GOULABCHAND Radjiv	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
LATTUCA Benoit	Cardiologie
MARIA Alexandre	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
MIOT Stéphanie	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
SARRABAY Guillaume	Génétique
SOUCHE François-Régis	Chirurgie viscérale et digestive

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier très chaleureusement les enfants et leurs parents, qui m'ont permis de réaliser ce travail de thèse.

Ce travail ayant fait l'objet d'une publication dans l'European Journal of Human Genetics, je remercie également toutes les personnes qui ont participé à la publication de cet article.

A mes maîtres

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, président du jury, et surtout mentor depuis plusieurs années : le Professeur David GENEVIEVE. Tu m'as proposé ce sujet et tu m'as accompagnée et soutenue tout au long de la réalisation de ce projet. Mais surtout, tu m'as accompagnée depuis mon arrivée à Montpellier en novembre 2016 et durant l'ensemble de mon internat. Merci pour ton soutien et ton engagement au quotidien auprès de nous, les internes, pour nous offrir une formation de qualité.

Je tiens également à exprimer ma gratitude au Professeur Michel KOENIG. Vous me faites l'honneur de participer à mon jury de thèse, mais surtout, vous m'avez accueillie pour un semestre, et offert l'opportunité de réaliser mon stage de Master 2 dans votre laboratoire de Génétique Moléculaire.

Ces remerciements s'adressent également au Professeur Agathe ROUBERTIE, qui me fait l'honneur d'évaluer cette thèse. Merci pour ton accueil, ta bienveillance, tes conseils et ton aide dans la rédaction de l'article qui a conduit à cette thèse.

Enfin, au dernier membre de ce jury, le Docteur Patricia BLANCHET. Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et surtout merci infiniment pour ton aide, ta gentillesse et ta bonne humeur au quotidien.

A toute la Génétique du Languedoc Roussillon et d'ailleurs

En commençant par le service de génétique clinique du CHU de Montpellier, qui m'a accueillie pour mes débuts dans le vaste monde de la génétique. Merci à toute l'équipe médicale (Christine, Emmanuelle, Lucile, Marjolaine et Jacques), à notre super équipe de secrétaires (Stéphanie, Valérie et Bénédicte), à nos infirmières-puéricultrices en or (Nelly, Nathalie et Christiane) et à notre cellule psychologique (Claire, Natacha et Yann). Merci pour votre accueil, votre bienveillance et votre expérience qui a conforté mon choix de cette spécialité si particulière et si passionnante.

Je n'oublie pas, bien évidemment, nos amis et voisins du service d'oncogénétique, le Professeur Pascal PUJOL et toute son équipe : Chloé, Corine, Isabelle, Karen, Tatiana, Virginie, Nathalie.

Je voudrais également remercier très chaleureusement toute l'équipe de génétique gardoise, Philippe, Jean et Yuliya, pour votre expérience et surtout votre confiance qui m'a permis d'effectuer mes premières consultations en solo.

Après la clinique, le labo. Et même les labos. Et je commencerai par le « Château » et ses formidables équipes de génétique moléculaire. Tout d'abord, l'équipe « muco » : Caroline, Jessica, Magali, Sou, JP, Fanny, Corinne et surtout Anne. Merci de m'avoir accueillie dans votre bureau, de m'avoir proposé un sujet de recherche hyper intéressant qui m'a permis de me

familiariser avec l'analyse de VCF, mais aussi de cet après-midi barbecue au bord de la piscine, au pied du Pic St-Loup !

Puis j'ai intégré l'équipe « neurosensoriel » : Anne-Françoise (merci infiniment pour ta patience, ta disponibilité et ton soutien dans mon travail de master), Valérie, Corinne, Mélody, Christel et David (un merci spécial pour ta patience à répondre à mes innombrables questions concernant la bio-informatique ou l'informatique tout court !).

Merci également à la super équipe du chromosomique : Franck, Anouck, Marie-Laure, Thomas, Magali (toutes les deux), Aurélie, Elodie (toutes les deux aussi), Jennifer, Marie, Marie-Claude, Patricia, Pauline, Stéphanie et Sylvie. Je tiens à vous faire un remerciement spécial, Jean-Baptiste et Vincent, pour votre encadrement au top durant ce semestre, pour les nombreuses séances de découpage et classement des chromosomes, pour votre patience à corriger mes (nombreuses) erreurs et surtout pour votre bonne humeur qui m'a (presque) fait aimer les caryotypes !

Et enfin, un remerciement tout particulier à toi, Muriel, et à toute ton équipe d'Outre-Manche, pour ce semestre passé loin de chez moi, à approfondir mes connaissances autant en génétique qu'en anglais.

Et parce qu'il n'y a pas que la Génétique dans la vie

Isabelle et Catherine, merci de m'avoir permis d'améliorer mes connaissances des pathologies neurosensorielles.

A la formidable équipe du CAMSP de St-Eloi : Hubert, Nathalie S. et Nathalie BJ., Claudine, Lucette, Aurélie, Bérénice, Mariama, Nadège, Lucie, Valérie, Monique, Mathieu, Nadia, Karine, Linda, Denisa et Sylvie. Un immense merci pour votre accueil, ces 4 mois sont

passés très vite mais j'ai appris tellement de choses sur le développement de l'enfant. Cette expérience me servira énormément, t'en sur le plan professionnel que personnel !

A ma famille de la Génétique

Il fallait bien un paragraphe spécial pour vous, Marion, Carole, Kévin et Vincent. Vous qui m'avez accueillie dans votre équipe d'escape-gameur, puis pour le traditionnel burger&beer de Noël. Puis Constance, Mylène, Caroline, Valentin et Flavien sont venus agrandir cette famille Montpelliéraine, et avec eux toujours plus d'apéro, de rando et de canoë.

Et parce que la famille de la Génétique n'est pas que Montpelliéraine, un grand merci également à tous ceux de la SIGF, d'égayer les 3^o jeudis, les journées de cours à Paris et à Nantes et surtout les soirées gala des congrès : Pauline, Audrey, Julie, Maude, Louise, Marine, Simon, Geoffroy et tous les autres...

Aux co-internes de quelques mois

Merci à vous, mes co-internes, avec qui j'ai partagé, un placard pour certains et un couloir pour d'autres. Sophie et Benjamin, merci d'avoir découvert toute l'étendue de la génétique clinique avec moi, durant un semestre de franche rigolade. Et Vincent, les burgers du food-truck (et les remontrances de Valérie sur la qualité de mon régime alimentaire de femme enceinte) vont me manquer !

A mes amis non-généralistes (ils vous faut bien un défaut !)

Merci à vous les filles, Julie, Maryse et Mathilde. Sans vous, ma D4 aurait été bien triste et le Crous n'a sans doute jamais autant vendu de gaufres au Nutella que cette année-là ! Heureusement depuis, nos escapades aux 4 coins de la France et de l'Europe ont remplacé les souvenirs de nos journées studieuses dans la BU lyonnaise.

Merci à toi, ma Clem, et toi, ma Caro, mes colocos d'Eric Delou. Merci pour votre bonne humeur, pour avoir égayé mes premières soirées Montpelliéraines loin de mon chéri, en jouant au Ligretto. Que de bons souvenirs de ce premier semestre où l'on a tissé les liens d'une amitié durable.

A ma famille

Papa, Maman, je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait et faites toujours pour moi, pour nous. Je n'aurais pas pu rêver parents plus extraordinaires.

Et même si avoir 3 frères et sœur, ce n'est pas toujours une partie de plaisir, ça a aussi de très bons côtés ! Et je ne serai pas celle que je suis aujourd'hui sans vous 3.

Merci également à vous, mes grands-parents adorés. J'ai découvert et fait tellement de choses à vos côtés !

Philippe, Valérie, merci infiniment. Vous m'avez accueillie dans votre famille comme votre fille et je mesure pleinement la chance que j'ai d'avoir des beaux-parents tels que vous.

Et enfin, je finis par toi, mon amour, la personne la plus importante de ma vie. Merci est un mot trop faible pour exprimer tout ce que je te dois. Tu as toujours été là dans les moments difficiles, tu m'as soutenue, tu as cru en moi et tu m'as poussée à ne jamais baisser les bras et

à concrétiser mes rêves (malgré les contraintes que ça engendrait pour notre vie à deux). Et maintenant, tu m'as offert le plus beau des cadeaux : la première merveille de notre monde.

Table des matières

Glossaire	27
Liste des Tableaux	28
Liste des Figures	29
I.Introduction :	31
A. L'encéphalopathie épileptique infantile précoce	31
B. L'EEIP de type 3	33
1. Signes cliniques	33
2. Signes paracliniques	33
a) L'électroencéphalogramme	33
b) L'imagerie cérébrale	34
c) L'électrorétinogramme et les potentiels évoqués visuels	35
d) Le pronostic	35
e) Epidémiologie	36
f) Etiologie génétique monogénique	36
C. L'épilepsie infantile avec crises épileptiques focales migrantes	36
D. Description du gène <i>SLC25A22</i>	38
II.Matériels et Méthodes	43
A. Identification de trois enfants supplémentaires	43
1. Ethique et consentement	43
2. Identification des variations génétiques	43
a) Séquençage de l'exome (CNRGH)	43
b) Séquençage Sanger (Elodie Sanchez, Inserm, Montpellier)	44
c) Etudes fonctionnelles : activités enzymatiques et de respiration cellulaire (Pierre Rustin, Inserm, Robert Debré)	44
B. Constitution de la série pour l'étude de corrélation génotype-phénotype	45
III.Résultats	46
A. Données cliniques des trois enfants de Montpellier	46
1. Première enfant	46
2. Deuxième enfant	48
3. Troisième enfant	49
B. Résultat des analyses génétiques	51
C. Résultats des analyses fonctionnelles	55
D. Résultats des analyses de corrélation génotype-phénotype	56
	25

1. La série	56
2. Les analyses de corrélation génotype-phénotype	60
IV.Discussion	63
A. Remarques générales	63
B. Plusieurs hypothèses existent concernant la physiopathologie	64
C. Impact des examens et résultats génétiques pour les enfants et leurs familles	67
D. Importance et limite de l'identification d'une corrélation génotype-phénotype	67
V.Conclusion	69
VI.Bibliographie	70
VII.Annexes	73
A. Annexe 1 : Liste des sous-types d'EEIP classés en fonction du gène impliqué.	73
B. Annexe 2 : Visualisation 3D de la position des variants étudiés au sein de la protéine SLC25A22	76
C. Annexe 3 : Critères permettant le classement de variation génomique selon l'ACMG.	79
D. Annexe 4 : Article publié dans l'European Journal of Human Genetics	81
Serment	90
Résumé	91
Mots clés	91

Glossaire

ACMG : American College of Medical Genetic

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AR : Autosomique Récessif

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

Cm : centimètre

CNRGH : Centre National de Recherche en Génétique Humaine

DPI : Diagnostic Pré-Implantatoire

DPN : Diagnostic Pré-Natal

EEG : Electroencéphalogramme

EEIP : Encéphalopathie épileptique infantile précoce

EIMFS : Epilepsie infantile avec crises épileptiques focales migrantes

ERG : Electrorétinogramme

gnomAD : Genome Aggregation Database

IGV : Integrative Genomics Viewer

IRM : Imagerie par résonance magnétique

Kg : kilogramme

NFS : Numération formule sanguine

OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man

PEV : Potentiel évoqué visuel

PC : Périmètre crânien

PCN : Périmètre crânien de naissance

PN : Poids de naissance

SB : Suppression burst

TBOA : Threo-beta-benzyloxyaspartate

TN : Taille de naissance

Liste des Tableaux

Table 1 : Récapitulatif des données concernant les deux variants retrouvés dans la famille étudiée.

Table 2 : Description phénotypique des 3 groupes d'individus présentant des anomalies dans le gène *SLC25A22*.

Table 3 : Données cliniques des individus portant des variants dans le gène *SLC25A22* et un phénotype d'EEIP, incluant les individus précédemment publiés.

Table 4 : Classification de pathogénicité des variants selon les critères de l'ACMG.

Liste des Figures

Figure 1 : EEG avec « Suppression Burst ». Pointes ondes de fortes amplitudes alternant avec des phases de faible voltage.

Figure 2 : IRM cérébrale d'un enfant de 2 ans et 10 mois, présentant une hypoplasie/atrophie du cortex fronto-temporal. Coupe axiale, séquence T2.

Figure 3 : IRM cérébrale d'un enfant de 2 ans et 10 mois, présentant un splenium du corps calleux de petite taille. Coupe sagittale, séquence T1.

Figure 4 : EEG mettant en évidence une épilepsie partielle migrante de l'enfant avec des pointes-ondes localisées en héli-corporel.

Figure 5 : Schématisation du chromosome 11, présence du gène *SLC25A22* en position 11p15.5.

Figure 6 : Schématisation 3D de la protéine *SLC25A22*. A : visualisation vue du dessus, à travers le canal. B : visualisation vue de côté.

Figure 7 : Expression du gène *SLC25A22* dans du tissu de cerveau foetal humain de 15 semaines (A à F) et de 20 semaines (G à L).

Figure 8 : Schématisation de la localisation du transporteur glutamate/H⁺ et glutamate/aspartate au niveau de la membrane de la mitochondrie.

Figure 9 : IRM cérébrale de la première enfant de notre famille, en coupe axiale et en séquence T2 et T2 Flair.

Figure 10 : Arbre généalogique de la famille étudiée. Les flèches noires désignent les individus analysés par séquençage de l'exome.

Figure 11 : Capture d'écran du logiciel IGV permettant la visualisation des deux variants présents sur les différents allèles des individus étudiés.

Figure 12 : Visualisation de la conservation à travers les espèces, de l'Alanine en position 272 de la protéine *SLC25A22*.

Figure 13 : Visualisation de la conservation à travers les espèces, de l'Arginine en position 273 de la protéine SLC25A22.

Figure 14 : Etude de l'oxydation du glutamate pour la respiration cellulaire à travers la consommation d'O² par la cellule, réalisée sur des cellules épithéliales du troisième enfant.

Figure 15 : Visualisation de la localisation des variants au niveau du gène (A) et de la protéine SLC25A22 (B).

Figure 16 : Métabolisme de la mitochondrie et canaux mitochondriaux.

I. Introduction :

A. L'encéphalopathie épileptique infantile précoce

L'encéphalopathie épileptique infantile précoce (EEIP, OMIM #308350, ORPHA:1934) est un large groupe de maladies comprenant les formes les plus sévères d'encéphalopathies épileptiques de début précoces et entraînant un retard de développement.

L'incidence annuelle a été estimée à 1/50 000 naissances au Royaume-Uni (Orphanet : Encéphalopathie épileptique infantile précoce).

Les signes cliniques peuvent être :

- un mauvais réflexe de succion,
- une hypotonie généralisée,
- des spasmes toniques généralisés et symétriques, pouvant apparaître en groupe ou de manière isolée, et pouvant durer jusqu'à dix secondes.

Ces crises épileptiques myocloniques sont habituellement réfractaires aux traitements et débutent durant les trois premiers mois de vie, mais parfois très tôt, au cours des premières semaines après la naissance. Le schéma de ces spasmes reste inchangé au cours de l'éveil et du sommeil, et ils peuvent survenir des centaines de fois par jour. D'autres types de crises sont observées dans un tiers des cas, incluant des crises tonico-cloniques généralisées (Ohtahara et al, 2003).

Chez certains patients, l'EEIP peut évoluer vers un syndrome de West (entre l'âge de deux et six mois), et plus tard, vers un syndrome de Lennox-Gastaut. Certaines formes génétiques se

manifestent par des signes additionnels tels que des mouvements dyskinésiques ou des mouvements stéréotypés ressemblant au syndrome de Rett (d'où le nom de syndrome de Rett atypique).

Le pronostic est habituellement péjoratif et la plupart des enfants décèdent durant les deux premières années de vie (50% des situations) ou survivent avec une déficience intellectuelle très sévère (Ohtahara et al, 2003).

Le diagnostic d'EEIP repose sur les données cliniques et électroencéphalographiques. L'électroencéphalogramme (EEG) inter-critique caractéristique révèle un tracé de type « suppression-burst » (en lien avec l'apparition des spasmes, cf EEIP de type 3, partie L'électroencéphalogramme). Ce schéma d'EEG est continu et reste inchangé pendant les phases d'éveil et de sommeil. Des anomalies structurales sont souvent révélées à l'imagerie cérébrale.

Les diagnostics différentiels incluent d'autres encéphalopathies épileptiques, telles que l'encéphalopathie myoclonique précoce ou le syndrome de West.

Il existe environ 90 types d'EEIP, classés en fonction du gène impliqué (Annexe 1). Il n'est pas possible de déterminer précisément le sous-type d'EEIP par les données cliniques.

B. L'EEIP de type 3

L'EEIP de type 3 correspond à un sous-type d'EEIP et est liée au gène *SLC25A22*.

1. Signes cliniques

L'EEIP de type 3 est caractérisée par des crises épileptiques de type myocloniques ou cloniques, réfractaires au traitement, une hypotonie sévère globale et néonatale, une microcéphalie progressive, une spasticité et un retard de développement global sévère, évoluant vers une encéphalopathie précoce. Ici, les crises épileptiques débutent très tôt, dans les premières heures ou jours de vie.

2. Signes paracliniques

a) L'électroencéphalogramme

Dans l'EEIP de type 3, l'EEG inter-critique est caractéristique et montre un pattern de « suppression burst » (SB) avec des bouffées d'ondes lentes mélangées à des pointes multifocales de forte amplitude, en alternance avec des phases de rythme basique de faible voltage (suppression) (Figure 1).

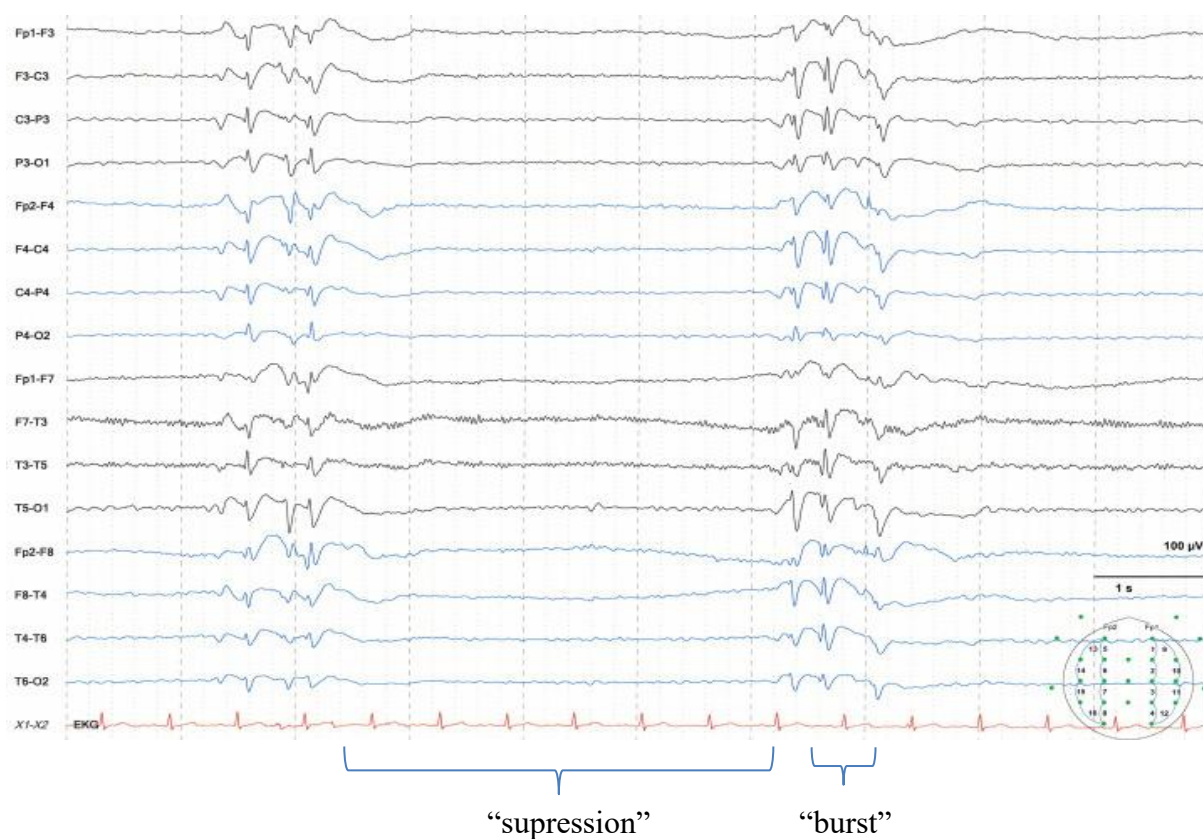


Figure 1 : EEG avec « Suppression Burst ». Pointes ondes de fortes amplitudes alternant avec des phases de faible voltage.

(Source : <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/burst-suppression>)

b) L'imagerie cérébrale

L'imagerie cérébrale montre un retard de myélinisation précoce suivie d'une atrophie cérébrale (Figure 2). Des anomalies morphologiques peuvent être décrites, telles qu'une anomalie morphologique du corps calleux ou une anomalie de la giration des régions temporo-pariétales (Figure 3).

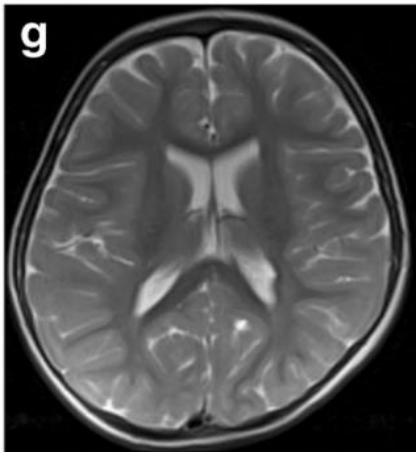


Figure 2 : IRM cérébrale d'un patient de 2 ans et 10 mois, présentant une hypoplasie / atrophie du cortex fronto-temporal. Coupe axiale. Séquence T2. (Source : Reid et al, 2017)

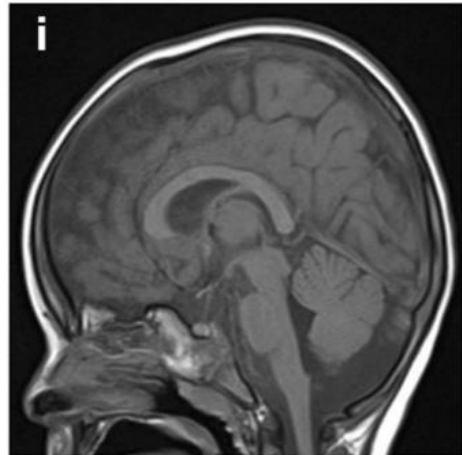


Figure 3 : IRM cérébrale d'un patient de 2 ans et 10 mois, présentant un splenium du corps calleux de petite taille. Coupe sagittale. Séquence T1. (Source : Reid et al, 2017)

c) L'électrorétinogramme et les potentiels évoqués visuels

L'électrorétinogramme (ERG) peut être anormal avec une altération des réponses périphériques et maculaires, signant une anomalie de l'activité électrique provenant de la rétine en réponse à un stimulus, c'est-à-dire une anomalie de l'activité des photorécepteurs.

Les potentiels évoqués visuels (PEV) peuvent montrer un signal de faible amplitude et lent, pouvant évoquer une anomalie de conduction du nerf visuel.

d) Le pronostic

Le pronostic de l'EEIP de type 3 n'est pas différent des autres EEIP, et les enfants décrits dans cette pathologie sont décédés à un âge très précoce, ou ont survécu dans un état végétatif.

e) Epidémiologie

Actuellement, 13 individus présentant un phénotype d'EEIP de type 3 et des variants dans le gène *SLC25A22*, ont été rapportés dans la littérature.

Initialement, sept personnes, issus de trois familles consanguines, ont été rapportées (Molinari et al, 2005 ; Molinari et al, 2009 ; Cohen et al, 2014). Ces sept individus ont présenté un phénotype sévère et similaire : des crises épileptiques précoces, une hypotonie sévère, une microcéphalie, des anomalies à l'imagerie cérébrale, un pattern de SB à l'EEG et sont décédés avant 8 ans ou ont survécu dans un état végétatif. Plus récemment, Reid et al. a rapporté six personnes supplémentaires, issus de trois familles, présentant des variants dans le gène *SLC25A22* et un phénotype plus modéré que les enfants précédemment rapportés (Reid et al, 2017).

f) Etiologie génétique monogénique

L'EEIP de type 3 est causée par des variants, à l'état homozygote ou hétérozygote composite, affectant la fonction du gène *SLC25A22* (OMIM *609302) (cf Description du gène *SLC25A22*). Le mode de transmission est autosomique récessif (Molinari et al, 2005).

C. L'épilepsie infantile avec crises épileptiques focales migrantes

Le gène *SLC25A22* est également impliqué dans l'épilepsie infantile avec crises épileptiques focales migrantes (EIMFS, précédemment "épilepsie partielle migrante de l'enfance" ; ORPHA:293181; Scheffer et al, 2017), une encéphalopathie épileptique sévère débutant dans l'enfance. Actuellement, la littérature rapporte deux enfants d'une même famille

portant des variants dans ce gène (Poduri et al, 2013). L'épilepsie est marquée par des crises partielles hémicorporelles, migrantes et continues à l'EEG (Figure 4), débutant dans les premières semaines de vie. Le pronostic développemental est très sévère (Coppola et al, 1995). Les anomalies neurologiques sont constantes : retard très important dans l'acquisition psychomotrice, hypotonie sévère, troubles de la vigilance, parfois avec un état végétatif. Des signes de neuropathie périphérique peuvent également être observés dans quelques cas.

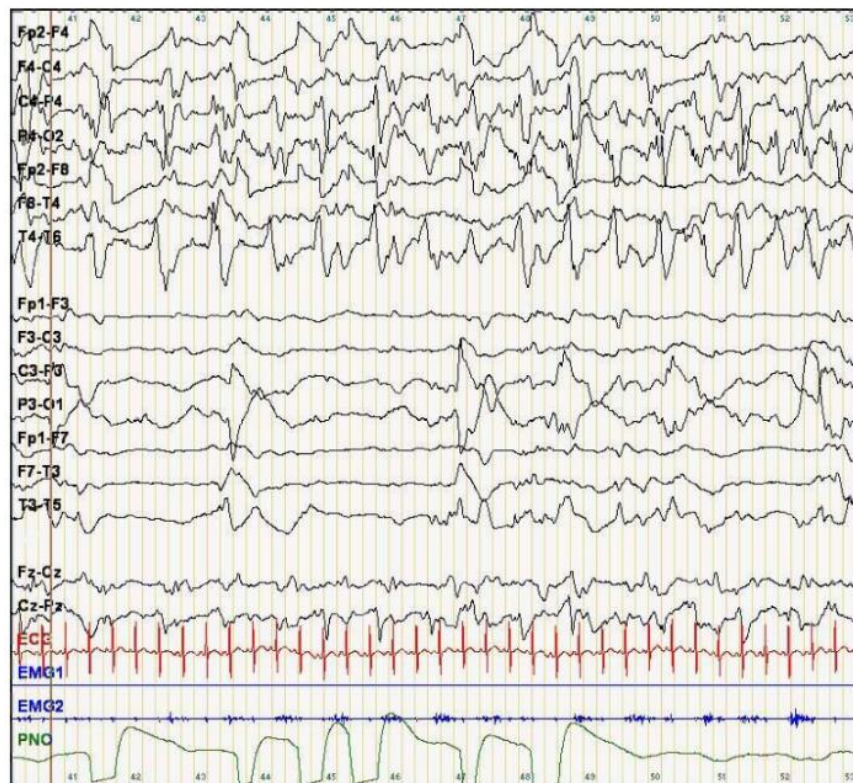


Figure 4 : EEG mettant en évidence une épilepsie partielle migrante de l'enfant avec des pointes-ondes localisées en hémicorporel. (Source : « Génétique des épilepsies néonatales » du Pr Mathieu MILH, page 4).

D. Description du gène *SLC25A22*

Le gène *SLC25A22* est situé sur le chromosome 11, en position 11p15.5 (Figure 5). Il code un canal mitochondrial glutamate/H⁺, composé de 323 acides aminés (Fiermonte et al, 2002) (Figure 6).

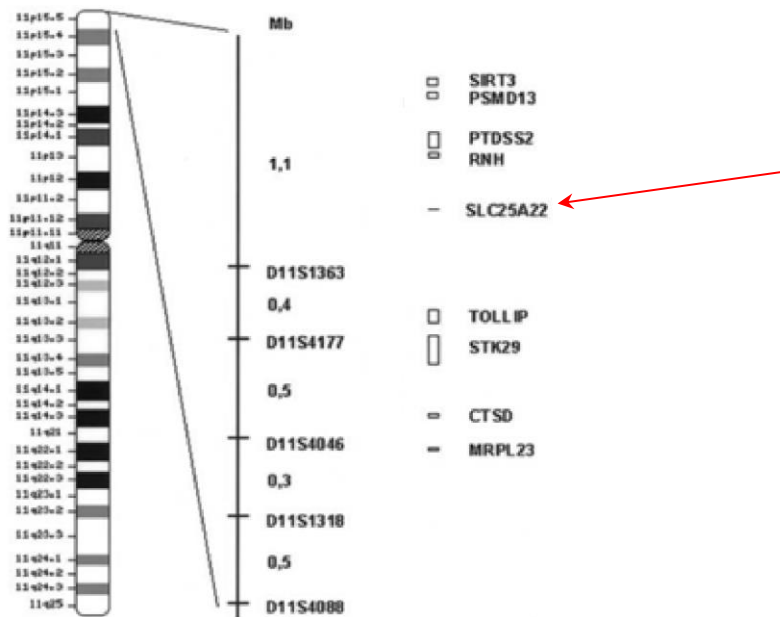


Figure 5 : Schématisation du chromosome 11, présence du gène *SLC25A22* en position 11p15.5.

(Source : Molinari et al, 2005)

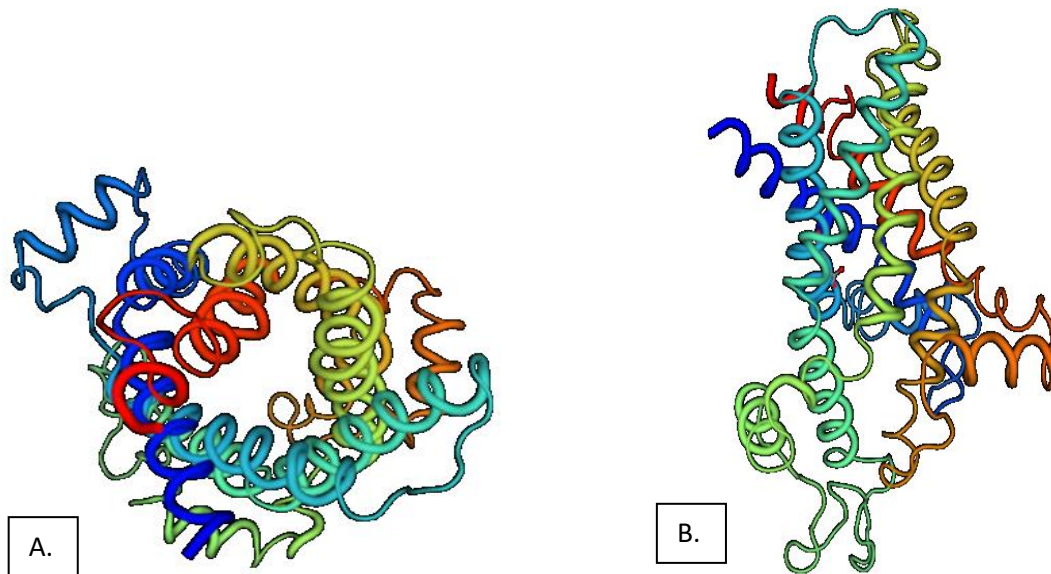


Figure 6 : Schématisation 3D de la protéine SLC25A22. A : visualisation vue du dessus, à travers le canal. B : visualisation vue de côté.

(Source : <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9H936>)

Ce gène est exprimé exclusivement dans le cerveau durant la période embryonnaire, particulièrement dans les aires impliquées dans la coordination motrice et dans la genèse et le contrôle des crises d'épilepsie (noyaux rouges, noyaux pontocérébelleux et substance noire), ainsi que dans le contrôle des mouvements des yeux (noyau du troisième nerf crânien) (Figure 7) (Molinari et al, 2005).

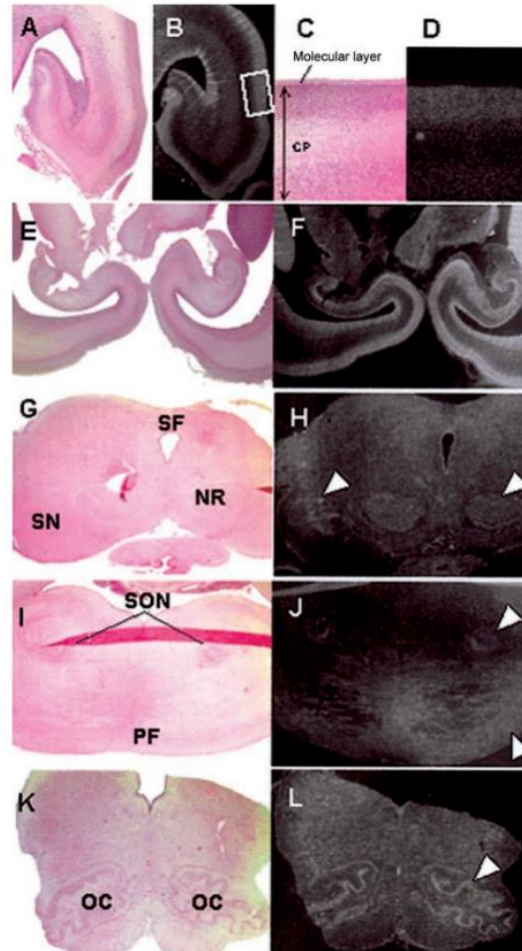


Figure 7 : Expression du gène *SLC25A22* dans du tissu de cerveau foetal humain de 15 semaines (A à F) et de 20 semaines (G à L). Coupes après coloration à l'éosine (A, C, E, G, I et K) et après révélation du signal par hybridation in situ (B, D, F, H, J et L). CP = substance grise. SN = substance noire. NR = noyau rouge. SON = olive supérieur. SF = vallée sylvienne. OC = complexe olivaire. PF = fibres pontocérébelleuses. Les flèches blanches indiquent la présence du signal. (Source : Molinari et al, 2005).

A l'âge adulte, le gène *SLC25A22* est exprimé de manière ubiquitaire. La protéine *SLC25A22* est plus abondante dans les astrocytes à l'âge adulte, et est une protéine clé du contrôle du métabolisme du glutamate dans ce type cellulaire (Fiermonte et al, 2002; Berkich

et al, 2007; Goubert et al, 2017). Elle est localisée dans la membrane interne des mitochondries et co-transporte le glutamate avec H^+ ou son échange avec OH^- , pour permettre le transport du glutamate dans la lumière de la mitochondrie (Figure 8). L'absence d'une protéine SLC25A22 fonctionnelle peut entraîner une accumulation de glutamate dans le cytosol des astrocytes, puis une libération du glutamate dans la lumière de la synapse et ainsi activer des récepteurs du glutamate extra-synaptiques (Goubert et al, 2017). Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur majeur du cerveau des mammifères. Une trop forte concentration du glutamate dans la lumière synaptique pourrait jouer un rôle important dans la survenue de la surexcitabilité neuronale, déclenchant les crises d'épilepsie et une apoptose des cellules nerveuses (excitotoxicité) (During and Spencer, 1993).

Une étude a montré qu'une injection de threo-beta-benzyloxyaspartate (TBOA), un inhibiteur des transporteurs membranaires du glutamate, reproduisait un pattern de SB, chez le rat nouveau-né (Milh et al, 2007).

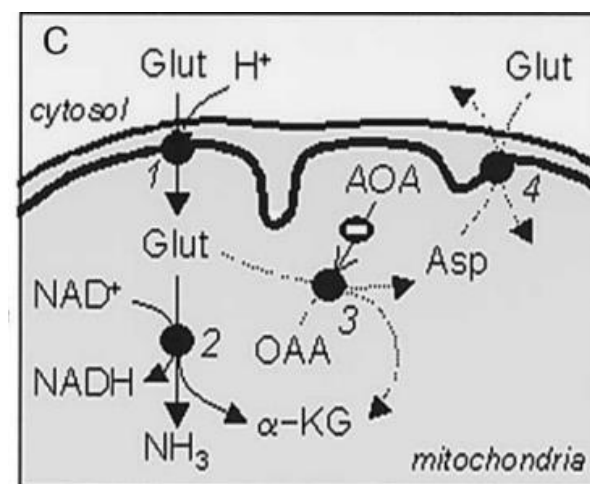


Figure 8 : Schématisation de la localisation du transporteur glutamate/ H^+ et glutamate/aspartate au niveau de la membrane de la mitochondrie. C = cytosol. 1 : le canal glutamate/ H^+ transporte une molécule de glutamate avec un ion H^+ vers la lumière de la mitochondrie. 2 : la glutamate déshydrogénase est une enzyme qui désamine le glutamate en α -cétoglutarate (α -KG). 3 :

l'aspartate-amino transférase est une enzyme qui transforme le glutamate en α -cétoglutarate et l'oxaloacétate (OAA) en aspartate. 4 : le canal glutamate/aspartate échange une molécule de glutamate contre une molécule d'aspartate. (Source : Molinari et al, 2005).

L'objectif de ce travail de thèse est d'essayer de comprendre pourquoi des personnes présentant des variations génétiques dans le même gène, présentent des phénotypes différents et ainsi de suggérer une corrélation génotype-phénotype ainsi qu'un continuum dans le groupe des maladies liées au gène *SLC25A22*, à travers le report de 3 enfants supplémentaires issue d'une même famille, présentant un phénotype moins sévère de EEIP de type 3, associés à des études fonctionnelles, ainsi que l'étude phénotypique et génotypique détaillée des personnes déjà publiées dans la littérature.

II. Matériels et Méthodes

A. Identification de trois enfants supplémentaires

1. Ethique et consentement

Les consentements écrits des parents des trois enfants mineurs ont été recueillis, après informations, concernant les recherches génétiques, ayant permis l'identification de l'origine génétique, ainsi que pour l'autorisation de publication, de manière anonyme.

2. Identification des variations génétiques

a) Séquençage de l'exome (CNRGH)

L'ADN du deuxième enfant et de sa mère ainsi que du troisième enfant et de son père (cf l'arbre généalogique : Figure 9) ont été étudiés grâce à un séquençage d'exome réalisé au Centre National de Recherche en Génomique Humaine (CNRGH). Après contrôle complet de la qualité des ADN de chaque échantillon, 3 microgrammes d'ADN génomique ont été capturés par une solution d'enrichissement (Human All Exon v5-50 Mb, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La préparation de la librairie et la capture de l'exome (environ 20 000 gènes capturés) ont été réalisés automatiquement par NGSx (Perkin Elmer, MA, USA) et Bravo (Agilent technologies), respectivement, en accord avec les instructions du fournisseur (SureSelect, Agilent technologies). Après normalisation et contrôle qualité, les librairies ont été séquencées par un Illumina HiSeq2000 (Illumina, CA, USA), en reads « paired-end » de 100 pb. Les échantillons ont été séquencés ensemble sur la même lame, pour obtenir une moyenne de couverture de 70 à 80X et au moins 80% des nucléotides capturés couverts à 30X. Les analyses des images obtenues et l'appel des bases ont été réalisés grâce au pipeline d'analyse en temps réel d'Illumina. Les analyses bioinformatiques des données de séquençage, basées sur

le pipeline d'Illumina (CASAVA1.8.2), ont généré un fichier FASTQ pour chaque patient. L'analyse de ces fichiers a été effectuée au Centre National de Recherche en Génomique Humaine.

b) Séquençage Sanger (Elodie Sanchez, Inserm, Montpellier)

Le gène *SLC25A22* a été séquençé par méthode Sanger afin de confirmer les résultats du séquençage d'exome et d'effectuer la ségrégation familiale, comme décrit par Barat-Houari et al, à partir d'ADN des enfants et de leurs parents (Barat-Houari et al, 2016).

c) Etudes fonctionnelles : activités enzymatiques et de respiration cellulaire (Pierre Rustin, Inserm, Robert Debré)

La protéine *SLC25A22* est une protéine ubiquitaire et le gène est exprimé dans toutes les cellules de l'organisme à l'âge adulte, ce qui permet son étude facilement à partir d'une biopsie de peau. Les conditions standards ont été utilisées pour la culture des fibroblastes cutanés (Brines et al, 1997). Les cellules du troisième enfant ont pu se multiplier en présence de glutamine et en absence de glucose. La respiration et oxydation des substrats mitochondriaux en présence de glutamate ou de succinate ont été étudiées par polarographie, sur des fibroblastes en suspension, avant et après perméabilisation membranaire par la digitonine (Ramos et al, 2003). Cette expérience a déjà été utilisée par le Professeur Florence Molinari pour mettre en évidence un défaut du métabolisme du glutamate chez les patients, lors de l'identification de l'implication du gène *SLC25A22* dans l'EEIP de type 3 (Molinari et al, 2005). Des études utilisant la spectrophotométrie afin d'étudier la chaîne respiratoire (Bourgeron et al, 1993) et

les activités de la glutamate déshydrogénase (Rustin et al, 1994; Aubert et al, 2001) ont été réalisées.

B. Constitution de la série pour l'étude de corrélation génotype-phénotype

Pour tenter d'établir une corrélation génotype-phénotype concernant les variants retrouvés dans le gène *SLC25A22*, nous avons analysé toutes les personnes décrites dans la littérature : cinq par Molinari et al. (Molinari et al, 2005 ; Molinari et al, 2009), deux par Cohen et al. (Cohen et al, 2014), deux par Poduri et al. (Poduri et al, 2013), et six par Reid et al. (Reid et al, 2017), ainsi que les trois enfants décrits ici ; soit un total de dix-huit individus.

Pour l'analyse, nous avons constitué 3 groupes phénotypiques : l'EEIP de type 3 sévère, l'EIMFS et l'EEIP de type 3 modéré.

Nous avons ensuite comparé les variants génétiques en fonction de leur nature, du degré de conservation de l'acide aminé touché, ainsi que de la localisation du variant au sein du gène puis de la protéine.

III. Résultats

A. Données cliniques des trois enfants de Montpellier

1. Première enfant

La première enfant est une jeune fille de 19 ans, d'origine caucasienne. Elle est la première enfant d'un couple non apparenté et en bonne santé. Elle a un frère en bonne santé et un frère atteint de la même maladie. Elle est née à terme, après une grossesse sans particularité, avec un poids de naissance (PN) de 3865 g (70^{ième} centile), une taille de naissance (TN) de 53 cm (75^{ième} centile) et un périmètre crânien de naissance (PCN) de 35 cm (50^{ième} centile).

L'épilepsie a commencé au troisième jour de vie par des crises cloniques suivies par des crises hypertoniques et myocloniques généralisées, initialement réfractaires aux traitements. Elles ont pu être transitoirement contrôlées à l'âge de 5 ans par une bi-médication (levetiracetam et clobazam) mais des crises myocloniques généralisées sont réapparues à l'âge de 11 ans. L'EEG intercritique, à 3 mois de vie, était normal et, à 1 an de vie, ne montrait pas de SB mais une électrogénèse ralentie et des pointes ondes.

Depuis les premiers mois de vie, elle présente une hypotonie axiale et périphérique sévère. A 1 an, elle présentait une ataxie kinétique et statique, une importante hypotonie axiale et de fréquentes dyskinésies interférant avec l'attrapage des objets. Des troubles du comportement, avec des pleurs inconsolables, des troubles du sommeil et des troubles d'automutilation, ont débuté vers 18 mois. Elle présente un retard de développement global sévère depuis les premiers mois de vie (tenue de tête à 8 mois, tenue assise à 2 ans, 4 pattes à 8 ans). Son développement moteur s'est détérioré au cours du temps, à partir de 11 ans et le 4 pattes n'était plus acquis à 13 ans.

A l'âge de 15 ans, elle présentait principalement toujours un retard de développement sévère, des troubles du sommeil et des crises épileptiques. Elle ne parlait pas et ne tenait plus assise seule. Son PC était de 54 cm (20^{ième} centile).

A l'âge de 18 ans, les crises épileptiques sont fréquentes, environ 1 fois par semaine, malgré une quadrithérapie anti-épileptique. Elle a des difficultés pour attraper les objets et présente beaucoup de tremblements qui perturbent ses mouvements volontaires et s'intensifient avant les crises d'épilepsie.

L'IRM cérébrale, à 6 mois de vie, montrait un élargissement des espaces péri-cérébraux, puis à 18 mois, une atrophie cortico-sous corticale prédominant dans les régions frontales. Une IRM de contrôle, à 14 ans, ne retrouvait plus d'anomalie (Figure 9). Les échographies cardiaques et rénales, ainsi que les potentiels évoqués visuels étaient normaux.

Une CGH array (Agilent, Affymetrix snp 6.0) n'avait pas retrouvé d'anomalie (arr(1-22,X)x2). Les analyses métaboliques étaient normales, incluant une numération formule sanguine (NFS), un dosage des enzymes hépatiques, de l'acide lactique sanguin et des acides gras à très longue chaîne, une analyse des pathologies congénitales de la glycosylation et une chromatographie des acides aminés organiques.

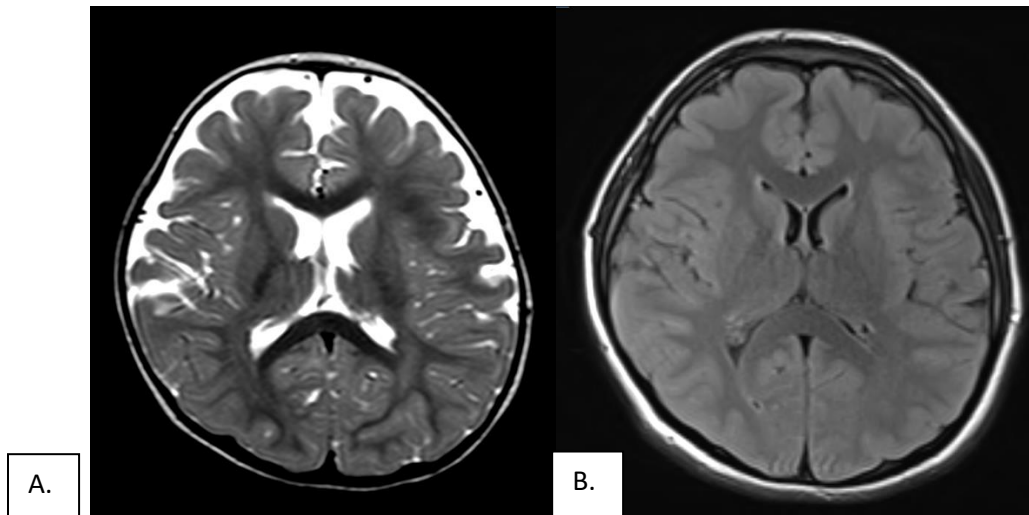


Figure 9 : IRM cérébrale de la première enfant, en coupe axiale. A : A l'âge de 18 mois, atrophie cortico-sous corticale, prédominant dans les régions frontales (image en T2). B : A l'âge de 14 ans, absence d'atrophie corticale (image en T2 FLAIR).

2. Deuxième enfant

Le deuxième enfant est le frère de la première enfant, âgé de 13 ans. Il est né à terme, après une grossesse sans particularité, un PN de 4570 g (98^{ième} centile), une TN de 52 cm (50^{ième} centile) et un PCN de 37 cm (96^{ième} centile). L'épilepsie a débuté à 1 mois de vie avec des crises épileptiques myocloniques généralisées et tonico-cloniques, également initialement réfractaires aux traitements. Elles ont été partiellement contrôlées à partir de 3 ans, mais les crises myocloniques généralisées sont réapparues à l'âge de 6 ans et ont nécessité un traitement par valproate, levetiracetam et phénobarbital à l'âge de 10 ans.

L'EEG intercritique, à 1 mois, était normal, et à 1 an, montrait un ralentissement de l'électrogénèse sans SB.

Dès les premiers mois de vie, il présentait une hypotonie axiale et périphérique sévère et des mouvements dyskinétiques. Des troubles du comportement avec des troubles du sommeil ont commencé à l'âge de 3 ans. Il présentait un retard de développement global sévère. Il a tenu sa tête temporairement à 18 mois, mais a présenté une régression motrice après 6 ans. Il n'a jamais marché, ni parlé.

L'examen physique à l'âge de 9 ans révélait une hypotonie axiale et périphérique sévère, des mouvements dystoniques et dyskinétiques, une scoliose et une cryptorchidie bilatérale. Son PC était de 52 cm (20^{ième} centile).

A l'âge de 13 ans, les crises épileptiques sont partiellement contrôlées par une trithérapie. Il est alimenté par une gastrostomie.

L'IRM cérébrale montrait un élargissement des espaces péri-cérébraux, à 3 mois, et une atrophie cérébrale, à 18 mois. L'échographie cardiaque et rénale, ainsi que les PEV étaient normaux.

La CGH array (Agilent, Affymetrix snp 6.0) n'a pas détecté d'anomalie (arr(1-22)x2, (X,Y)x1). Les analyses métaboliques étaient normales, incluant une NFS, le dosage des enzymes hépatiques, de l'acide lactique sanguin et des acides gras à très longue chaîne, ainsi qu'une analyse des pathologies congénitales de la glycosylation et une chromatographie des acides aminés organiques.

3. Troisième enfant

La troisième enfant est la cousine au premier degré des deux premiers enfants, leurs mères sont sœurs et leurs pères sont des cousins éloignés (Figure 10). C'est une petite fille de

8 ans, d'origine caucasienne, unique enfant d'un couple non apparenté et en bonne santé. Elle est née à terme, après une grossesse sans particularité, avec un PN de 3770 g (50^{ième} centile), une TN de 51 cm (50^{ième} centile) et un PCN de 35 cm (50^{ième} centile).

Les crises épileptiques ont commencé à 6 semaines de vie avec des crises myocloniques généralisées, cloniques et des épisodes cyanotiques de causes indéterminées. L'épilepsie a été contrôlée temporairement par clobazam et valproate vers l'âge de 2 ans, mais des épisodes de perte de contact avec manifestations motrices variables, souvent focales sont réapparues à l'âge de 5 ans.

L'EEG intercritique, à 4 ans, montrait un tracé pauvre et désorganisé avec plusieurs pointes ondes, et à l'âge de 7 ans, une électrogénèse ample, ralentie et désorganisée, surchargée de nombreuses anomalies intercritiques multifocales quasi continues.

Elle présentait une hypotonie globale sévère, un retard de développement et des troubles du sommeil apparus vers 18 mois, nécessitant un traitement par mélatonine, et qui se sont aggravés à l'âge de 5 ans.

A l'examen physique à l'âge de 5 ans, elle commençait à tenir sa tête, ne marchait pas à 4 pattes et ne disait pas de mots. Son poids était de 19 kg (85^{ième} centile), sa taille de 110 cm (85^{ième} centile) et son PC de 49 cm (18^{ième} centile).

A l'âge de 8 ans, elle présente des crises convulsives persistantes malgré un traitement comprenant du lévétiracétam, du clobazam et du cannabidiol. Elle pèse 24 kg (50^{ième} centile), mesure 124 cm (50^{ième} centile) et son PC est de 50 cm (5^{ième} centile). Son développement psychomoteur reste inchangé et elle présente toujours des troubles du comportement et du sommeil importants.

L'IRM cérébrale, à l'âge de 1 an, était normale.

Le séquençage des gènes *STXBPI* et *KCNQ2*, ainsi que la CGH array (Agilent, Affymetrix snp 6.0) étaient normaux (arr(1-22,X)x2).

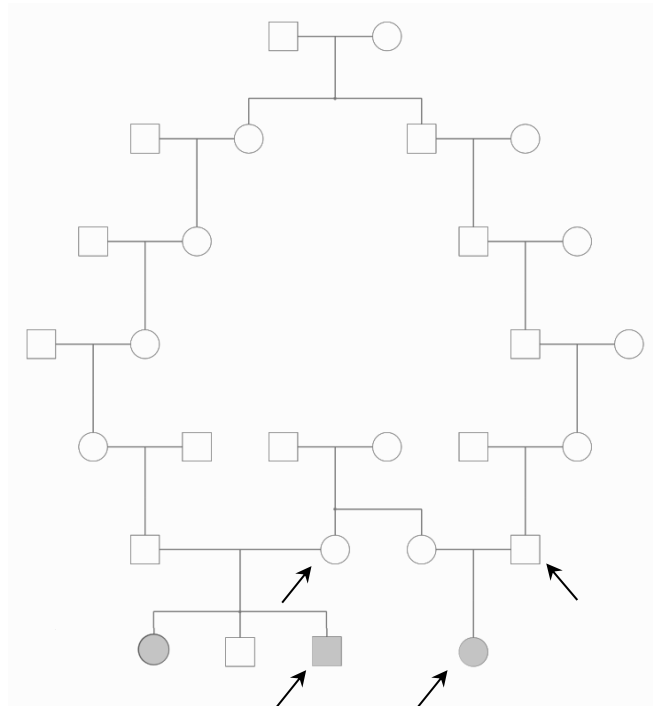


Figure 10 : Arbre généalogique de la famille étudiée. Les flèches noires désignent les individus analysés par séquençage de l'exome.

B. Résultat des analyses génétiques

Nous avons identifié, par séquençage d'exome, et confirmé par séquençage Sanger, deux variants dans le gène *SLC25A22*, portés par les trois enfants : le variant NM_024698.4 :c.813_814delTG; p.(Ala272Glnfs*144) et le variant NM_024698.4 :c.818G>A ; p.(Arg273Lys) (Figure 11).

L'analyse de ségrégation familiale montre que le variant p.(Ala272Glnfs*144) est hérité de leurs mères et que le variant p.(Arg273Lys) est hérité de leurs pères.

Le variant c.813_814delTG est absent des bases de données publiques de population (dbSNP, ExAC, GnomAD) (critère PM2 de l'ACMG ; Annexe 3). L'alanine en position 272 est modérément conservée entre les espèces (Figure 12) et les logiciels de prédictions in silico (SIFT et PolyPhen 2) prédisent ce variant comme délétère (critère PP3 de l'ACMG).

La fréquence dans la base de donnée GnomAD du variant c.818G>A est de $4.12e^{-6}$ (rs1195505218). L'arginine en position 273 est modérément conservée entre les espèces (Figure 13) et les logiciels de prédictions in silico prédisent ce variant comme toléré (critère BP4 de l'ACMG).

Ces deux variants sont classés "pathogènes" selon les critères de classification de l'ACMG (Table 1). Les informations concernant les deux variants ont été soumises dans la base de données ClinVar (numéro d'accèsion SCV000882718 et SCV000898499, respectivement).

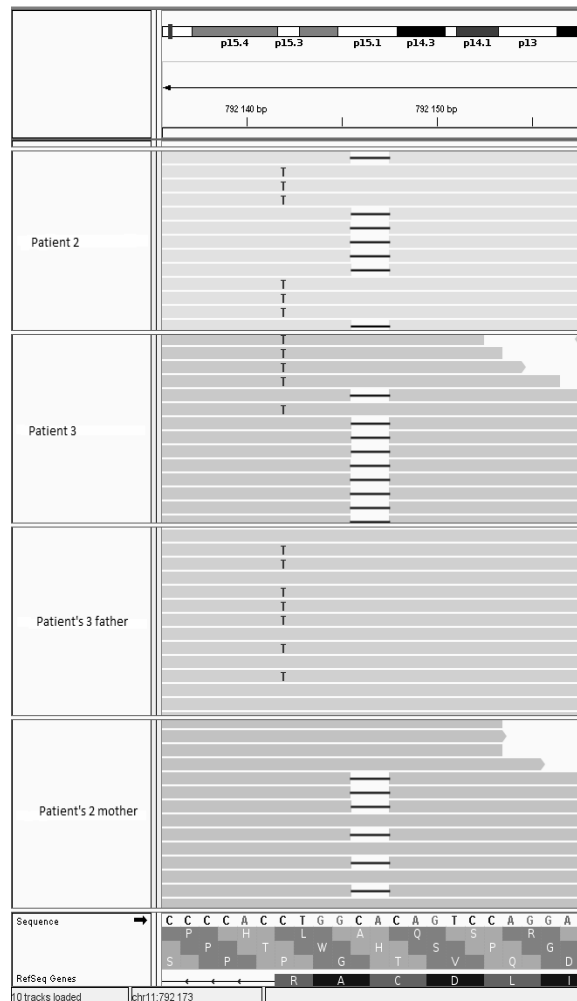


Figure 11 : Capture d'écran du logiciel IVG permettant la visualisation des deux variants présents sur les différents allèles des personnes étudiées. Les deux enfants sont porteurs à l'état hétérozygote composite des deux variants dans le gène *SLC25A22*. Le père du troisième enfant est porteur à l'état hétérozygote simple du variant p.(Arg273Lys) et la mère du deuxième enfant est porteuse à l'état hétérozygote simple du variant p.(Ala272Glnfs*144). (Source : Integrative Genomic Viewer).

Variant			Exon	Fréquence dans la population	Type de variant	Conservation de l'a.a.
NC_0000119	NM_024698.4	SLC25A22	NG_023407.1	GnomAD		
g.792146_792147delCA	c.813_814delTG	p.(Ala272Glnfs*144)	9	0	Framshift	Modérément conservé
g.792142C>T	c.818G>A	p.(Arg273Lys)	9	4.124 ^{e-6}	Faux-sens	Modérément conservé

Type de l'a.a. concerné		Etudes fonctionnelles	Publication	Prédictions in silico (SIFT/PolyPhen)	Critères de l'ACGM	Numéro rs
WD	Mutant					
Hydrophobe, aliphatique	Polaire non chargé	Oui	Non	Délétère	PVS1, PS3, PM2, PM3, PP1, PP3, PP5	SCV000882718
Chargé positivement	Chargé positivement	Oui	Non	Toléré	PVS1, PS3, PM3, PP1, PP5, BP4	rs1195505218

Table 1 : Récapitulatif des données concernant les deux variants retrouvés dans la famille étudiée.

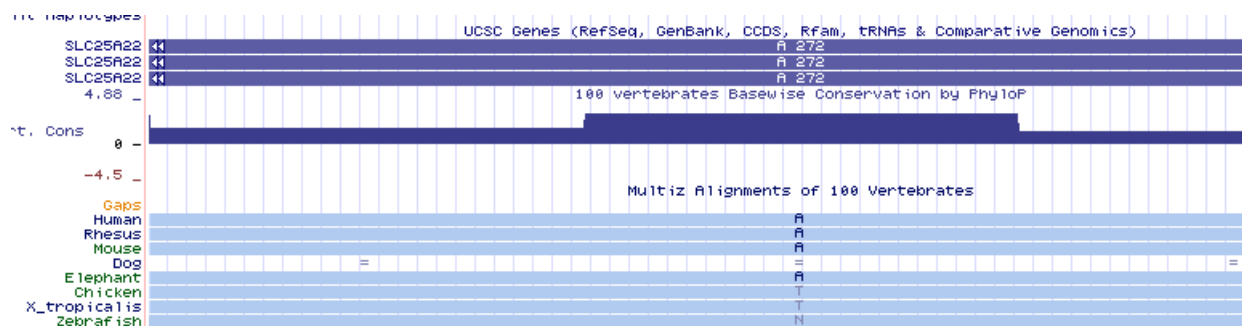


Figure 12 : Visualisation de la conservation à travers les espèces, de l'Alanine en position 272 de la protéine SLC25A22. (Source : genome.ucsc.edu).

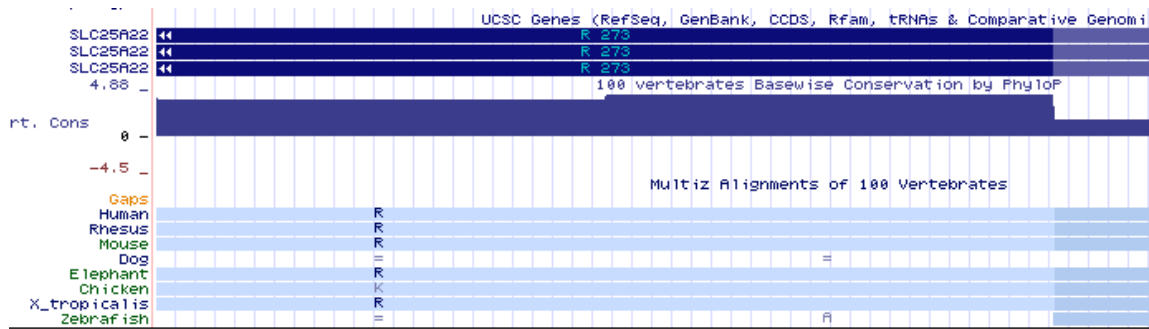


Figure 13 : Visualisation de la conservation à travers les espèces, de l'Arginine en position 273 de la protéine SLC25A22. (Source : genome.ucsc.edu).

C. Résultats des analyses fonctionnelles

Nous avons analysé la consommation du glutamate sur des cultures de fibroblastes du troisième enfant, via la mesure de la consommation d'O², représentant la respiration cellulaire (Figure 14). Les études ont montré une respiration cellulaire normale par les cellules en culture, comparé à des cellules de contrôle, (représenté par la première partie de la courbe) indiquant que le glutamate ne représente pas le substrat majoritaire de la respiration cellulaire. Cependant, après perméabilisation des membranes cellulaires par la digitonine, en présence d'aminooxyacétate, un inhibiteur spécifique de la glutamate/aspartate transférase, et ajout de glutamate dans le milieu de culture, les cellules du patient ne parviennent pas à oxyder normalement le glutamate, en comparaison avec des cellules contrôles, (représenté par la troisième partie de la courbe). En effet, l'addition de glutamate dans le milieu de culture permet une augmentation de 41% de la consommation d'O² par les cellules contrôles, alors que nous avons une diminution de 12% de la consommation par les cellules du patient. La quatrième partie de la courbe montre que l'oxydation d'un autre substrat (le succinate) est normale dans les cellules du patient. Ces résultats mettent en évidence un défaut net du métabolisme mitochondrial du glutamate, ce qui

est concordant avec l'implication des variants du gène *SLC25A22* dans la pathologie de ces enfants.

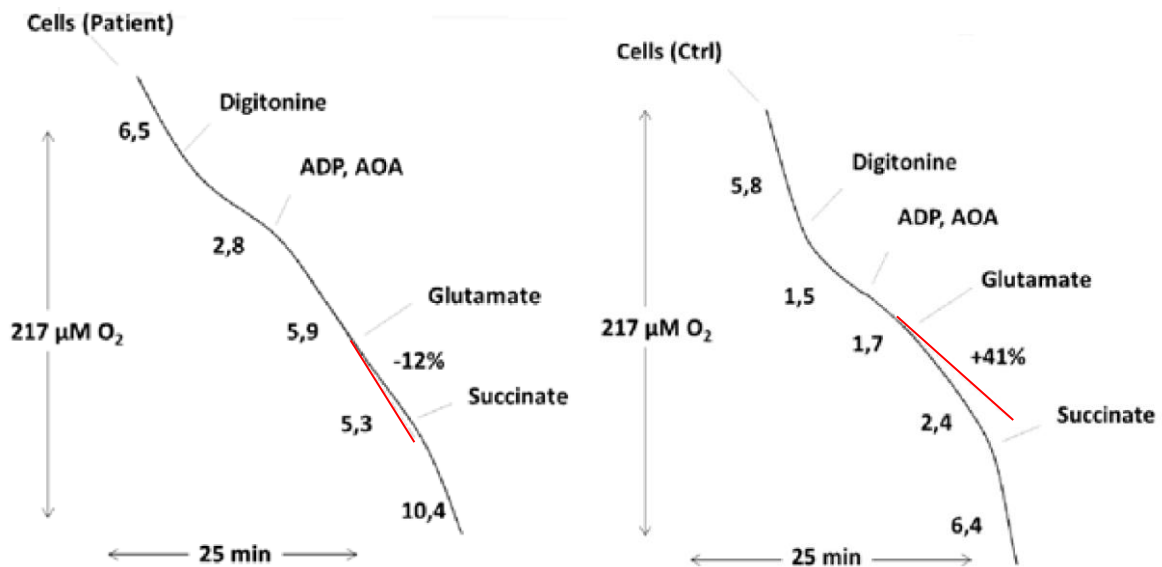


Figure 14 : Etude de l'oxydation du glutamate pour la respiration cellulaire à travers la consommation d'O₂, réalisée sur des cellules épithéliales du troisième enfant. La digitonine permet la perméabilisation des membranes cellulaires en culture. AOA = amino-oxyacétate. L'AOA bloque le transporteur glutamate/aspartate, et permet ainsi d'étudier spécifiquement le transporteur glutamate/H⁺. Les lignes rouges représentent la vitesse de consommation de l'O₂ avant l'ajout de glutamate dans le milieu de culture.

D. Résultats des analyses de corrélation génotype-phénotype

1. La série

Nous avons regroupé les 18 individus et les variants du gène *SLC25A22* dont ils sont porteurs en trois groupes selon la sévérité du phénotype. La table 2 regroupe les caractéristiques cliniques définissant ces 3 groupes. 9 individus présentent un phénotype modéré d'EEIP de type

3, 2 individus présentent un phénotype d'EIMFS, et 7 individus présentent un phénotype sévère d'EEIP de type 3. La table 3 regroupe les caractéristiques cliniques de ces enfants.

Symptômes communs	Phénotype sévère n=7	EIMFS n=2	Phénotype modéré n=9
Epilepsie à début précoce	SB	EPM	Pas de SB
Crises myocloniques/EPM	Epilepsie réfractaire	Epilepsie réfractaire	Epilepsie temporairement traitable
Hypotonie sévère	Pas d'acquisition psychomotrice	Pas d'acquisition psychomotrice	Quelques acquisitions temporaires
DI sévère	Microcéphalie	Non renseigné	Pas de microcéphalie
	PEV/ERG anormaux	PEV/ERG normaux	PEV/ERG normaux
	Décédé ou dans un état végétatif	Décédé	En vie avec possibilité d'interaction
	c.617C>T; p.(Pro206Leu) c.706G>T; p.(Gly236Trp)	c.328G>C; p.(Gly110Arg)	c.818G>A; p.(Arg273Lys) c.813_814delTG; p.(Ala272Glnfs*144) c.166A>C; p.(Thr56Pro) c.886G>A; p.(Ala296Thr) c.235G>A; p.(Glu79Lys) c.746T>A; p.(Val249Glu)
(NG_023407.1)	Exon 8	Exon 6	Exons 4, 5, 9 and 10
	Individus 1 à 7	Individus 8 et 9	Individus 10 à 18

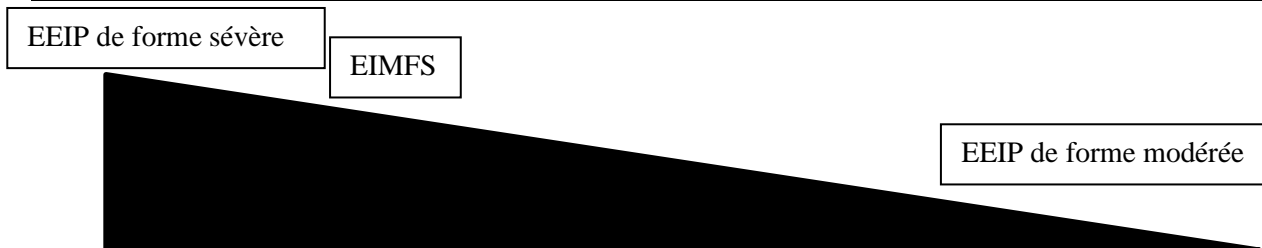


Table 2 : Description phénotypique des 3 groupes d'individus présentant des anomalies dans le gène *SLC25A22*. Certains signes cliniques sont communs. D'autres signes permettent de définir les 3 groupes de sévérité croissante. SB = suppression burst ; EPM = épilepsie partielle migrante ; PM = partielle migrante ; DI = déficience intellectuelle ; PEV = potentiels évoqués visuels ; ERG = électrorétinogramme.

Groupe	Sévère	Sévère	Sévère	Sévère	Sévère	Sévère	Sévère	EIMFS	EIMFS
Patient	P. 1	P.2	P.3	P.4	P.5	P.6	P.7	P.8	P.9
Sexe	M	F	M	F	M	F	M	M	F
Origine ethnique	Arabe	Arabe	Arabe	Arabe	Arabe	Arabe	Arabe	Arabe	Arabe
Consanguinité parentale	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Age de début des crises	Naissance	Naissance	Naissance	Naissance	5 jours	Premier mois	2 semaines	1 semaine	2 semaines
Evaluation neurologique	Hypotonie	Hypotonie	Hypotonie	Hypotonie, spasticité	Hypotonie, pas d'acquisition psychomotrice, faible succion, reflexes archaïques incomplets	Hypotonie spasticité, pas d'acquisition psychomotrice	Hypotonie périphérique, pas d'acquisition psychomotrice	Hypotonie, RD	Hypotonie, RD
Microcéphalie	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	NC	NC
Type de crises	Myocloniques	Myocloniques	Myocloniques	Myocloniques	Focal, secondairement généralisée	Myocloniques, focal	Focal	Crises partielles migrantes	Crises partielles migrantes
Réponse aux traitements	NC	NC	NC	NC	Non	NC	NC	Partiellement	Non
EEG	SB	NC	NC	SB	SB, hypsarythmie	SB	SB	Pattern delta brush, pointes focales positive et de haut voltage	Pointes focales indépendantes de distribution multifocale
PEV	Anormaux	Anormaux	NC	Anormaux	Anormaux	Normaux	Normaux	Normaux	Anormaux
ERG	NC	Normal	NC	Anormaux	Abolition des réponses maculaires et périphériques, altération progressive	NC	NC	Normal	Normal
Imagerie cérébrale	Atrophie cérébrale	Atrophie cérébrale	NC	Elargissement des espaces sous-arachnoïdiens	Hypoplasie cérébelleuse, CC anormal, anomalie de la gyration des régions temporo-parietales, anomalie de la myélinisation des pôles temporaux	Petit CC et atrophie cérébrale	Petit CC, élargissement des espaces sous-arachnoïdiens, atrophie cérébrale	Normale	Retard de myélinisation et petit CC
Evaluation métabolique	NC	NC	NC	Normale	Normale	Normale	Normale	Normale	Normale
Variants génétiques	c.617C>T; p.(Pro206Leu)	c.617C>T; p.(Pro206Leu)	c.617C>T; p.(Pro206Leu)	c.617C>T; p.(Pro206Leu)	c.706G>T; p.(Gly236Trp)	c.617C>T; p.(Pro206Leu)	c.617C>T; p.(Pro206Leu)	c.328G>C; p.(Gly110Arg)	c.328G>C; p.(Gly110Arg)
Décès ou état végétatif	NC	NC	Décès à 8 ans	NC	Etat végétatif à 10 ans	Etat végétatif à 6 ans	Etat végétatif à 4 ans	Décès à 14 mois	Décès à 4 ans

Groupe	Modéré	Modéré	Modéré	Modéré	Modéré	Modéré	Modéré	Modéré	Modéré	Total
Patient	P.10	P.11	P.12	P.13	P.14	P.15	P.16	P.17	P.18	
Sexe	F	M	F	M	M	M	F	F	F	9F/9M
Origine ethnique	Caucasien	Caucasien	Caucasien	Arabe	Arabe	Arabe	Arabe	Arabe	Caucasien	4 Caucasien/14 Arabe
Consanguinité parentale	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	14 issues de famille consanguine (78%)
Age de début des crises	3 jours	1 mois	6 semaines	6 semaines	16 semaines	16 semaines	premier mois	7 ans	6 semaines	15/18 avant 2 mois (83%)
Evaluation neurologique	Hypotonie, RD sévère	Hypotonie, RD sévère, mouvements dystoniques et dyskinétiques	Hypotonie, RD sévère	RD sévère, hypotonie globale, mouvements dystoniques	Hypotonie axiale, stagnation développemental, pas de tenue de tête	Hypotonie axiale, stagnation développemental, pas de tenue de tête	RD, hypotonie globale	RD (10 mots), hypotonie, hypermétropie, astigmatisme	RD, hypotonie, tenue de tête faible, pas de fixation visuelle	18/18 Hypotonie (100%) ; 18/18 RD (100%)
Microcéphalie	Non	Non	Non	NC	NC	NC	NC	Oui	NC	8/11 (72%)
Type de crises	Myocloniques	Myocloniques	Myocloniques et cyanotiques	Myocloniques et tonic-cloniques	Flexor spasm-like, tonic-cloniques	Flexor spasm-like, tonic-cloniques	Crises fébriles et toniques	Absence, crises fébriles	Crises focales, asymétriques et cloniques	9/17 avec des crises myocloniques (53%)
Réponse aux traitements	Oui	Oui	Oui	Oui	NC	NC	Non	-	Non	
EEG	Pas de SB, électrogénèse ralentie et pointes ondes.	Pas de SB, électrogénèse ralentie.	Pas de SB, background pauvre et désorganisé, pointes ondes.	NC	Anomalies multifocales, pas de SB	Anomalies multifocales, pas de SB	Activité de pointes lentes irrégulières, diffuses et symétriques, pas de SB	Normal	Pas de SB, pattern semi-discontinu	5/14 avec SB (36%)
PEV	Normaux	Normaux	NC	NC	NC	NC	NC	Normaux	NC	5/11 (45%)
ERG	Normal	Normal	NC	NC	NC	NC	NC	Normal	NC	2/8 (25%)
Imagerie cérébrale	Normale	Elargissement des espaces sous-arachnoïdiens	Normale	Hypoplasie frontotemporale, retard de myélinisation globale, petit splenium	NC	NC	Retard de myélinisation des hémisphères temporaux, petit splenium	Retard de myélinisation des hémisphères temporaux, petit splenium	Normale	11/15 avec une imagerie cérébrale anormale (73%)
Evaluation métabolique	Normale	Normale	NC	Hyperprolinémie	Hyperprolinémie	Hyperprolinémie	Hyperprolinémie	Normale	Hyperprolinémie	5/14 (36%)
Variants génétiques	c.818G>A; p.(Arg273Lys) c.813_814delTG; p.(Ala272Glnfs*144)	c.818G>A; p.(Arg273Lys) c.813_814delTG; p.(Ala272Glnfs*144)	c.818G>A; p.(Arg273Lys) c.813_814delTG; p.(Ala272Glnfs*144)	c.166A>C; p.(Thr56Pro)	c.166A>C; p.(Thr56Pro)	c.166A>C; p.(Thr56Pro)	c.886G>A; p.(Ala296Thr)	c.886G>A; p.(Ala296Thr)	c.235G>A; p.(Glu79Lys) c.746T>A; p.(Val249Glu)	-
Décès ou état végétatif	Non	Non	Non	NC	NC	NC	Non	Non	Non	6/12 (50%)

Table 3 : Données cliniques des individus portant des variants dans le gène *SLC25A22* et un phénotype d'EEIP, incluant les individus précédemment publiés (Molinari et al. 2005 [patients 1 à 4] ; Molinari et al. 2009 [patient 5] ; Cohen et al. 2014 [patients 6 et 7] ; Poduri et al. 2013 [patients 8 et 9] ; Reid et al. 2017 [patients 13 à 18]). Les individus 10 à 12 sont suivis à Montpellier. P : patient ; F : femme ; H : homme ; EEG : électroencéphalogramme ; PEV : Potentiels évoqués visuels ; ERG : électrorétinogramme ; NC : non connu ; SB : Suppression burst ; CC : corps calleux. RD : retard de développement.

2. Les analyses de corrélation génotype-phénotype

Dans le but d'identifier une corrélation génotype-phénotype, nous avons comparé les variants selon leur localisation au niveau du gène et des domaines protéiques (Figure 15).

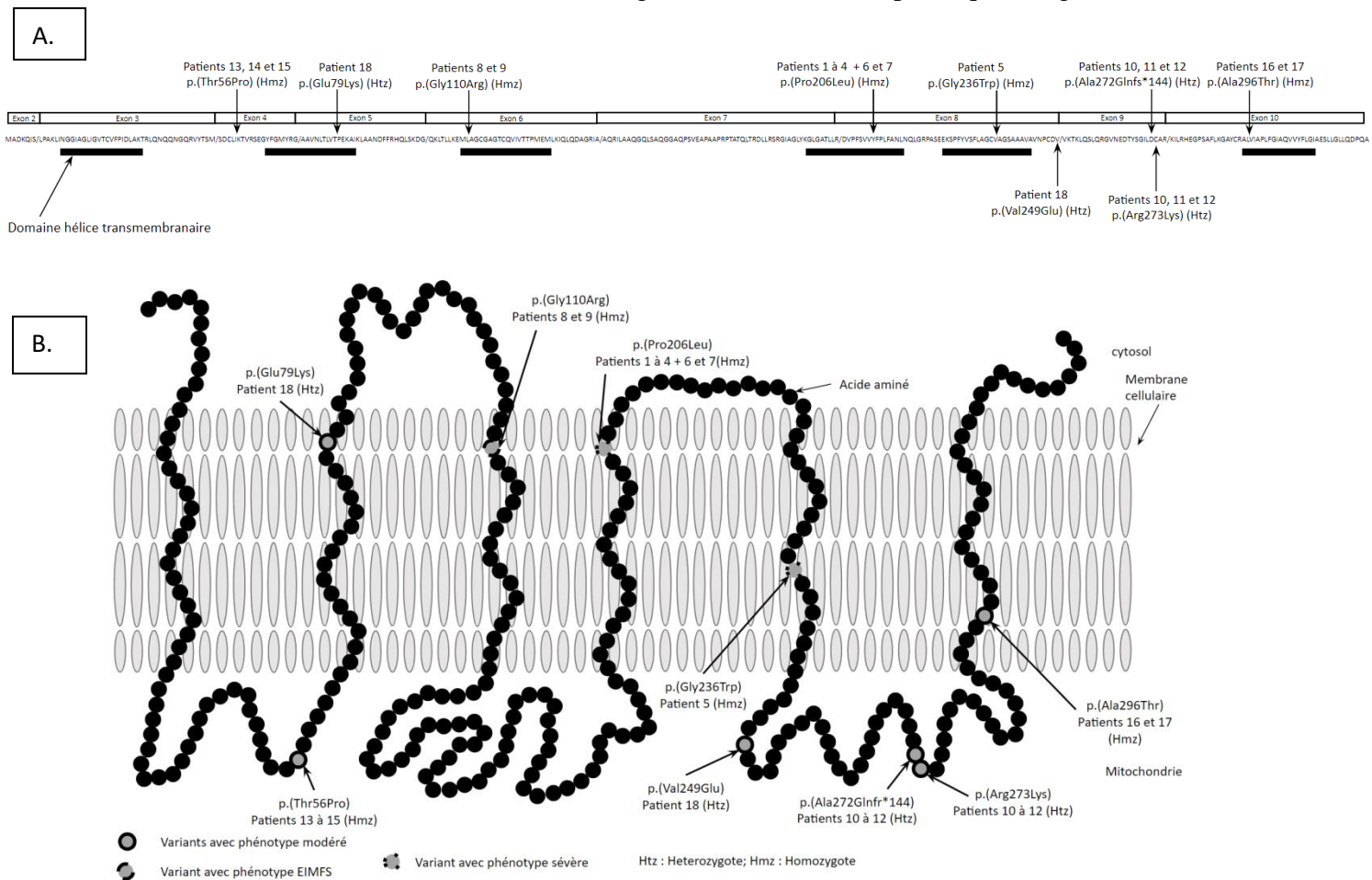


Figure 15 : Visualisation de la localisation des variants au niveau du gène (A) et de la protéine SLC25A22 (B). Hmz : homozygote ; Htz : hétérozygote.

Les variants c.166A>C ; p.(Thr56Pro), c.235G>A ; p.(Glu79Lys), c.746T>A ; p.(Val249Glu), c.813_814delTG ; p.(Ala272Glnfs*144), c.818G>A ; p.(Arg273Lys) et c.886G>A ; p.(Ala296Thr), impliqués dans les phénotypes plus modérés (individus 10 à 18 de la Table 2), sont localisés dans les exons 4, 5, 9 et 10 (NG_023407.1), et ne se situent pas dans le domaine hélice transmembranaire (Annexe 2, Figures 1 à 6), exceptés deux d'entre eux : p.(Glu79Lys) et p.(Ala296Thr). Cependant, chez la personne 18, le variant p.(Glu79Lys) est associé au variant p.(Val249Glu) (c.[5235G>A] ; [746T>A]), qui n'affecte pas un domaine transmembranaire. Le variant p.(Ala296Thr) est à l'état homozygote chez les individus 16 et 17. Ces individus ont un phénotype atypique avec des crises d'épilepsie fébrile et de type absence. Ce variant est présent une fois à l'état hétérozygote dans les bases de données de population GnomAD et ExAC. Les prédictions de pathogénicité in-silico de SIFT et PolyPhen2 sont concordantes pour décrire ce variant comme « pathogène » (Table 3), mais aucune étude fonctionnelle n'a été faite. Ce variant est situé dans la dernière hélice transmembranaire de la protéine (Figure 15). Nous avons supposé que les conséquences de ce variant sur la conformation 3D et sur la fonction du canal sont moins sévères que pour les variants impliquant les autres domaines. Ceci doit être confirmé par des études fonctionnelles.

Les variants c.617C>T ; p.(Pro206Leu) et c.706G>T ; p.(Gly236Trp), impliqués dans les phénotypes plus sévères (individus 1 à 7 de la table 2), sont localisés dans l'exon 8

(NG_023407.1), et se situent dans un domaine hélice transmembranaire (Annexe 2, Figures 7 et 8), essentiel pour la conformation 3D de la protéine.

Le variant c.328G>C ; p.(Gly110Arg), identifié chez les individus avec un phénotype d'EIMFS (individus 8 et 9 de la table 2) est localisé dans l'exon 6 (NG_023407.1) et se situe également dans un domaine hélice transmembranaire (Annexe 2, Figure 9). Ceci peut altérer directement la fonction du canal et expliquer le phénotype plus sévère.

La pathogénicité de chaque variant selon les critères de l'ACMG est résumée dans la table 4. La signification des abréviations des critères est indiquée en Annexe 3.

Variant			Exon	Critères de l'ACMG	Evaluation selon les critères	Numéro rs
NC_0000119	NM_024698.4	SLC25A22	NG_023407.1			
g.794494T>C	c.166A>C	p.(Thr56Pro)	4	PM2, PP1, PP3, PP5	Probablement pathogène	-
g.793587C>T	c.235G>A	p.(Glu79Lys)	5	PM1, PM2, PP3, PP5	Probablement pathogène	rs1215087087
g.792954C>G	c.328G>C	p.(Gly110Arg)	6	PS3, PM1, PM2, PP1, PP3	Pathogène	rs587777243
g.792429G>A	c.617C>T	p.(Pro206Leu)	8	PS3, PM1, PM2, PP1, PP3, PP5	Pathogène	rs121918334
g.792340C>A	c.706G>T	p.(Gly236Trp)	8	PS3, PM1, PM2, PP3, PP5	Pathogène	rs121918335
g.792214A>T	c.746T>A	p.(Val249Glu)	9	PM2, PM3, PP3, PP5	Probablement pathogène	-
g.792146_792147delCA	c.813_814delTG	p.(Ala272Glnfs*144)	9	PVS1, PS3, PM2, PM3, PP1, PP3, PP5	Pathogène	SCV000882718
g.792142C>T	c.818G>A	p.(Arg273Lys)	9	PVS1, PS3, PM3, PP1, PP5, BP4	Pathogène	rs1195505218
g.792001C>T	c.886G>A	p.(Ala296Thr)	10	PM1, PM2, PP1, PP3, PP5	Probablement pathogène	rs773825846

Table 4 : Classification de pathogénicité des variants selon les critères de l'ACMG.

IV. Discussion

A. Remarques générales

L'EEIP de type 3 est une pathologie génétique rare et sévère causée par l'association de deux variants, à l'état homozygote ou hétérozygote composite, affectant la fonction de la protéine SLC25A22. Celle-ci est exprimée dans plusieurs tissus à l'âge adulte, notamment dans le foie et le pancréas, mais durant la période embryonnaire, elle est exclusivement exprimée dans le cerveau. Il existe donc probablement une dysfonction neuronale présente dès la période anténatale, qui pourrait expliquer la microcéphalie et les anomalies cérébrales, ainsi que le début très précoce en postnatal des symptômes (dès les premiers jours/semaines de vie). L'atteinte exclusivement neurologique des personnes ayant une dysfonction de cette protéine pourrait être expliquée par le fait que le décès rapide des enfants n'a pas permis de noter une possible dysfonction d'autres organes, liée à l'anomalie de fonctionnement du canal SLC25A22 (Molinari et al, 2005). Une autre hypothèse (qui pourrait être étayée par le suivi à l'âge adulte des enfants ayant survécus) serait que dans les autres organes, le dysfonctionnement de la protéine SLC25A22 serait compensé par la présence d'autres transporteurs du glutamate (SLC25A12 et SLC25A13).

Les premiers enfants rapportés dans la littérature sont, soit décédés durant la première année de vie, soit ont survécu dans un état végétatif persistant. Cependant, récemment, Reid et al. ont décrit 6 nouveaux enfants, portant des variants dans le gène *SLC25A22*, et présentant un phénotype plus modéré (Reid et al, 2017). A l'heure actuelle, 6 variants différents affectant la fonction de la protéine et responsable d'EEIP de type 3, ont été décrits (Table 3).

SLC25A22 est également impliqué dans l'EIMSF, une encéphalopathie épileptique sévère débutant dans l'enfance et caractérisée par des crises partielles migrantes à l'EEG. Les deux enfants, décrits par Poduri et al., présentent un phénotype similaire à l'EEIP de type 3 :

épilepsie débutant entre la première et la seconde semaine de vie, hypotonie, retard développemental sévère et décès avant 4 ans (Poduri et al, 2013). L'IRM cérébrale du second enfant montrait une myélinisation retardée. La seule différence entre les deux phénotypes concerne le type de crises épileptiques, qui étaient partielles pour l'EIMSF.

Les enfants suivis à Montpellier présentent une EEIP de type 3 avec un phénotype plus modéré de la maladie, par rapport aux enfants initialement rapportés : absence de SB à l'EEG inter-critique, quelques acquisitions, pas de microcéphalie pré et post-natale, PEV normaux et toujours en vie à 18 ans pour la plus âgée. Les études fonctionnelles ont permis de confirmer l'implication du gène *SLC25A22* dans cette famille.

B. Plusieurs hypothèses existent concernant la physiopathologie

Concernant la physiopathologie, nous pouvons avancer plusieurs hypothèses. En effet, la dysfonction neuronale pourrait résulter :

- d'une anomalie de concentration cytoplasmique du glutamate
- d'une altération secondaire du flux des électrons à travers la chaîne respiratoire
- d'une altération de l'utilisation de l'oxygène dans un groupe de neurones, via la mitochondrie. En effet, la mitochondrie est le site majeur de la synthèse de l'ammonium, spécialement à travers l'action de la glutamate déshydrogénase. Un défaut de synthèse de l'ammonium pourrait également jouer un rôle dans la dysfonction neuronale.

L'épilepsie peut aussi résulter de l'anomalie du turn-over du glutamate. Une neurotransmission efficiente requiert : 1) une faible concentration intra-synaptique du glutamate et 2) un déplacement rapide du neurotransmetteur d'une extrémité à l'autre de la

synapse. Ceci est assuré par la capture rapide du glutamate dans le cytosol des astrocytes, qui est ensuite converti en glutamine.

De plus, il existe deux autres transporteurs mitochondriaux du glutamate, qui échangent un glutamate contre un aspartate : les protéines SLC25A12 et SLC25A13 (Figure 16). Mais les cellules gliales adultes n'expriment pas de manière significative ces transporteurs glutamate/aspartate et le transport mitochondrial du glutamate dépend donc de la protéine SLC25A22 (Ramos et al, 2003). Un défaut de la protéine SLC25A22 entraîne donc un défaut de transport du glutamate au niveau des cellules gliales, non compensé par les transporteurs glutamate/aspartate.

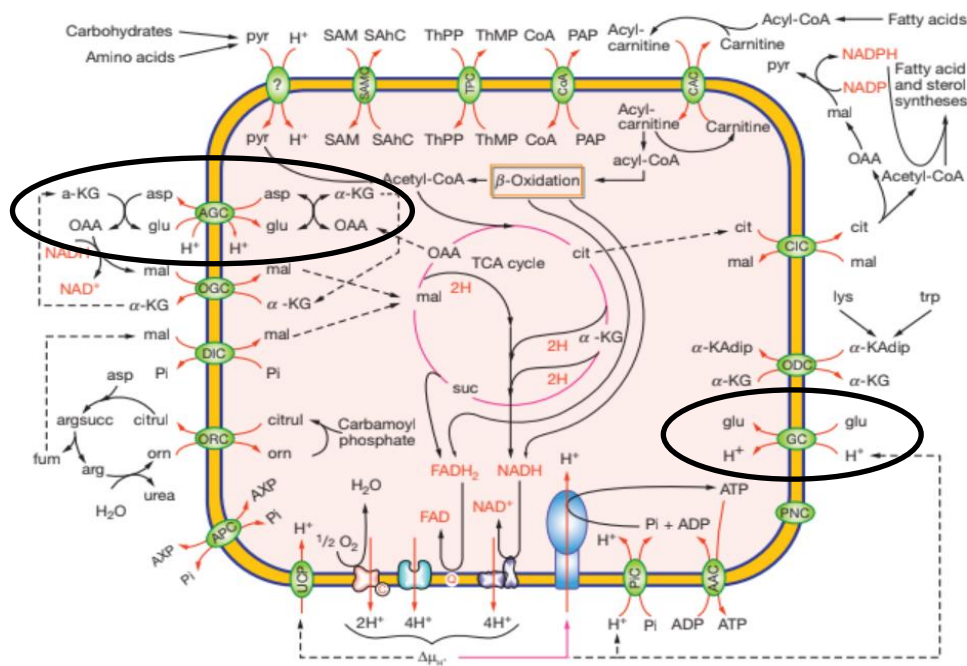


Figure 16 : Métabolisme de la mitochondrie et canaux mitochondriaux. GC : protéine SLC25A22 permettant le transport du glutamate associé à un H⁺. AGC : protéines SLC25A12 ou SLC25A13 permettant le transport du glutamate en échange d'un aspartate. (Source : Palmieri et al, 2013).

Certaines personnes, ayant des variants pathogènes dans le gène *SLC25A22*, ont été décrites avec des altérations de l'ERG ou des PEV. Les photorécepteurs de la rétine ainsi que les neurones expriment, durant la période post-natale, les deux transporteurs mitochondriaux aspartate/glutamate (*SLC25A12* et *SLC25A13*) mais pas les cellules gliales de la rétine, alors que le transporteur glutamate/H⁺ (*SLC25A22*) est exprimé dans les trois types cellulaires (photorécepteurs et cellules gliales de la rétine et neurones visuels) (Xu et al, 2007). Le déficit du transporteur *SLC25A22* ne serait pas suffisamment compensé par l'activité des deux autres transporteurs pour permettre une activité des photorécepteurs normale, et ainsi pourrait expliquer une progressive détérioration de la fonction des photorécepteurs en réponse à un stimulus (Molinari et al, 2009). Les anomalies de l'ERG ou des PEV pourraient donc survenir au cours du temps et nécessiter une surveillance. Les rares données sur le sujet ne nous permettent pas de définir un protocole de surveillance consensuel, mais il semble nécessaire de ne pas se fier à l'interrogatoire pour rechercher des signes d'altération visuelle, du fait de la déficience intellectuelle sévère chez ces enfants.

Dans notre série, 5 enfants (sur les 11 pour lesquels nous avons l'information) présentaient des PEV anormaux et 2 enfants (sur les 8 pour lesquels nous avons l'information) présentaient des anomalies à l'ERG, aucun de ces enfants n'étaient dans le groupe d'EEIP modérée. Cependant, l'ERG et les PEV ont été effectués très tôt, dans les premiers mois de vie. Il est donc possible que ces examens montreraient des anomalies, s'ils étaient réalisés plus tard, y compris dans le groupe des enfants ayant une EEIP modérée.

C. Impact des examens et résultats génétiques pour les enfants et leurs familles

L'identification des variations génétiques impliquées dans la pathologie des enfants nous a permis de proposer une recherche ciblée des variations génétiques causales aux autres membres concernés de la famille et de proposer un séquençage complet du gène *SLC25A22* pour les conjoints. Aucun autre couple au sein de cette famille n'a été identifié à risque d'avoir un enfant atteint de cette pathologie.

De plus, l'identification du diagnostic précis chez ces enfants nous a également permis de proposer un diagnostic prénatal (DPN) précoce ou un diagnostic pré-implantatoire (DPI) aux deux couples. Néanmoins, ceux-ci n'ont pas eu recours à ces techniques car n'ont pas souhaité avoir d'autres enfants.

D. Importance et limite de l'identification d'une corrélation génotype-phénotype

Grâce à l'analyse précise des phénotypes et des génotypes des personnes décrites dans la littérature, ainsi que de nos trois enfants, nous avons mis en évidence que les individus malades portant deux variants localisés dans un domaine hélice transmembranaire, ont un phénotype majoritairement plus sévère, alors que les individus malades portant au moins un variant non situé dans un de ces domaines, ont un phénotype plus modéré (Figure 15). Les domaines hélice transmembranaires sont les domaines constituant le canal de la protéine *SLC25A22* et sont donc essentiels à la fonction principale de la protéine, à savoir transporter le glutamate dans la lumière de la mitochondrie (Palmieri et al, 2013). Nous pouvons donc

supposer qu'un changement d'acide aminé au sein d'un de ces domaines pourrait altérer la conformation du domaine et donc du canal, empêchant son bon fonctionnement.

Cependant, nous devons rester prudents concernant cette corrélation. En effet, peu de personnes ont été rapportés, constituant des groupes de faible effectif : 7 individus dans le groupe de l'EEIP sévère, dont 6 présentant le même variant à l'état homozygote; 2 individus dans le groupe de l'EIMSF, présentant le même variant à l'état homozygote; et 9 individus dans le groupe de l'EEIP modéré.

De plus, seulement 9 variants ont été décrits comme pathogènes dans ce gène, et 4 dont l'implication formelle n'a pas été confirmée par des études fonctionnelles.

Ces limites doivent nous rendre très prudents concernant la possible utilisation de ces données en consultation et l'analyse doit être poursuivie à l'avenir.

V. Conclusion

En conclusion, nous avons défini 3 groupes au sein des pathologies liées au gène *SLC25A22* : le groupe des EEIP de type 3 avec un phénotype sévère, le groupe des EIMFS avec un phénotype sévère, et le groupe des EEIP de type 3 avec un phénotype modéré, et suggéré une association entre la localisation des variants au sein de la protéine et la variabilité de sévérité du phénotype. Des études supplémentaires chez des individus ayant une EEIP de type 3 et une EIMFS sont nécessaires pour délimiter davantage la gamme phénotypique complète associée aux variants du gène *SLC25A22* et mieux définir les corrélations génotype/phénotype des personnes atteintes.

Enfin, et pour finir sur une note d'espoir, malgré le très faible nombre d'enfants atteints, peut être qu'un traitement, soit par épuration du glutamate, soit par thérapie génique, pourrait être envisagé, afin d'éviter la dégradation neurologique liée à l'épilepsie et à la toxicité du glutamate.

Ce travail a été publié dans l'European Journal of Human Genetics, en 2019 (Lemattre C, Imbert-Bouteille M, Gatinois V, et al. Report on three additional patients and genotype-phenotype correlation in *SLC25A22*-related disorders group. *Eur J Hum Genet.* 2019; 27(11):1692-1700. PMID : 31285529).

VI. Bibliographie

Aubert S, Bligny R, Douce R, Gout E, Ratcliffe RG, Roberts JK. Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by ¹³C and ³¹P nuclear magnetic resonance. *J Exp Bot*, 2001. 52: 37-45.

Barat-Houari M, Dumont B, Fabre A, Them FT, Alembik Y, Alessandri JL A *et al.* The expanding spectrum of *COL2A1* gene variants in 136 patients with a skeletal dysplasia phenotype. *Eur J Hum Genet*, 2016. 24: 992-1000.

Berkich DA, Ola MS, Cole J, Sweatt AJ, Hutson SM, LaNoue KF. Mitochondrial transport proteins of the brain. *J Neurosci Res*, 2007. 85: 3367-3377.

Bourgeron T, Chretien D, Rotig A, Munnich A, Rustin P. Fate and expression of the deleted mitochondrial DNA differ between human heteroplasmic skin fibroblast and Epstein-Barr virus-transformed lymphocyte cultures. *J Biol Chem*, 1993. 268: 19369-19376.

Brines ML, Sundaresan S, Spencer DD, De Lanerolle NC. Quantitative autoradiographic analysis of ionotropic glutamate receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy: up-regulation in reorganized epileptogenic hippocampus. *Eur J Neurosci*, 1997. 9: 2035-2044.

Cohen R, Basel-Vanagaite L, Goldberg-Stern H, Halevy A, Shuper A, Feingold-Zadok M *et al.* Two siblings with early infantile myoclonic encephalopathy due to mutation in the gene encoding mitochondrial glutamate/H⁺ symporter *SLC25A22*. *Eur J Paediatr Neurol*, 2014. 18: 801-805.

Coppola G, Plouin P, Chiron C, Robain O, Dulac O. Migrating partial seizures in infancy: a malignant disorder with developmental arrest. *Epilepsia*, 1995. 36(10): 1017-1024.

During MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet*, 1993. 341: 1607-1610.

Fiermonte G, Palmieri L, Todisco S, Agrimi G, Palmieri F, Walker JE. Identification of the mitochondrial glutamate transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J Biol Chem*, 2002. 277(22): 19289-19294.

Goubert E, Mircheva Y, Lasorsa FM, Melon C, Profilo E, Sutura J *et al.* Inhibition of the mitochondrial glutamate carrier SLC25A22 in astrocytes leads to intracellular glutamate accumulation. *Front Cell Neurosci*, 2017. 11: 149.

Milh M, Becq H, Villeneuve N, Ben-Ari Y, Aniksztejn L. Inhibition of glutamate transporters results in a « suppression-burst » pattern and partial seizures in the newborn rat. *Epilepsia*, 2007. 48: 169-174.

Molinari F, Raas-Rothschild A, Rio M, Fiermonte G, Encha-Razavi F, Palmieri L *et al.* Impaired mitochondrial glutamate transport in autosomal recessive neonatal myoclinic epilepsy. *Am J Hum Genet*, 2005. 76: 334-339.

Molinari F, Kaminska A, Fiermonte G, Boddaert N, Raas-Rothschild A, Plouin P *et al.* Mutations in the mitochondrial glutamate carrier *SLC25A22* in neonatal epileptic encephalopathy with suppression bursts. *Clin Genet*, 2009. 76: 188-194.

Ohtahara S, Yamatogi Y. Epileptic encephalopathies in early infancy with suppression-burst. *J Clin Neurophysiol*, 2003. 20(6): 398-407.

Palmieri F. The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology. *Mol Aspects Med*, 2013. 34: 465-484.

Poduri A, Heinzen EL, Chitsazzadeh V, Lasorsa FM, Elhosary PC, LaCoursiere CM *et al.* *SLC25A22* is a novel gene for migrating partial seizures in infancy. *Ann Neurol*, 2013. 74: 873-882.

Ramos M, del Arco A, Pardo B, Martinez-Serrano A, Martinez-Morales JR, Kobayashi K *et al.* Developmental changes in the Ca²⁺-regulated mitochondrial aspartate-glutamate carrier

aralar1 in brain and prominent expression in the spinal cord. *Brain Res Dev Brain Res*, 2003. 143: 33-46.

Reid ES, Williams H, Anderson G, Benatti M, Chong K, James C *et al.* Mutations in *SLC25A22*: hyperprolinaemia, vacuolated fibroblasts and presentation with developmental delay. *J Inherit Metab Dis*, 2017. 40: 385-394.

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM *et al.* Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*, 1994. 228: 35-51.

Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L *et al.* ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 2017. 58(4): 512-521.

Xu Y, Ola MS, Berkich DA, Gardner TW, Barber AJ, Palmieri F, *et al.* Energy sources for glutamate neurotransmission in the retina: absence of the aspartate/glutamate carrier produces reliance on glycolysis in glia. *J Neurochem*, 2007. 101: 120-131.

VII. Annexes

A. Annexe 1 : Liste des sous-types d'EEIP classés en fonction du gène impliqué.

EEIP	Gène	Position	Mode de transmission
EEIP de type 1	Gène <i>ARX</i>	Xp21.3	XLR
EEIP de type 2	Gène <i>CDKL5</i>	Xp22.13	XLD
EEIP de type 3	Gène <i>SLC25A22</i>	11p15.5	AR
EEIP de type 4	Gène <i>STXBP1</i>	9q34.11	AD
EEIP de type 5	Gène <i>SPTAN1</i>	9q34.11	AD
EEIP de type 6 ou syndrome de Dravet	Gène <i>SCN1A</i>	2q24.3	AD
EEIP de type 7	Gène <i>KCNQ2</i>	20q13.33	AD
EEIP de type 8	Gène <i>ARHGEF9</i>	Xq11.1	XLR
EEIP de type 9	Gène <i>PCDH19</i>	Xq22.1	XL
EEIP de type 10	Gène <i>PNKP</i>	19q13.33	AR
EEIP de type 11	Gène <i>SCN2A</i>	2q24.3	AD
EEIP de type 12	Gène <i>PLCB1</i>	20p12.3	AR
EEIP de type 13	Gène <i>SCN8A</i>	12q13.13	AD
EEIP de type 14	Gène <i>KCNT1</i>	9q34.3	AD
EEIP de type 15	Gène <i>ST3GAL3</i>	1p34.1	AR
EEIP de type 16	Gène <i>TBC1D24</i>	16p13.3	AR
EEIP de type 17	Gène <i>GNAO1</i>	16q13	AD
EEIP de type 18	Gène <i>SZT2</i>	1p34.2	AR
EEIP de type 19	Gène <i>GABRA1</i>	5q34	AD
EEIP de type 20	Gène <i>PIGA</i>	Xp22.2	XLR
EEIP de type 21	Gène <i>NECAP1</i>	12p13.31	AR
EEIP de type 22	Gène <i>SLC35A2</i>	Xp11.23	XLD
EEIP de type 23	Gène <i>DOCK7</i>	1p31.3	AR
EEIP de type 24	Gène <i>HCN1</i>	5p12	AD
EEIP de type 25	Gène <i>SLC13A5</i>	17p13.1	AR
EEIP de type 26	Gène <i>KCNB1</i>	20q13.13	AD
EEIP de type 27	Gène <i>GRIN2B</i>	12p13.1	AD

EEIP de type 28	Gène <i>WWOX</i>	16q23.1	AR
EEIP de type 29	Gène <i>AARS</i>	16q22.1	AR
EEIP de type 30	Gène <i>SIK1</i>	21q22.3	AD
EEIP de type 31	Gène <i>DNM1</i>	9q34.11	AD
EEIP de type 32	Gène <i>KCNA2</i>	1p13.3	AD
EEIP de type 33	Gène <i>EEF1A2</i>	20q13.33	AD
EEIP de type 34	Gène <i>SLC12A5</i>	20q13.12	AR
EEIP de type 35	Gène <i>ITPA</i>	20p13	AR
EEIP de type 36	Gène <i>ALG13</i>	Xq23	XL
EEIP de type 37	Gène <i>FRRS1L</i>	9q31.3	AR
EEIP de type 38	Gène <i>ARV1</i>	1q42.2	AR
EEIP de type 39	Gène <i>SLC25A12</i>	2q31.1	AR
EEIP de type 40	Gène <i>GUF1</i>	4p12	AR
EEIP de type 41	Gène <i>SLC1A2</i>	11p13	AD
EEIP de type 42	Gène <i>CACNA1A</i>	19p13.13	AD
EEIP de type 43	Gène <i>GABRB3</i>	15q12	AD
EEIP de type 44	Gène <i>UBA5</i>	3q22.1	AR
EEIP de type 45	Gène <i>GABRB1</i>	4p12	AD
EEIP de type 46	Gène <i>GRIN2D</i>	19q13.33	AD
EEIP de type 47	Gène <i>FGF12</i>	3q28	AD
EEIP de type 48	Gène <i>AP3B2</i>	15q25.2	AR
EEIP de type 49	Gène <i>DENND5A</i>	11p15.4	AR
EEIP de type 50	Gène <i>CAD</i>	2p23.3	AR
EEIP de type 51	Gène <i>MDH2</i>	7q11.23	AR
EEIP de type 52	Gène <i>SCN1B</i>	19q13.11	AR
EEIP de type 53	Gène <i>SYNJ1</i>	21q22.11	AR
EEIP de type 54	Gène <i>HNRNPU</i>	1q44	AD
EEIP de type 55	Gène <i>PIGP</i>	21q22.13	AR
EEIP de type 56	Gène <i>YWHAG</i>	7q11.23	AD
EEIP de type 57	Gène <i>KCNT2</i>	1q31.3	AD
EEIP de type 58	Gène <i>NTRK2</i>	9q21.33	AD
EEIP de type 59	Gène <i>GABBR2</i>	9q22.33	AD
EEIP de type 60	Gène <i>CNPY3</i>	6p21.1	AR
EEIP de type 61	Gène <i>ADAM22</i>	7q21.12	AR

EEIP de type 62	Gène <i>SCN3A</i>	2q24.3	AD
EEIP de type 63	Gène <i>CPLX1</i>	4p16.3	AR
EEIP de type 64	Gène <i>RHOBTB2</i>	8p21.3	AD
EEIP de type 65	Gène <i>CYFIP2</i>	5q33.3	AD
EEIP de type 66	Gène <i>PACS2</i>	14q32.33	AD
EEIP de type 67	Gène <i>CUX2</i>	12q24.11-q24.12	AD
EEIP de type 68	Gène <i>TRAK1</i>	3p22.1	AR
EEIP de type 69	Gène <i>CACNA1E</i>	1q25.3	AD
EEIP de type 70	Gène <i>PHACTR1</i>	6p24.1	AD
EEIP de type 71	Gène <i>GLS</i>	2q32.2	AR
EEIP de type 72	Gène <i>NEUROD2</i>	17q12	AD
EEIP de type 73	Gène <i>RNF13</i>	3q25.1	AD
EEIP de type 74	Gène <i>GABRG2</i>	5q34	AD
EEIP de type 75	Gène <i>PARS2</i>	1p32.3	AR
EEIP de type 76	Gène <i>ACTL6B</i>	7q22.1	AR
EEIP de type 77	Gène <i>PIGQ</i>	16p13.3	AR
EEIP de type 78	Gène <i>GABRA2</i>	4p12	AD
EEIP de type 79	Gène <i>GABRA5</i>	15q12	AD
EEIP de type 80	Gène <i>PIGB</i>	15q21.3	AR
EEIP de type 81	Gène <i>DMXL2</i>	15q21.2	AR
EEIP de type 82	Gène <i>GOT2</i>	16q21	AR
EEIP de type 83	Gène <i>UGP2</i>	2p15	AR
EEIP de type 84	Gène <i>UGDH</i>	4p14	AR
EEIP de type 85	Gène <i>SMC1A</i>	Xp11.22	XLD
EEIP de type 86	Gène <i>DALRD3</i>	3p21.31	AR
EEIP de type 87	Gène <i>CDK19</i>	6q21	AD
EEIP de type 88	Gène <i>MDH1</i>	2p15	AR
EEIP de type 89	Gène <i>GAD1</i>	2q31.1	AR

B. Annexe 2 : Visualisation 3D de la position des variants étudiés au sein de la protéine SLC25A22

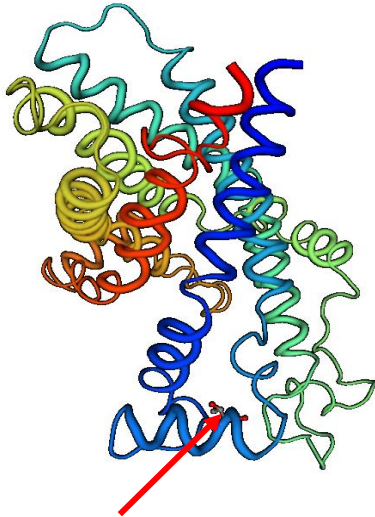


Figure 1 : Visualisation 3D de la position du variant p.(Thr56Pro) au sein de la protéine SLC25A22. (Source : <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9H936>).

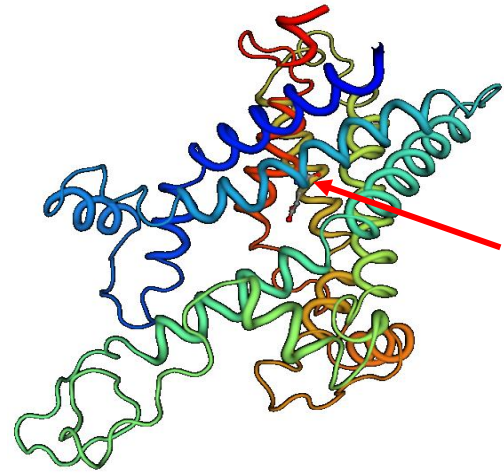


Figure 2 : Visualisation 3D de la position du variant p.(Glu79Lys) au sein de la protéine SLC25A22. (Source : <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9H936>).

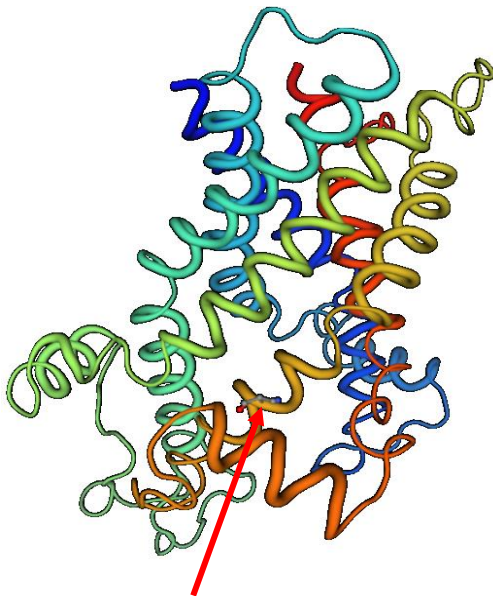


Figure 3 : Visualisation 3D de la position du variant p.(Val249Glu) au sein de la protéine SLC25A22. (Source : <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9H936>).

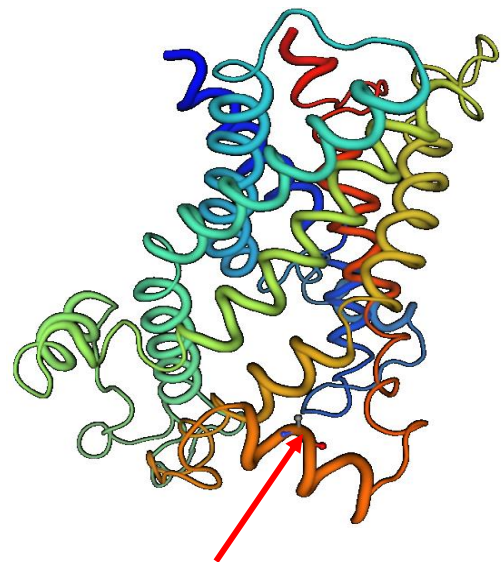


Figure 4 : Visualisation 3D de la position du variant p.(Ala272Glnfs*144) au sein de la protéine SLC25A22. (Source : <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9H936>).

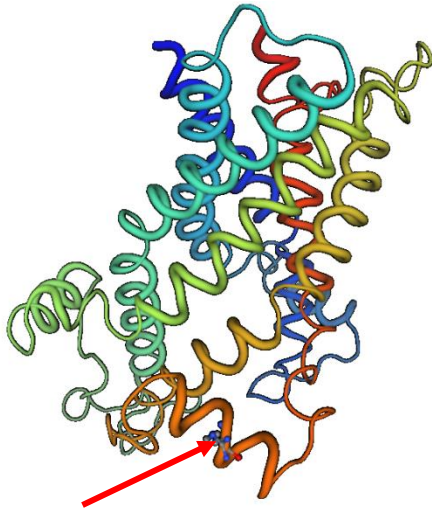


Figure 5 : Visualisation 3D de la position du variant p.(Arg273Lys) au sein de la protéine SLC25A22. (Source : <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9H936>).

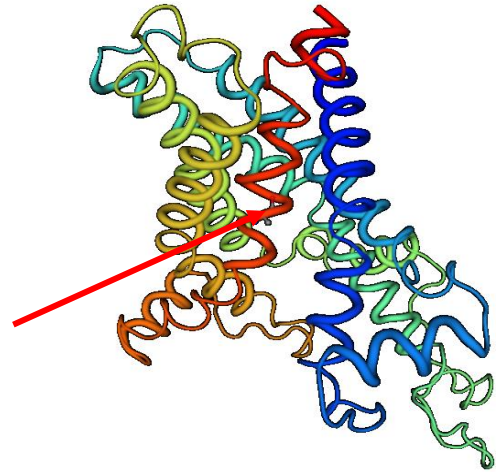


Figure 6 : Visualisation 3D de la position du variant p.(Ala296Thr) au sein de la protéine SLC25A22. (Source : <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9H936>).

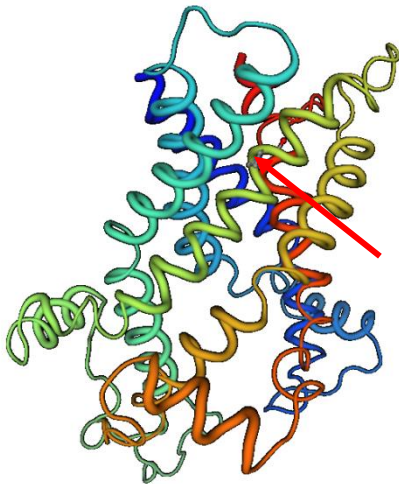


Figure 7 : Visualisation 3D de la position du variant p.(Pro206Leu) au sein de la protéine SLC25A22. (Source : <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9H936>).

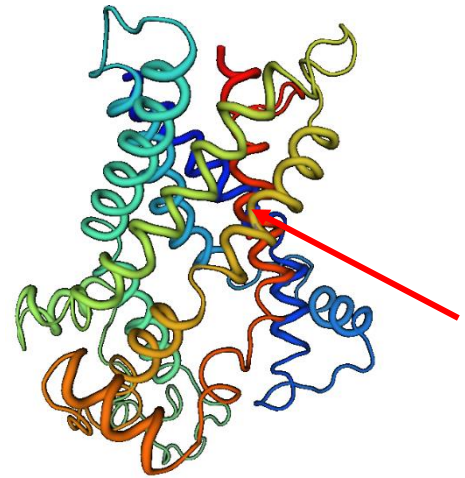


Figure 8 : Visualisation 3D de la position du variant p.(Gly236Trp) au sein de la protéine SLC25A22. (Source : <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9H936>).

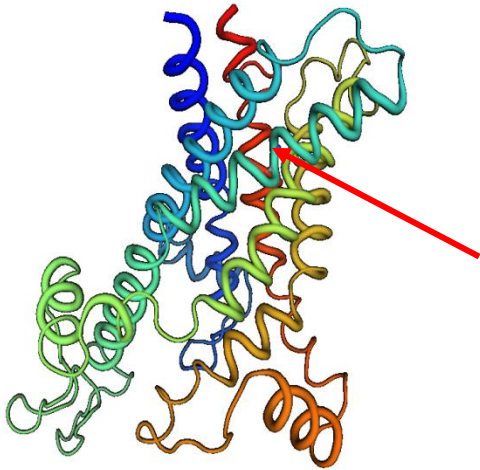


Figure 9 : Visualisation 3D de la position du variant p.(Gly110Arg) au sein de la protéine SLC25A2. (Source : <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9H936>).

C. Annexe 3 : Critères permettant le classement de variation génomique

selon l'ACMG.

PVS1 : Variant nul (nonsens, frameshift, site d'épissage canonique ± 1 ou 2, codon d'initiation, délétion d'un ou de plusieurs exons) dans un gène intolérant à la perte de fonction.

PS1 : Même changement d'acide aminé qu'un variant pathogène précédemment établi quel que soit le changement de nucléotide.

PS3 : Études fonctionnelles bien établies in vitro ou in vivo soutenant un effet néfaste sur le gène ou le produit génique.

PS4 : La prévalence du variant chez les personnes touchées est significativement augmentée par rapport à la prévalence chez les témoins.

PM1 : Situé dans un hotspot de mutation et / ou dans un domaine fonctionnel critique et bien établi (par exemple, site actif d'une enzyme) sans variation bénigne.

PM2 : Absent des bases de données de contrôles (ou à une fréquence extrêmement basse si récessif) dans Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project ou Exome Aggregation Consortium.

PM3 : Pour les maladies récessives, détecté en trans d'un variant pathogène.

PM4 : Modifications de la longueur de la protéine à la suite de suppressions / insertions en phase, dans une région sans répétition ou de variants dans le codon stop.

PM5 : Nouveau variant faux-sens au niveau d'un acide aminé où un autre faux-sens déterminé comme pathogène a déjà été observé.

PM6 : Présumé de novo, mais sans confirmation paternelle et maternelle.

PP1 : Coségrégation avec la pathologie chez plusieurs membres de la famille atteints dans un gène définitivement connu pour causer la maladie.

PP2 : Variant faux-sens dans un gène qui a un faible taux de variation faux-sens bénin et dans lequel les variantes faux-sens sont un mécanisme commun de la maladie.

PP3 : Plusieurs preuves in-silico soutenant un effet délétère sur le gène ou le produit du gène (conservation, évolution, impact d'épissage, etc.)

PP4 : Le phénotype ou les antécédents familiaux du patient sont très spécifiques d'une maladie ayant une seule étiologie génétique.

PP5 : Une source réputée a récemment signalé un variant comme pathogène, mais les preuves ne sont pas disponibles au laboratoire pour effectuer une évaluation indépendante.

BA1 : La fréquence de l'allèle est $> 5\%$ dans Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project ou Exome Aggregation Consortium.

BS1 : La fréquence de l'allèle est plus élevée qu'attendu dans la pathologie.

BS2 : Observé chez un adulte en bonne santé pour une pathologie récessive (homozygote), dominante (hétérozygote) ou liée à l'X (hémizygote), avec une pleine pénétrance attendue à un âge précoce.

BS3 : Des études fonctionnelles bien établies in vitro ou in vivo ne montrent aucun effet néfaste sur la fonction protéique ou l'épissage.

BS4 : Absence de ségrégation chez les membres affectés par la maladie d'une famille.

BP1 : Variant faux-sens dans un gène pour lequel des variants principalement tronqués sont connus pour provoquer la maladie.

BP2 : Observé en trans d'un variant pathogène pour un gène / pathologie dominant entièrement pénétrant ou observé en cis d'un variant pathogène dans n'importe quel modèle de transmission.

BP3 : Délétions/insertions en phase dans une région répétée sans fonction connue.

BP4 : Plusieurs preuves in-silico ne suggèrent aucun impact sur le gène ou le produit du gène (conservation, évolution, impact d'épissage, etc.).

BP5 : Variant trouvé chez une personne ayant une base moléculaire alternative pour la maladie.

BP6 : Une source réputée a récemment signalé le variant comme bénin, mais les preuves ne sont pas disponibles au laboratoire pour effectuer une évaluation indépendante.

BP7 : Variant synonyme (silencieux) pour lequel les algorithmes de prédiction d'épissage ne prédisent aucun impact sur la séquence consensus d'épissage ni la création d'un nouveau site d'épissage ET le nucléotide n'est pas hautement conservé.

D. Annexe 4 : Article publié dans l'European Journal of Human Genetics

European Journal of Human Genetics
<https://doi.org/10.1038/s41431-019-0433-2>



ARTICLE



Report on three additional patients and genotype–phenotype correlation in *SLC25A22*-related disorders group

Camille Lemattre¹ · Marion Imbert-Bouteille¹ · Vincent Gatinois¹ · Paule Benit² · Elodie Sanchez^{1,3} · Thomas Guignard¹ · Frédéric Tran Mau-Them^{1,4} · Emmanuelle Haquet¹ · François Rivier⁵ · Emilie Came⁵ · Agathe Roubertie⁵ · Anne Boland⁶ · Doris Lechner⁶ · Vincent Meyer⁶ · Julien Thevenon⁷ · Yannis Duffourd⁴ · Jean-Baptiste Rivière^{6,4} · Jean-François Deleuze⁶ · Constance Wells¹ · Florence Molinar⁸ · Pierre Rustin² · Patricia Blanchet¹ · David Geneviève^{1,3}

Received: 26 October 2018 / Revised: 6 May 2019 / Accepted: 14 May 2019
© European Society of Human Genetics 2019

Abstract

Early infantile epileptic encephalopathy (EIEE) is a heterogeneous group of severe forms of age-related developmental and epileptic encephalopathies with onset during the first weeks or months of life. The interictal electroencephalogram (EEG) shows a “suppression burst” (SB) pattern. The prognosis is usually poor and most children die within the first two years or survive with very severe intellectual disabilities. EIEE type 3 is caused by variants affecting function, in *SLC25A22*, which is also responsible for epilepsy of infancy with migrating focal seizures (EIMFS). We report a family with a less severe phenotype of EIEE type 3. We performed exome sequencing and identified two unreported variants in *SLC25A22* in the compound heterozygous state: NM_024698.4: c.[813_814delTG];[818 G>A] (p.[Ala272Glnfs*144];[Arg273Lys]). Functional studies in cultured skin fibroblasts from a patient showed that glutamate oxidation was strongly defective, based on a literature review. We clustered the 18 published patients (including those from this family) into three groups according to the severity of the *SLC25A22*-related disorders. In an attempt to identify genotype–phenotype correlations, we compared the variants according to the location depending on the protein domains. We observed that patients with two variants located in helical transmembrane domains presented a severe phenotype, whereas patients with at least one variant outside helical transmembrane domains presented a milder phenotype. These data are suggestive of a continuum of disorders related to *SLC25A22* that could be called *SLC25A22*-related disorders. This might be a first clue to enable geneticists to outline a prognosis based on genetic molecular data regarding the *SLC25A22* gene.

The first two authors contributed equally: Camille Lemattre, Marion Imbert-Bouteille

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41431-019-0433-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ David Geneviève
d-genevieve@chu-montpellier.fr

¹ Département de Génétique Médicale, Maladies Rares et Médecine Personnalisée, Centre de Référence Anomalies du Développement et Syndromes Malformatifs, Université de Montpellier, CHU de Montpellier, France

² Inserm UMR 1141 - PROTECT, Hôpital Robert Debré, 48, Boulevard Sérurier, 75019 Paris, France

³ Unité Inserm, U1183 CHU de Montpellier, France

⁴ Laboratoire de Génétique Moléculaire, Plateau Technique de Biologie, Université de Bourgogne, CHRU Dijon, France

Introduction

Early infantile epileptic encephalopathy (EIEE) is a large group of the most severe forms of age-related developmental and epileptic encephalopathic diseases. It is

⁵ Service de Neuropédiatrie, Université de Montpellier, CHU de Montpellier, France

⁶ Centre National de Recherche en Génomique Humaine (CNRGH), Institut de Biologie François Jacob, CEA, Université Paris-Saclay, F-91057 Evry, France

⁷ Département de Génétique et Procréation, Hôpital Couple-Enfant, Université de Grenoble, CHU de Grenoble, France

⁸ INSERM, INMED, Aix Marseille University, Marseille, France

characterized by erratic refractory seizures, usually myoclonic, with an onset during the first weeks or months of life associating with severe developmental delay, often evolving into West syndrome. There are about 70 types of EIEE classified based on the gene involved. In the majority of EIEE, the interictal electroencephalogram (EEG) shows typically a “suppression burst” (SB) pattern with high-voltage bursts of slow waves mixed with multifocal spikes alternating with isoelectric suppression phases [1]. In most cases, brain structural abnormalities are observed [1]. The prognosis is usually poor and most children die within the first two years of life or survive with very severe intellectual disabilities [1]. The EIEE type 3 (OMIM #609304) is characterized by myoclonic seizures, severe global hypotonia, microcephaly, SB pattern, and abnormal electroretinogram (ERG) [2]. EIEE type 3 is caused by variants affecting function in the solute carrier family 25 member 22 gene (*SLC25A22*, OMIM #609302) [2, 3]. *SLC25A22* encodes a 323 amino acids mitochondrial glutamate/H⁺ symporter that is particularly expressed in the brain [4]. Initially, seven patients from three consanguineous families were reported [2, 3, 5]. These seven patients presented a similar severe phenotype: early-onset seizures, severe hypotonia, microcephaly, abnormalities on brain imaging, SB pattern, and died at 8-year-old age or were reported in a vegetative state. Recently, Reid et al. reported six additional children from three families, presenting variants in *SLC25A22* and milder phenotypes than the previous reported patients [6]. In addition, *SLC25A22* is also involved in epilepsy of infancy with migrating focal seizures (EIMFS, previously migrating partial seizures in infancy [7]), a severe epileptic encephalopathy with onset in infancy. It was identified in two children who had hemiconvulsive seizures with an onset in the first weeks of life and died before 4 years of age [8].

We report here three additional patients from a multiplex family with variants in *SLC25A22* and a less severe phenotype of EIEE type 3 combined with functional studies. We suggest a delineation of the *SLC25A22*-related disorders group as well as a genotype–phenotype correlation.

Materials and methods

Clinical data

Patient one is a 15-year-old girl of Caucasian origin. She is the first child of unrelated and healthy parents. She had one healthy brother and one affected brother. She was born full term after a normal pregnancy with birth weight (BW) 3865 g (70th centile), birth length (BL) 53 cm (75th centile), and birth head circumference (BHC) 35 cm (50th centile). Epilepsy started on her 3rd day of life with clonic seizures

followed by generalized myoclonic seizures, and hypertonic seizures, initially refractory to treatment. Seizures were transiently controlled with two medications from 5 years: levetiracetam and clobazam, but the generalized myoclonic seizures recurred at 11 years. The interictal EEG, at 3 months, was normal and, at 1 year, did not show SB but there was slow electrogenesis and sharp waves. From the first months of life, she had severe axial and peripheral hypotonia. At 1 year, she had a kinetic and static ataxia, an important axial hypotonia and frequent dyskinesia interfering with the gripping of objects. Behavioral disturbances with inconsolable crying, sleep disturbances, and self-mutilation disturbances started on 18 months. She had severe global developmental delay from the first months of life (head holding at 8 months, sitting posture at 2 years, and crawl at 8 years). Her motor development deteriorated at 11 years, and she did not crawl at 13 years. At 15 years, she had severe global developmental delay, sleep disturbances, and mostly seizures. She had no language and could not sit still. Occipito-frontal circumference (OFC) is 54 cm (20th centile). Brain MRI, at 6 months, showed an expansion of peri-cerebral fluid spaces, then at 18 months, a cortical-subcortical atrophy predominant in frontal regions. A brain MRI control, at 13 years, did not find any anomalies. Heart and kidney ultrasound and visual evoked potentials (VEP) were normal. Array CGH (Agilent; Affymetrix snp6.0) did not detect any abnormality (arr(1-22,X)x2). Metabolic assays were within normal range, including blood count, liver enzymes, lactic acid blood and very long chain fatty acids blood concentrations, analysis for congenital disorders of glycosylation, and blood amino acids chromatography.

Patient 2 is the 10-year-old brother of patient 1. He was born full term after a normal pregnancy, with BW at 4570 g (98th centile), BL at 52 cm (50th centile), and BHC at 37 cm (96th centile). Epilepsy started at 1 month with generalized myoclonic and tonic-clonic seizures, also initially refractory to treatment. His seizures were partially controlled from 3 years, but the generalized myoclonic seizures recurred at 6 years and were treated by valproate, levetiracetam, and phenobarbital at 10 years. The interictal EEG, at 1 month, was normal and, at 1 year, showed slow electrogenesis but no SB. From the first months of life, he was severe axial and peripheral hypotonia and dyskinetic movements started. Behavioral disturbances with sleep disturbances started on 3 years. He was severely globally delayed. He held his head temporarily at 18 months, but he presented a motor regression after 6 years. He neither walked nor spoke. Physical examination at 9 years revealed axial and peripheral hypotonia. He had dystonic and dyskinetic movements, scoliosis, and bilateral cryptorchidism. His OFC was 52 cm (20th centile). Brain MRI showed increased anterior peri-cerebral spaces, at 3 months, and showed cerebral atrophy, at 18 months. Heart and

kidney ultrasound and VEP were normal. Array CGH (Agilent; Affymetrix snp6.0) did not detect any abnormality (arr(1-22)x2,(X,Y)x1). Metabolic assays were normal, including blood count, liver enzymes, lactic acid blood and very long chain fatty acids blood concentrations, analysis for congenital disorders of glycosylation, and blood amino acids chromatography.

Patient 3 is patients 1 and 2's first-degree cousin: their mothers are sisters and their fathers are distant cousins (Fig. 1b). She is a Caucasian 5-year-old girl, the only child of healthy unrelated parents. She was born full term after a normal pregnancy. She had a BW at 3770 g (50th centile), a BL at 51 cm (50th centile), and a BHC at 35 cm (50th centile). Her seizures started aged 6 weeks with generalized myoclonic seizures, clonic seizures, and cyanotic episodes of uncertain cause. Epilepsy was controlled by clobazam and valproate from 2 years. The interictal EEG, at 4 years, showed a poor and disorganized background and several sharp waves. She had severe global hypotonia, developmental delay, and sleep disturbances that appeared at 18 months and aggravated at 5 years, for which she has been taking melatonin from 18 months. At 5 years, she does not crawl and has no language and she starts to hold her head. Her weight was 19 kg (85th centile), her length was 110 cm (85th centile), and her OFC was 49 cm (18th centile). Brain MRI at 1 year was normal. STXBPI,

KCNQ2 targeted sequencing, and array CGH (Agilent; Affymetrix snp6.0) were normal (arr(1-22,X)x2).

Patients' features from this report and the literature are summarized in the Table 1.

Exome sequencing

DNA from patient 2 and his mother and patient 3 and her father were studied using exome sequencing (Centre National de Recherche en Génomique Humaine, Institut de Biologie François Jacob, CEA). After complete DNA quality control for each sample (duplicate quantification, evaluating DNA integrity/quality, and checking for absence of PCR inhibitors), genomic DNA (3 µg) was captured by using an in-solution enrichment method (Human All Exon v5–50 Mb, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Library preparation and exome enrichment (~20,000 targeted genes) was performed automatically by using NGSx (Perkin Elmer, MA, USA) and Bravo (Agilent Technologies), respectively, according to the manufacturer's instructions (SureSelect, Agilent Technologies). After normalization and quality control, exome-enriched libraries were sequenced by using the Illumina HiSeq2000 system (Illumina, CA, USA) as paired-end 100-bp reads. Samples were sequenced as pools of four samples per lane, to obtain an average coverage of 70–80×, with at least 80% of the

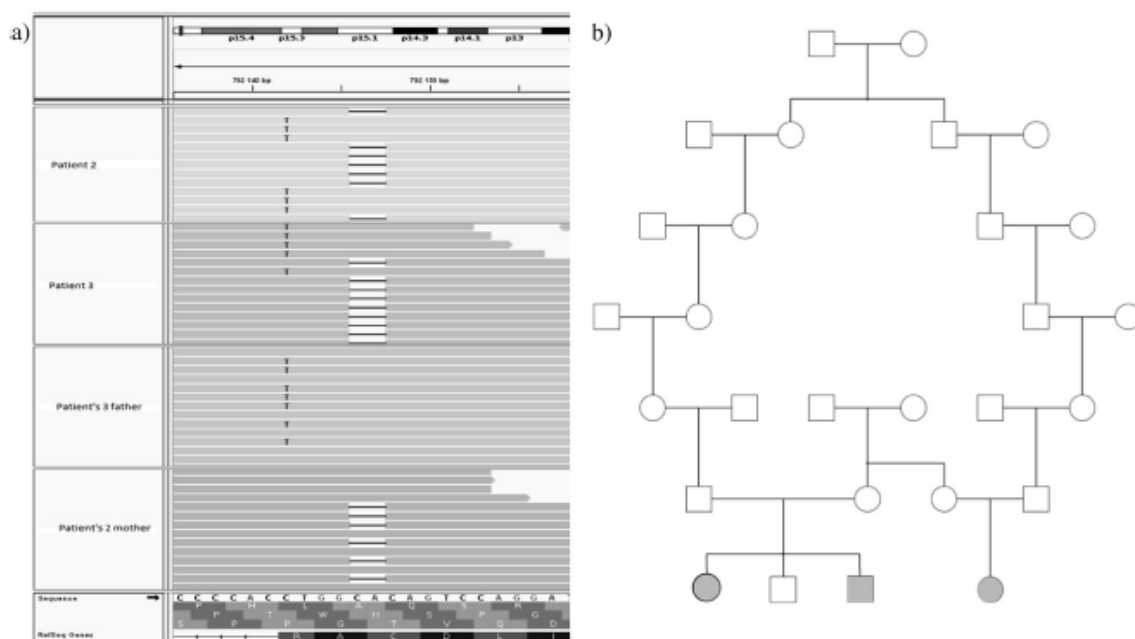


Fig. 1 a Visualization of variants by integrative genomics viewer (IGV). The sequence is the complementary sequence of genomic DNA. The first two lines correspond to patients 2 and 3. They shared compound heterozygous variants NM_024698.4: c.[813_814delTG];

[818G>A]. The third line corresponds to the father of patient 2 who carries the variant c.818G>A. The fourth line corresponds to the mother of patient 3 who carries the variant c.813_814delTG. b Pedigree

Table 1 Clinical features of individuals with variants in *SLC25A22* and EIEE phenotype, including updates of the published patients (Molinari et al. 2005 [patients 12–15]; Molinari et al. 2009 [patient 16]; Cohen et al. 2014 [patients 17 and 18]; Poduri et al. 2014 [patients 10 and 11]; Reid et al. 2017 [patients 4–9]). Patients 1–3 are reported here

Group	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	MFS1	MFS2	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe							
Patient	P. 1	P. 2	P. 3	P. 4	P. 5	P. 6	P. 7	P. 8	P. 9	P. 10	P. 11	P. 12	P. 13	P. 14	P. 15	P. 16	P. 17	P. 18	Total	
Sex	F	M	F	M	M	M	F	F	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	9F/9M	
Ethnic group	Caucasian	Caucasian	Caucasian	Arab	Arab	Arab	Arab	Arab	Caucasian	Arab	Arab	Arab	Arab	Arab	Arab	Arab	Arab	Arab	4 Caucasian/ 14 Arab	
Parental consanguinity	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	14 Parental consanguinity (78%)	
Age of onset seizure	3 days	1 month	6 weeks	6 weeks	16 weeks	16 weeks	First month	7 years	6 weeks	1 week	2 weeks	Birth	Birth	Birth	Birth	5 days	First months	2 weeks	15/17 before	
Neurological examination	Hypotonia, severe ataxia, developmental delay (1 day)	Hypotonia, severe ataxia, developmental delay (1 day)	Hypotonia, severe ataxia, developmental delay (1 day)	Severe developmental delay (1 day), global hypotonia, and severe ataxia	Severe developmental delay (1 day), global hypotonia, and severe ataxia	Severe developmental delay (1 day), global hypotonia, and severe ataxia	Developmental delay (10 months), global hypotonia, and severe ataxia	Developmental delay (10 months), global hypotonia, and severe ataxia	Developmental delay (10 months), global hypotonia, and severe ataxia	Developmental delay (10 months), global hypotonia, and severe ataxia	Developmental delay (10 months), global hypotonia, and severe ataxia	Developmental delay (10 months), global hypotonia, and severe ataxia	Developmental delay (10 months), global hypotonia, and severe ataxia	Developmental delay (10 months), global hypotonia, and severe ataxia	Developmental delay (10 months), global hypotonia, and severe ataxia	Developmental delay (10 months), global hypotonia, and severe ataxia	Developmental delay (10 months), global hypotonia, and severe ataxia	Developmental delay (10 months), global hypotonia, and severe ataxia	Developmental delay (10 months), global hypotonia, and severe ataxia	Developmental delay (10 months), global hypotonia, and severe ataxia
Seizure type	Myoclonic	Myoclonic	Myoclonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	Myoclonic and tonic-clonic	
Response to AEDs	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	
EEG	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	No SR, slow down, sharp waves	
VEP	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	
ERG	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	
Brain imaging	Normal	Subarachnoid enlargement	Normal	Fronto-temporal atrophy, global hypotonia, and severe ataxia	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	
Metabolic evaluation	Normal	Normal	Normal	Hypoparathyroidism	Hypoparathyroidism	Hypoparathyroidism	Hypoparathyroidism	Normal	Hypoparathyroidism	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	

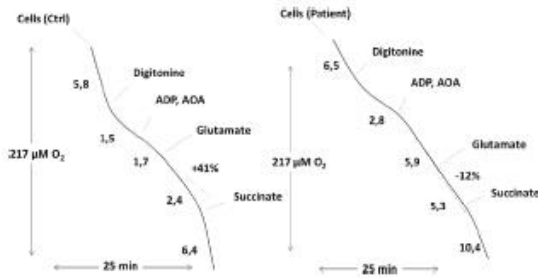


Fig. 2 Respiration and mitochondrial substrate oxidation in cultured skin fibroblasts from one patient and one control. After polarographic measurement of intact cell respiration, digitonin-permeabilized cells were loaded with adenosine diphosphate (ADP) and amino oxycetate. This compound inhibits the aspartate-amino transferase enzyme activity. A subsequent addition of glutamate allowed estimation of mitochondrial glutamate oxidation under phosphorylation conditions (i.e., presence of ADP). Note the lack of glutamate-triggered oxygen uptake in the patient’s cells. A similar succinate oxidation rate was measured in control’s and patient’s cells. The dotted line corresponds to the speed of consumption of O₂ by cells. After addition of glutamate, the speed rises by 41% in the control’s cells and decreases by 12% in the patient’s cells. Numbers along the traces are nmol O₂ consumed per minute per milligram of protein. AOA = amino oxycetate; Asp = aspartate; Glut = glutamate; α -KG = α -ketoglutarate; OAA = oxaloacetate. Experimental conditions were as described in the “Materials and methods” section

permeabilization of cell membranes by digitonin in the presence of amino oxycetate, a specific inhibitor of amino-aspartate transferase, the patient’s cells failed to oxidize glutamate normally in comparison with controls, whereas oxidation of another substrate (succinate) was normal in the patient’s cells. These results provide evidence that the patient’s cells show a clear defect in mitochondrial glutamate metabolism, which is consistent with the involvement of the variants in *SLC25A22* in the disease of the children.

Discussion

EIEE type 3 is a rare and severe genetic disorder due to variants affecting the functioning of protein *SLC25A22*. The *SLC25A22* protein is highly expressed in brain, particularly in areas dedicated to motor coordination (red nuclei, olivary complexes, pontocerebellar nuclei, and substantia nigra). *SLC25A22* is more abundant in astrocytes, where it controls glutamate uptake [15, 16]. The protein is localized in the inner mitochondrial membrane and catalyzes glutamate/H⁺-symporter for the transport of glutamate into the mitochondria. The absence of functional *SLC25A22* protein would lead to the dysregulation of extracellular glutamate

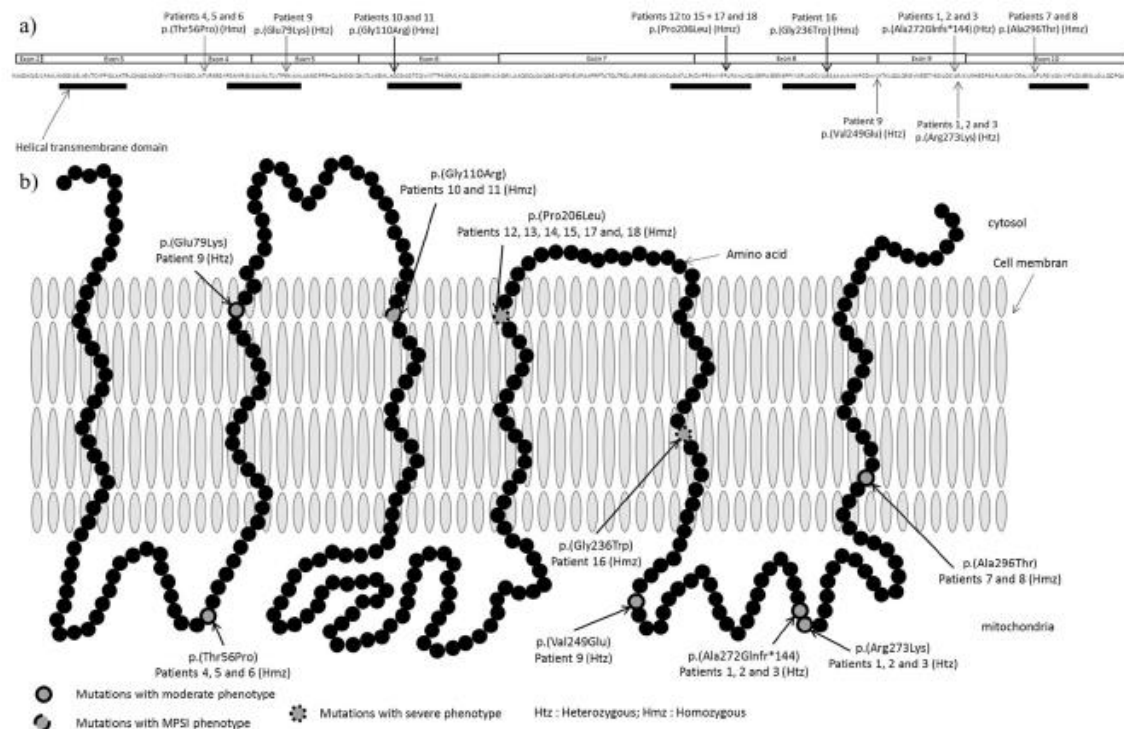


Fig. 3 Visualization of variants in *SLC25A22*. **a** Linear visualization of patient’s variants. Htz = heterozygote; Hmz = homozygote. **b** 2-D visualization of variants in *SLC25A22* protein

and activation of the extrasynaptic glutamate receptors [16, 17]. This could impair the cAMP response element binding protein shut-off pathway that would be responsible for long-lasting protection against apoptosis to neural death induction [18], and consequently, inactivation of the pro-survival extracellular signal regulated kinase [19] and neuronal excitability [2].

The first patients reported in the literature either died during the first year of life or survived in a persistent vegetative state [2, 3, 5]. However, recently, Reid et al. described six additional patients with variants in *SLC25A22* and a milder phenotype [6]. To date, six different variants affecting function of protein have been described (Fig. 3a).

SLC25A22 is also involved in EIMFS [8], a severe developmental and epileptic encephalopathy with onset in early infancy and characterized by migrating partial seizures on EEG. The two patients, described by Poduri et al., presented a similar phenotype to EIEE type 3: they developed seizures between 1 and 2 weeks of life, hypotonia, severe developmental delay, and died before 4-year-old age. The brain MRI of the second patient revealed a delayed myelination pattern. The only difference between phenotypes concerns the type of seizures with partial seizures for EIMFS.

The patients described here present a EIEE type 3 phenotype with a milder course of the disease, like patients reported previously by Reid et al. [6], (absence of SB, some acquisitions, no microcephaly, normal VEP, and still alive at 15-year-old age for the oldest) (Table 1). The functional studies allowed us to confirm the involvement of *SLC25A22* gene in our family.

The identification of the genetic variations involved in the disease of the patients allowed us to propose a targeted research screening of the causative genetic variations for the direct family members and a complete screening of the *SLC25A22* gene for unrelated members of future unions.

We clustered the 18 patients and the variants they carried into three groups according to the severity of the *SLC25A22*-related disorders. In an attempt to identify genotype–phenotype correlations, we compared the variants according to the location depending on the protein domains (Table 2 and Fig. 3b).

The variants c.166A>C; p.(Thr56Pro), c.235G>A; p.(Glu79Lys), c.746T>A; p.(Val249Glu), c.813_814delTG; p.(Ala272Glnfs*144), c.818G>A; p.(Arg273Lys), and c.886G>A; p.(Ala296Thr), involved in a milder phenotype (patients 1–9 in Table 1), were located in exons 4, 5, 9, and

Table 2 Severe versus mild phenotype comparison

Common symptoms	Severe phenotype n=7	EIMFS n=2	Moderate phenotype n=9
Early-onset seizures	SB	MPS	Absence of SB
Myoclonic seizures/MPS	Untractable epilepsy	Untractable epilepsy	Tractable epilepsy
Severe hypotonia	No psychomotor acquisition	No psychomotor acquisition	Some acquisition
Severe developmental delay	Microcephaly	Unknown	No microcephaly
	Abnormal VEP/ERG	Normal VEP/REG	Normal VEP/ERG
	Died or in vegetative state	Died	Alive
	c.617C>T; p.(Pro206Leu) c.706G>T; p.(Gly236Trp)	c.328G>C; p.(Gly110Arg)	c.818G>A; p.(Arg273Lys) c.813_814delTG; p.(Ala272Glnfs*144) c.166A>C; p.(Thr56Pro) c.886G>A; p.(Ala296Thr) c.235G>A; p.(Glu79Lys) c.746T>A; p.(Val249Glu)
(NG_023407.1)	Exon 8	Exon 6	Exons 4, 5, 9 and 10
	Patients 12 to 18	Patients 10 and 11	Patients 1 to 9



EIEE early infantile epilepsy encephalopathy, EIMFS epilepsy of infancy with migrating focal seizures, SB suppression burst, MPS migrating partial seizures, VEP visual evoked potential, ERG electroretinogram

10 (NG_023407.1), and were not in helical transmembrane domains except for the two of them: p.(Glu79Lys) and p.(Ala296Thr). However, in patient 9, the p.(Glu79Lys) variant was associated with the p.(Val249Glu) variant (c.[235G>A]; [746T>A]), which did not affect the helical domain (patient 9). The p.(Ala296Thr) variant was in the homozygous state in patients 7 and 8. These patients had atypical phenotypes with febrile and absence seizures. This variant was present once in the heterozygous state in GnomAD and ExAC database. In silico pathogenicity prediction by SIFT and PolyPhen2 was “damaging”, but functional studies were not performed. This variant involved the last helical transmembrane domain (Fig. 3b). We speculate that its consequences on the three-dimensional conformation and channel function are less severe than those of the other helical transmembrane domain variants. This should be tested by functional studies. The variants c.617C>T; p.(Pro206Leu) and c.706G>T; p.(Gly236Trp), involved in the severe phenotype (patients 12–18 in Table 1), were located in exon 8 (NG_023407.1), and affected the helical transmembrane domains, essential for the protein conformation [20]. The variant c.328G>C; p.(Gly110Arg) found in patients with severe EIMFS (patients 10 and 11 in Table 1) was located in exon 6 (NG_023407.1) and affected also a helical transmembrane domain. This could directly compromise the channel function and explain the more severe phenotype. The criteria of pathogenicity for each variant according to ACMG criteria are summarized in Supplementary Table 1.

In summary, we found that patients with two variants affecting function of protein localized in helical transmembrane domains were likely to present with severe phenotypes, whereas patients with at least one variant outside the helical domains presented milder phenotypes. This could explain the phenotypic difference among patients (severe versus mild, Table 2 and Fig. 3).

In conclusion, we defined three groups in *SLC25A22*-related disorders: EIEE type 3 with severe outcome, EIMFS with severe outcome, and EIEE type 3 with milder outcome, and suggest an association between the location of the variants and the variability of the severity of the disease. Additional studies of patients with EIEE type 3 and EIMFS will be required to further delineate the full phenotypic range associated with *SLC25A22* variants and genotype–phenotype correlations.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Ohtahara S, Yamatogi Y. Epileptic encephalopathies in early infancy with suppression-burst. *J Clin Neurophysiol*. 2003;20:398–407.
- Molinari F, Raas-Rothschild A, Rio M, Fiermonte G, Encha-Razavi F, Palmieri L, et al. Impaired mitochondrial glutamate transport in autosomal recessive neonatal myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet*. 2005;76:334–9.
- Molinari F, Kaminska A, Fiermonte G, Boddaert N, Raas-Rothschild A, Plouin P, et al. Mutations in the mitochondrial glutamate carrier *SLC25A22* in neonatal epileptic encephalopathy with suppression bursts. *Clin Genet*. 2009;76:188–94.
- Fiermonte G, Palmieri L, Todisco S, Agrimi G, Palmieri F, Walker JE. Identification of the mitochondrial glutamate transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J Biol Chem*. 2002;277:19289–94.
- Cohen R, Basel-Vanagaite L, Goldberg-Stern H, Halevy A, Shuper A, Feingold-Zadok M, et al. Two siblings with early infantile myoclonic encephalopathy due to mutation in the gene encoding mitochondrial glutamate/H⁺ symporter *SLC25A22*. *Eur J Paediatr Neurol*. 2014;18:801–5.
- Reid ES, Williams H, Anderson G, Benatti M, Chong K, James C, et al. Mutations in *SLC25A22*: hyperprolinaemia, vacuolated fibroblasts and presentation with developmental delay. *J Inher Metab Dis*. 2017;40:385–94.
- Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58:512–21.
- Poduri A, Heinzen EL, Chitsazzadeh V, Lasorsa FM, Elhosary PC, LaCoursiere CM, et al. *SLC25A22* is a novel gene for migrating partial seizures in infancy. *Ann Neurol*. 2013;74:873–82.
- Barat-Houari M, Dumont B, Fabre A, Them FT, Alembik Y, Alessandri JLA, et al. The expanding spectrum of *COL2A1* gene variants in 136 patients with a skeletal dysplasia phenotype. *Eur J Hum Genet*. 2016;24:992–1000.
- Brines ML, Sundaesan S, Spencer DD, de Lanerolle NC. Quantitative autoradiographic analysis of ionotropic glutamate receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy: up-regulation in reorganized epileptogenic hippocampus. *Eur J Neurosci*. 1997;9:2035–44.
- Ramos M, del Arco A, Parlo B, Martinez-Serrano A, Martinez-Morales JR, Kobayashi K, et al. Developmental changes in the Ca²⁺-regulated mitochondrial aspartate-glutamate carrier *aralar1* in brain and prominent expression in the spinal cord. *Brain Res Dev Brain Res*. 2003;143:33–46.
- Bourgeron T, Chretien D, Rotig A, Munnich A, Rustin P. Fate and expression of the deleted mitochondrial DNA differ between human heteroplasmic skin fibroblast and Epstein-Barr virus-transformed lymphocyte cultures. *J Biol Chem*. 1993;268:19369–76.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rotig A, Saudubray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1994;228:35–51.
- Aubert S, Bligny R, Douce R, Gout E, Ratcliffe RG, Roberts JK. Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by ¹³C and ³¹P nuclear magnetic resonance. *J Exp Bot*. 2001;52:37–45.
- Berkich DA, Ola MS, Cole J, Sweatt AJ, Hutson SM, LaNoue KF. Mitochondrial transport proteins of the brain. *J Neurosci Res*. 2007;85:3367–77.
- Goubert E, Mircheva Y, Lasorsa FM, Melon C, Profilo E, Sutera J, et al. Inhibition of the mitochondrial glutamate carrier *SLC25A22* in astrocytes leads to intracellular glutamate accumulation. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:149.

17. Trabelsi Y, Amri M, Becq H, Molinari F, Aniksztejn L. The conversion of glutamate by glutamine synthase in neocortical astrocytes from juvenile rat is important to limit glutamate spillover and peri/extrasynaptic activation of NMDA receptors. *Glia*. 2017;65:401–15.
18. Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shutoff and cell death pathways. *Nat Neurosci*. 2002;5:405–14.
19. Ivanov A, Pellegrino C, Rama S, Dumalska I, Salyha Y, Ben-Ari Y, et al. Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol*. 2006;572:789–98.
20. Palmieri F. The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology. *Mol Asp Med*. 2013;34:465–84.

Serment

- *En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.*

- *Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.*

- *Admise dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*

- *Respectueuse et reconnaissante envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.*

Résumé

L'encéphalopathie épileptique infantile précoce (EEIP) est un groupe hétérogène d'encéphalopathies épileptiques de formes sévères et apparaissant au cours des premières semaines ou des premiers mois de vie. L'électroencéphalogramme (EEG) inter-critique montre un motif de « suppression burst » (SB). Le pronostic est généralement péjoratif et la plupart des enfants décèdent dans les deux premières années ou survivent avec une déficience intellectuelle très sévère. L'EEIP de type 3 est causé par des variants, à l'état homozygote ou hétérozygote composite, affectant la fonction du gène *SLC25A22*, qui est également responsable de l'épilepsie infantile avec crises épileptiques focales migrantes (EIMFS). Nous rapportons une famille avec un phénotype d'EEIP de type 3. Nous avons effectué un séquençage de l'exome et identifié deux variants non rapportés dans le gène *SLC25A22* à l'état hétérozygote composite : NM_024698.4: c. [813_814delTG]; [818 G> A] (p. [Ala272Glnfs * 144]; [Arg273Lys]). Des études fonctionnelles sur des fibroblastes cutanés d'un des enfants, ont montré que l'oxydation du glutamate était fortement défectueuse. Nous avons regroupé les 18 individus publiés (y compris ceux de cette famille) en trois groupes selon la gravité des symptômes liés au gène *SLC25A22*. Pour tenter d'identifier une corrélation génotype-phénotype, nous avons comparé les variants en fonction de leur localisation dans les domaines de la protéine. Nous avons observé que les individus avec deux variants situés dans les domaines transmembranaires hélicoïdaux présentaient un phénotype sévère, alors que les individus avec au moins un variant en dehors des domaines transmembranaires hélicoïdaux présentaient un phénotype plus modéré. Ces données suggèrent un continuum entre les pathologies liées au gène *SLC25A22*. Cela pourrait être un premier indice pour permettre aux généticiens d'établir un pronostic basé sur des données moléculaires génétiques concernant le gène *SLC25A22*.

Mots clés

Encéphalopathie épileptique infantile précoce, Epilepsie infantile avec crises épileptiques focales migrantes, maladie génétique, *SLC25A22*, transporteur glutamate/H⁺, anomalie mitochondriale.