

Université de Sherbrooke

**Caractérisation du profil neurophysiologique des encéphalopathies épileptiques liées
aux gènes DEPDC5 et NPRL3**

Par
Madora MABIKA
Programmes de Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en Physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Juin, 2022

Membres du jury d'évaluation

Kevin Whittingstall, Sciences des radiation et imagerie biomédicale
Pascal Tétreault, Physiologie

© MABIKA, 2022

À bien des égards, mon expérience en tant qu'étudiante à la maîtrise aura été l'une des plus compliquée mais également l'une des plus enrichissante que j'ai vécu jusqu'à présent.

Sans être une voie que j'envisageais emprunter initialement, la recherche aura indéniablement contribué à mon développement personnel, tout en me permettant de garder en vue mon objectif principal. Au-delà du sujet qu'il traite et des travaux qu'il décrit, ce mémoire reflète un processus qui n'aurait pas été possible sans toutes les personnes et toutes les moments (les plus joyeux ainsi que les plus éprouvants) qui font de la vie une expérience aussi unique.

À ma mère, qui a fait de moi ce que je suis, je dédie ce mémoire et l'accomplissement qu'il représente; Merci pour ton amour et tous tes sacrifices. À mes frères Simonssen et Larsen dont la force, la persévérance et la bonté m'inspirent chaque jour; Merci de m'aider à me relever lorsque que je tombe, de me redonner confiance lorsque je doute. À mon neveu Quincy, pour qui je l'espère, mes efforts d'aujourd'hui créeront de merveilleuses opportunités demain.

*À Mizgin, dont l'amitié m'a sauvé, merci de faire partie de ma vie;
Merci pour ta bonté, ta sincérité et ta loyauté.*

À mon directeur de recherche, le Pr. Jean-François Lepage, j'adresse mes sincères et chaleureux remerciements, pour son soutien, sa patience et sa générosité; Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir donné cette opportunité.

*'The two most important days in your life are the day you were born
and the day you find out why.'*
– Mark Twain

*'Two roads diverged in the wood and I, I took the one less traveled by
and that has made all the difference.'*
– Robert Frost

'Do not worry about anything, but in everything [...] present your requests to God.'
– Philippians 4:6

RÉSUMÉ

Caractérisation du profil neurophysiologique des encéphalopathies épileptiques liées aux gènes DEPDC5 et NPRL3

Par
Madora MABIKA
Programmes de Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès en sciences (M.Sc.) en Physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Mots clés : Épilepsie; DEPDC5; NPRL3; mTOR, GABA, Stimulation magnétique transcrânienne; électroencéphalographie; spectroscopie par résonance magnétique.

Les encéphalopathies épileptiques représentent un ensemble de syndromes qui se manifestent par de l'épilepsie réfractaire, généralement associée à des troubles neurocognitifs, un déficit intellectuel, et dans certains cas à des malformations du développement cortical. Nous nous intéressons ici aux gènes DEPDC5 et NPRL3, codant pour deux sous unités d'un des principaux complexes régulateurs de la voie de signalisation cellulaire mTOR, le complexe GATOR1. Les mutations des gènes DEPDC5 et NPRL3 sont à la base d'un large spectre de phénotypes épileptiques, pouvant être associés à de la dysplasie corticale focale, possiblement médiés par une hyperactivation de la voie de signalisation mTOR.

Plusieurs études animales et quelques rares études humaines ont ouvert la voie vers une meilleure compréhension de leur physiologie, notamment quant aux mécanismes régulant l'excitabilité et l'inhibition corticale dont le déséquilibre est impliqué dans la survenue d'épilepsie. Sur la base d'études animales, nous avons émis l'hypothèse qu'en comparaison à des individus sains, un dysfonctionnement du système GABAergique, le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux humain, devrait être présent chez les individus porteurs de mutation des gènes DEPDC5 et NPRL3.

Notre objectif est donc d'évaluer différents aspects du système GABAergique dans les syndromes associés aux mutations des gènes DEPDC5 et NPRL3 à l'aide d'une approche multimodale basée sur l'utilisation de la stimulation magnétique transcrânienne, la spectroscopie par résonance magnétique et l'électroencéphalographie. L'utilisation combinée de ces trois techniques permettra notamment de tester l'intégrité des récepteurs GABAergiques, d'évaluer l'excitabilité corticale et de mesurer les concentrations de neurotransmetteurs inhibiteurs et excitateurs; offrant ainsi une approche holistique de la neurophysiologie de ces syndromes.

SUMMARY

Neurophysiological assessment of DEPDC5- and NPRL3-related epileptic encephalopathies

By
Madora MABIKA
Physiology Program

Thesis presented at the faculty of medicine and health sciences for the obtention of Master degree diploma, maître ès sciences (M.Sc.), in Physiology, Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Keywords: Epilepsy; DEPDC5; NPRL3; mTOR, GABA, transcranial magnetic stimulation; electroencephalography; magnetic resonance spectroscopy.

Epileptic encephalopathies are a group of syndromes marked by refractory epilepsy, usually associated with neurocognitive disorders, intellectual deficit, and in some cases with malformations of cortical development. We are interested here in the DEPDC5 and NPRL3 genes, coding for two subunits of one of the main regulatory complexes of the mTOR cell signaling pathway, the GATOR1 complex. Mutations in the DEPDC5 and NPRL3 genes underlie a broad spectrum of epileptic phenotypes, which may be associated with focal cortical dysplasia, possibly mediated by hyperactivation of the mTOR signaling pathway.

Several animal studies and a few rare human studies have paved the way for a better understanding of their physiology, particularly regarding the mechanisms regulating cortical excitability and inhibition, the imbalance of which is involved in the onset of epilepsy. Based on animal studies, we hypothesized that in comparison to healthy individuals, dysfunction of the GABAergic system, the main inhibitory neurotransmitter of the human nervous system, should be present in individuals carrying DEPDC5 gene mutations. and NPRL3.

Our objective is therefore to evaluate different aspects of the GABAergic system in syndromes associated with DEPDC5 and NPRL3 gene mutations with a multimodal approach based on the use of transcranial magnetic stimulation, magnetic resonance spectroscopy and electroencephalography. The combined use of these three techniques will notably make it possible to test the integrity of GABAergic receptors, to evaluate cortical excitability and to measure the concentrations of inhibitory and excitatory neurotransmitters; thus offering a holistic approach to the neurophysiology of these syndromes.

TABLE DES MATIERES

Résumé	iv
Summary	v
Table des matières	vi
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	vii
Liste des abréviations	viii
Introduction	9
Les encéphalopathies épileptiques	9
Évolution historique du concept d'encéphalopathie épileptique	9
Physiopathologie des encéphalopathies épileptiques	11
Les encéphalopathies épileptiques liée aux gènes DEPDC5 et NPRL3	15
La voie de signalisation mTOR	15
Les syndromes DEPDC5 et NPRL3 dans la littérature : données électrophysiologiques	19
Problématiques	20
Hypothèse de recherche	23
Objectifs	23
Matériel et méthodes	25
La stimulation magnétique transcrânienne	25
La spectroscopie par résonance magnétique	31
L'électroencéphalographie	36
Article 1	45
Discussion	93
Liste des références	105
Annexes	116
Annexe 1. Principes de résonance magnétique nucléaire	116
Annexe 2. Acquisition des données d'imagerie par résonance magnétique	118
Annexe 3. Décomposition et analyse du signal EEG	122

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique de la régulation de la voie de signalisation Mtor	19
Figure 2. Procédure de stimulation magnétique transcrânienne.....	36
Figure 3. Magnétisme des protons des atomes d'hydrogène de l'eau	41
Figure 4. Traitement de données spectroscopiques via Gannet3.1	47
Figure 5. Carte de perturbation spectrale reliée à l'évènement moyenne	55
Figure 6. Carte de cohérence inter-essais moyenne.....	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Types et caractéristiques des différents formes de dysplasie corticale focale	22
Tableau 2. Description des protocoles de stimulation magnétique transcrânienne	37

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNFLE	<i>Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy</i>
CSP	<i>Cortical Silent Period</i>
DEPDC5	<i>DEP (Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin)-Domain Containing 5</i>
EE	<i>Encéphalopathie épileptique/Epileptic Encephalopathy</i>
EEG	<i>Électroencéphalographie</i>
ESES	<i>Electric Status Epilepticus during Sleep</i>
EIEE	<i>Early Infantile Epileptic Encephalopathy</i>
ERSP	<i>Event-Related Spectral Perturbation</i>
FCD	<i>Focal Cortical Dysplasia</i>
FFEVF	<i>Familial Focal Epilepsy with Variable Foci</i>
GABA	<i>Gamma Aminobutyric Acid</i>
ICF	<i>Intracortical Facilitation</i>
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
ITC	<i>Inter-Trial Coherence</i>
LICI	<i>Long Interval Cortical Inhibition</i>
LFP	<i>Local Field Potentials</i>
MRS	<i>Magnetic Resonance Spectroscopy</i>
MTOR	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
NPRL2	<i>Nitrogen Permease Regulator Like 2</i>
NPRL3	<i>Nitrogen Permease Regulator Like 3</i>
SCN1A	<i>Sodium Channel voltage-gated type 1 alpha subunit</i>
SICF	<i>Short Interval Cortical Facilitation</i>
SICI	<i>Short Interval Cortical Inhibition</i>
TLE	<i>Temporal Lobe Epilepsy</i>
TMS	<i>Transcranial Magnetic Stimulation</i>

INTRODUCTION

Les encéphalopathies épileptiques

Le terme « encéphalopathie » est introduit dans le lexique médical au XIXe siècle, formé à partir des racines grecques *enkephalos* (« cerveau ») et *pathos* (« souffrance ») par le médecin Louis Tanquerel des Planches. Ce terme désigne initialement toute affection de l'encéphale (comprenant le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral). Bien qu'il soit aujourd'hui d'usage courant en médecine, le terme renvoie à une condition clinique très hétérogène alors qu'on compte à ce jour une quinzaine de types d'encéphalopathies, pouvant être d'origine génétique métabolique, toxique, ischémique, dégénérative, auto-immune, ou autre. Parallèlement à ce large spectre étiologique, l'ensemble des encéphalopathies présente une grande variété de degré de sévérité. Cependant les encéphalopathies se distinguent communément par des atteintes cognitives et comportementales accompagnant des syndromes neurologiques caractéristiques, notamment l'épilepsie (Capovilla et al., 2013).

Évolution historique du concept d'encéphalopathie épileptique

C'est en 1841 que le Dr. West fait la première observation d'un cas de convulsions récurrentes associées à une altération des facultés cognitives, chez l'enfant (West, 1841). Trois décennies après l'apparition du premier électroencéphalographe (EEG), Gibbs et Gibbs identifient une anomalie de l'activité électrique cérébrale commune à tous les cas de spasmes infantiles similaires à celui observé par le Dr. West (Gibbs et Gibbs, 1952). Un signal marqué par des ondes de haute amplitude, asynchrones et irrégulières présentes, entre les épisodes de convulsion (hypsarythmie). C'est seulement en 1964 que Gastaut et collaborateurs statuent sur ce que l'on connaît aujourd'hui comme étant le syndrome de West (Gastaut et Poirier, 1964). Simultanément à cette description fondatrice, de nombreux

autres rapports de cas ont permis une consolidation du concept d'encéphalopathie épileptique.

Dans les années 50 Lennox et Davis décrivent des premiers cas d'épilepsie infantile associée à de sévères retards neurodéveloppementaux (Lennox et Davis, 1950). Ces observations sont plus tard corroborées par Gastaut et collaborateurs qui, sur l'étude de plusieurs cas similaires contribuent à l'identification de symptômes propres à cette affection (Gastaut et al., 1963).

Ohtahara et collègues identifient, en 1976, ce que l'on considère aujourd'hui comme l'un des syndromes épileptiques les plus sévères, marqué par des crises épileptiques de type tonique qui s'accompagnent ensuite de troubles physiques et mentaux sévères au cours du développement. Les causes du syndrome d'Ohtahara incluent un large panel d'étiologies (génétiques, structurelles métaboliques, hypoxique-ischémique, entre autres) dont certaines restent encore inconnues (Pavone et al., 2012; Shbarou et Mikati, 2016), laissant la majorité des patients avec un très faible pronostic vital. Dans la plupart des cas lorsque la maladie n'entraîne pas un décès prématuré (à deux ans en moyenne), les cas d'EIEE évoluent vers un syndrome de West ou un syndrome de Lennox-Gastaut au cours du temps (Yamatogi et Ohtahara, 2002; Beal et al., 2021).

En 1978, le médecin français Charlotte Dravet décrit des cas de crises fébriles prolongées ainsi que des crises cloniques ou hémicloniques généralisées, se manifestant typiquement chez l'enfant, aux alentours de six mois. Ce tableau clinique décrit ainsi le phénotype le plus sévère associé aux mutations du gène SCN1A codant pour la sous-unité alpha du canal sodique voltage dépendant (Nav1.1) (Depienne et al., 2009 ; Zuberi et al., 2011). Avec une corrélation génotype-phénotype démontrée dans près de 80% des cas, l'épilepsie myoclonique sévère chez l'enfant ou syndrome de Dravet est aujourd'hui considéré comme un modèle archétypal d'encéphalopathie épileptique ; faisant du gène SCN1A l'un des modèles les plus pertinents dans l'étude de l'épilepsie pédiatrique. (Brunklaus et Zuberi, 2014)

Au cours du siècle dernier, le concept d'encéphalopathie épileptique s'est donc construit sur la description de conditions neurologiques pour lesquelles l'activité épileptique et interictale joue un rôle central. Ce concept renvoie notamment à une déclinaison de syndromes ayant tous en commun l'apparition de troubles neurodéveloppementaux. Ainsi, la ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE) statue sur une définition des encéphalopathies épileptiques qui renvoie à « la notion que l'activité épileptique elle-même contribuerait à de sévères troubles cognitifs et comportementaux, au-delà de ce que l'on pourrait attendre la pathologie sous-jacente seule » (Berg et al., 2010).

Cependant, les différences entre les encéphalopathies épileptiques précoces (e.g., Syndrome d'Ohtahara) et tardives (e.g., syndrome de Lennox-Gastaut) soulèvent encore des questions quant au lien causal entre l'activité épileptique et les atteintes neurodéveloppementales (Khan & Al Baradie., 2012 ; Striano et al., 2013)

Physiopathologie des encéphalopathies épileptiques

On reconnaît aujourd'hui que le concept d'encéphalopathie épileptique implique une dualité entre l'activité épileptique et les troubles neurodéveloppementaux. Au cours des dernières décennies, l'avancée des recherches en génétique et en imagerie médicale a permis d'aboutir à un tel consensus (Lado et al., 2013) tout en ouvrant la voie vers de nouvelles hypothèses concernant les mécanismes sous-jacents au développement de ces syndromes. Cependant, le lien causal entre l'activité épileptique et son degré d'implication dans l'apparition des troubles neurodéveloppementaux (plus ou moins sévères) est toujours sujet à controverse (Lado et al., 2002, Henderson et al., 2011; Klen et al., 2012; Lado et al., 2013). En effet, la définition même du concept établi par l'ILAE, met l'accent sur « la nature, bien souvent inconnue, de la cause apparente d'une encéphalopathie » (Engel, 2001); la pathologie pouvant ainsi être le résultat d'une activité épileptique persistante, tout comme l'activité épileptique pourrait en fait résulter ou se développer simultanément à l'encéphalopathie.

On constate notamment que malgré la fréquence et la sévérité des crises observées dans les cas d'épilepsie infantile ou d'épilepsie frontale, ces syndromes sont souvent associés à des troubles cognitifs mineurs, voire inexistant. Inversement, des crises plus brèves, sporadiques et moins prononcées à l'électroencéphalographie semblent généralement être à l'origine de troubles cognitifs très sévères dans des cas d'encéphalopathie épileptique tels que le syndrome de Lennox-Gastaut et le syndrome de West. La majorité des études animales menées jusqu'à présent a permis de montrer de façon tangible qu'une activité épileptique induite de façon expérimentale entraîne des dommages cognitifs significativement moins importants que les troubles cognitifs caractéristiques des encéphalopathies épileptiques. Par ailleurs, la présence de crises, leur fréquence et leur degré de sévérité ne semble pas directement prédire l'ampleur des troubles cognitifs observés. Cela soulève certaines questions dont les réponses permettraient de combler le manque de connaissance actuel quant à la nature des encéphalopathies épileptiques. Quels sont les mécanismes à la base du large spectre phénotypique des encéphalopathies épileptiques ? L'activité épileptique est-elle au centre de la physiopathologie de ces syndromes ? A-t-elle nécessairement un effet exacerbant sur le développement des troubles cognitifs ? Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses recherches ont apporté divers éléments de réponses permettant d'étayer des hypothèses quant à l'origine des encéphalopathies épileptiques. Dans leur revue, Lado et collaborateurs se prononcent sur *trois* des mécanismes les plus probants (Lado et al., 2013).

1. *Anomalie de la fonction neuronale corticale* - Plusieurs approches génétiques ont mis en évidence une perturbation de la fonction neuronale (particulièrement interneuronale) corticale dans le processus physiopathologique des encéphalopathies épileptiques. Dutton et collègues se sont intéressés aux effets de la perte de fonction du gène SCN1A dans différentes populations de neurones chez la souris. En comparaison aux souris de type sauvage, ils ont observé une haploinsuffisance de la protéine Nav1.1 des interneurons corticaux chez les souris hétérogènes pour le gène SCN1A. Cette haploinsuffisance était fortement associée à une diminution du seuil de crises convulsives et à une activité épileptique spontanée significativement plus fréquente (Dutton et al., 2013). D'autres altérations

généétiques se sont révélées être caractéristiques d'encéphalopathies épileptiques précoces. Entre autres, l'étude du gène ARX (impliqué dans le développement cortical via la synthèse de facteurs de transcription) a permis d'établir un lien entre ses diverses mutations et les phénotypes cliniques les plus fréquents. Par exemple, des données suggèrent que la délétion d'un triplet GCG-polyalanine dans la séquence du gène ARX chez l'animale résulte en un phénotype similaire à ceux observés cliniquement dans les syndromes de West et d'Ohtahara a été inévidente par séquençage génétique dans certains cas de syndrome de West liés à l'X et du syndrome d'Ohtahara (Kato et al., 2003; Poirier et al., 2008; Lado et al., 2013). Par ailleurs, l'étude de modèles animaux hétérozygotes ont permis d'éclaircir les effets de la mutation du gène ARX au niveau cortical. Marsh et collaborateurs ont démontré une réduction du contingent d'interneurones corticaux ainsi coïncidant avec une augmentation de crises convulsives précoces chez les souris ARX^{+/-} en comparaison aux souris de type sauvage (Marsh et al., 2009)

2. *Dysplasie corticale focale* - L'intégrité structurelle corticale semble également être sujette à des modifications qui favorisent le processus physiopathologique des encéphalopathies épileptiques. Au sein du cortex, les interneurones inhibiteurs veillent au contrôle de l'activité excitatrice des neurones pyramidaux de la même façon qu'un interrupteur établi et rompt la circulation du courant dans un circuit électrique. On en distingue plusieurs groupes sur la base de leurs propriétés histochimiques (p.ex. les interneurones contenant de la parvalbumine) et électrophysiologiques (p. ex. les interneurones à décharge rapide ou *fast-spiking interneurons* (FS)) (Cammarota et al., 2013, Lado et al., 2013). Au cours du développement, des modifications de leur morphologie et/ou de leur organisation peuvent survenir et entraver leur fonction inhibitrice, ce qui constitue les prémices de l'activité épileptique. Dans des cas de syndrome de West liés au gène de sclérose tubéreuse complexe de type 1 (TSC1), Fu et collaborateurs se sont intéressés à l'efficacité de traitement anticonvulsifs ciblant le système GABAergique. Grâce à un modèle animal ils ont pu mettre en évidence les effets de la mutation du gène TSC1 sur les interneurones inhibiteurs corticaux. Le gène TSC1, via la voie de

signalisation mTOR, contribue entre autres à la biosynthèse de protéines et la prolifération cellulaire. Suite à la répression du gène TSC1 chez la souris, les chercheurs ont observé une réduction significative de 20% des interneurones GABAergiques corticaux. Par ailleurs, des analyses histologiques et biochimiques ont révélé une cytomégalie des 80% d'interneurones GABAergiques restants ainsi qu'une activité excessive de la voie de signalisation mTOR. (Fu et al., 2012).

3. *Influences sous-corticales* – Entre autres propriétés électrophysiologiques, les neurones sont engagés dans un dynamique binaire quant à leur potentiel de membrane. En effet, via les courants ioniques qu'ils reçoivent en permanence, les neurones alternent généralement entre deux états que l'on peut distinguer grâce à l'enregistrement de potentiels de champs locaux ou *Local Field Potentials* (LFP). Un premier état très hyperpolarisé (Down state), soit une période « silencieuse » au cours de laquelle on n'observe pas d'activité. Un second état plus dépolarisé (Up state), où l'on peut observer plus d'activité au sein d'un réseau de neurones (Zucca et al., 2019; Wilson, 2008). Cette 'bi-stabilité cellulaire' s'observe non seulement au niveau cortical mais également au sein des cellules thalamiques (relais et réticulaires), essentiellement au cours du sommeil non paradoxal (sommeil à mouvements oculaires non-rapides), (Steriade et al., 1993; Contreras & Steriade, 1995; Zucca et al., 2019). De nombreuses données soutiennent le rôle crucial de l'alternance entre les états *Up* et *Down* au du sein système thalamo-cortical dans la formation de la mémoire et la plasticité synaptique, respectivement (Crochet et al., 2005; Marshall et al., 2006; Destexhe et al., 2007; Vyazovski et al., 2008; Chauvette et al., 2012; Tონoni & Cirelli, 2014; Crunelli et al., 2018). En dépit de la nature antagoniste de ces deux états, des études de potentiels de champs locaux ont mis en évidence l'activité de certaines populations d'interneurones inhibiteurs au cours de l'état Down. Par exemple, Zucca et collaborateurs ont montré que le contrôle de l'activité cortical et le maintien des neurones (notamment excitateurs) à l'état hyperpolarisé était dépendant de l'activité de réseaux d'interneurones GABAergiques à décharge rapide, positifs à la parvalbumine (Zucca et al., 2017). Dans une étude ultérieure, les chercheurs se sont intéressés à la source de cette

activé. Suite à des manipulations optogénétiques spécifiques ils ont enregistré l'activité de populations neuronales sous-corticales et néocorticales. Leurs données témoignent d'une concomitance entre l'activité des neurones du noyau ventral postéro-médial du thalamus et l'activité des interneurons à parvalbumine, suggérant un rôle central du thalamus dans la modulation de l'activité inhibitrice des interneurons corticaux (Zucca et al., 2019).

L'ensemble de ces données converge donc vers l'hypothèse selon laquelle un dysfonctionnement cortical de nature génétique ou dysplasique, probablement induit par une modulation sous-corticale anormale du cortex, constitue les prémices physiopathologiques des encéphalopathies épileptiques (Lado et al., 2013).

Les encéphalopathies épileptiques liée aux gènes *DEPDC5* et *NPRL3*

La voie de signalisation mTOR

En 1994, les mécanismes d'action du complexe rapamycine-FKBP12 sont confirmés via l'identification de sa cible moléculaire : la protéine mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) (Brown et al., 1994 ; Sabatini et al., 1994 ; Sabers et al., 1995). Il s'agit d'une protéine sérine/thréonine appartenant à la famille des kinases reliées à la phosphatidylinositol 3-kinase (PIKK). Chez les mammifères, la protéine mTOR forme deux complexes multiprotéiques (1 et 2) exprimés de façon ubiquitaire dans le corps, et via lesquels elle orchestre d'importantes fonctions cellulaires. Particulièrement, mTOR s'associe aux protéines Raptor, mLST8, PRAS40 et DEPTOR pour former le complexe mTOR 1 (mTORC1). Ce complexe oriente la cellule vers des mécanismes anaboliques (ex. biosynthèse) afin de promouvoir la croissance et la prolifération cellulaire. De nombreuses expériences d'inhibition du complexe mTORC1, à l'aide de la rapamycine, notamment, ont permis de démontrer son rôle clé dans la synthèse de protéines (Holz et al., 2005 ; Laplante & Sabatini, 2009 ; Ma & Blenis, 2009 ; Saxton & Sabatini, 2017) et de lipides (Huffman et al., 2002 ; Kim & Chen, 2004 ; Porstmann et al., 2008). L'activation de mTORC1 entraîne

également la synthèse de nucléotides contribuant ainsi à la réplication de l'ADN (Ben-Sarah et al., 2016 ; Saxton & Sabatini, 2017). D'autres données témoignent du rôle de mTORC1 dans le métabolisme du glucose pour la production d'énergie, suggérant une autre forme de contribution à la croissance et la prolifération cellulaire (Düvel et al., 2010 ; Saxton et Sabatini, 2017). Par ailleurs, mTORC1 favorise la prolifération cellulaire en réprimant les mécanismes qui l'entravent, notamment l'autophagie. En effet, tant que les cellules disposent de suffisamment de nutriments mTORC1 exerce une action inhibitrice en phosphorylant les éléments médiateurs de l'autophagie tels que la protéine ATG13 nécessaire à la formation de l'autophagosome (Ganley et al., 2009 ; Hosokawa et al., 2009 ; Jung et al., 2009 ; Laplante & Sabatini, 2009).

Il est important de mentionner que l'activité de mTORC1 est elle-même dépendante de différentes cascades de signalisation induites en amont par des facteurs hormonaux ou énergétiques.

On note que la disponibilité en nutriments tels que le glucose et les acides aminés représente l'une des voies d'activation les plus importantes de mTORC1. En réponse à ces signaux intracellulaires, la voie mTORC1 est strictement régulée par un complexe inhibiteur majeur, à savoir le complexe GATOR1, formé par les protéines DEPDC5, NPRL2 et NPRL3. En l'absence de nutriments, GATOR1 exerce un contrôle inhibiteur sur mTORC1 en empêchant sa liaison à un groupement de protéines (Rag) à activité GTPase ; nécessaires à son recrutement au niveau du lysosome et à son activation. Ainsi, la perte de fonction du complexe GATOR1 est directement associée à désensibilisation de la voie mTOR face aux besoins en nutriments. Plus particulièrement, il a récemment été montré que les mutations affectant les gènes DEPDC5, NPRL2 et NPRL3 entraînent une suractivation de la voie mTOR sous-jacente à différents phénotypes épileptiques, lésionnels et non lésionnels. Ainsi, la voie mTOR constitue un carrefour signalétique intégrant diverses afférences extracellulaires et intracellulaires, ce qui étend son implication clinique à de nombreux processus physiopathologiques. Par exemple, au niveau du système nerveux central, la voie mTOR régit notamment l'organisation corticale en favorisant la synaptogénèse ou l'autophagie, du développement jusqu'à l'âge adulte (Iffland et al., 2019). Une régulation stricte en amont de la voie de signalisation mTOR est donc

nécessaire au maintien de son activité dans un cadre physiologique (Zoncu et al., 2011). Cette régulation repose essentiellement sur des complexes inhibiteurs interagissant avec mTORC1 (Figure 1).

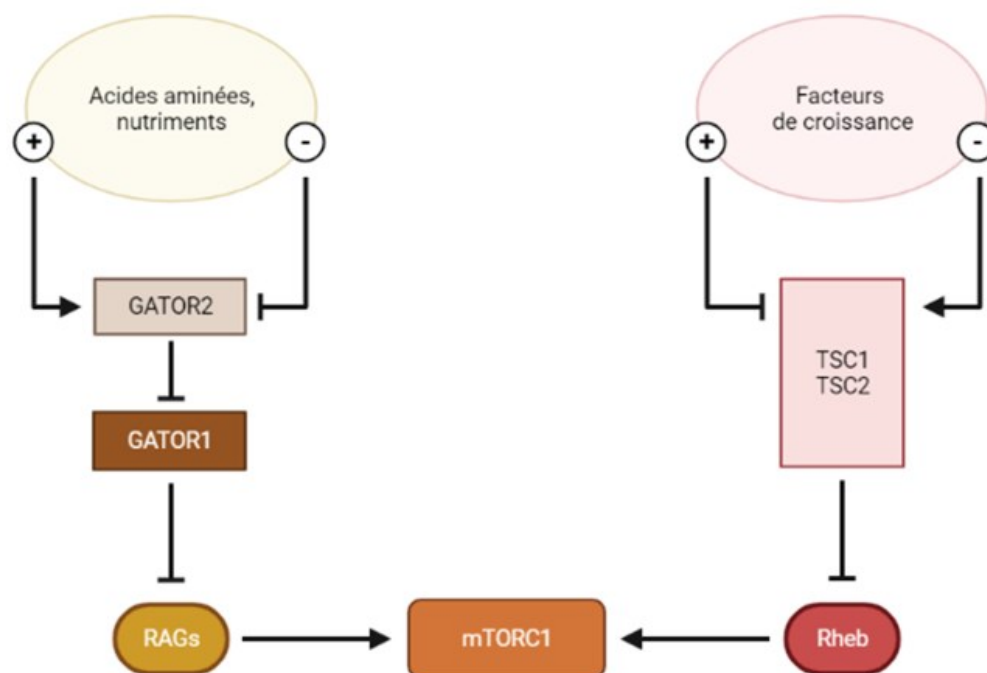


Figure 1. Représentation schématique de la régulation de la voie de signalisation mTOR.

D'un point de vue clinique, les mutations des gènes du complexe GATOR1 se manifestent d'une part sur le plan structural, via diverses formes de malformations du développement cortical (Tableau 1), et d'autre part sur le plan physiologique via différents phénotypes épileptiques tels que l'épilepsie familiale focale à foyers variables (FFEVF, OMIM : 604364), l'épilepsie frontale à crises nocturne autosomique dominante (ADNFLE, OMIM : 600513) et l'épilepsie du lobe temporaire (TLE, OMIM : 600512) que l'on compte parmi les plus fréquents et augmentant les risques de mort subite inexplicée.

Tableau 1. Types et caractéristiques des différentes formes de dysplasie corticales focales. (D'après la classification de Blümcke).

Type	Sous-type	Caractéristiques
I	a	Lamination corticale radiale anormale
	b	Lamination corticale tangentielle anormale
	c	Lamination corticale radiale et tangentielle anormales
II	a	Neurones dysmorphiques (cytomégalie). Absence de stratification corticale. Atténuation significative de la frontière entre matière grise et matière blanche.
	b	Neurones dysmorphiques et cellules ballonisées. Absence de stratification corticale. Atténuation significative de la frontière entre matière grise et matière blanche.
III	a	Dysplasie corticale focale associée à de la sclérose hippocampique. Altération de la stratification corticale temporale. Neurones hypertrophiques et hétérotopiques.
	b	Dysplasie corticale focale associée aux tumeurs. Altération de la stratification corticale temporale. Hypoplasie corticale. Neurones hypertrophiques.
	c	Dysplasie corticale focale associée aux malformations vasculaires. Altération de l'architecture corticale et de la morphologie cellulaires adjacente aux malformations vasculaires (ex. cavernomes).
	d	Dysplasie corticale focale associée à d'autres lésions neurodéveloppementales. Altération de l'architecture corticale et de la morphologie cellulaires adjacente aux lésions acquises en début de vie (traumatismes crâniens, lésions ischémiques prénatales ou néonatales).

D'un point de vue clinique, les mutations des gènes du complexe GATOR1 se manifestent d'une part sur le plan structurel, via diverses formes de malformations du développement cortical (Tableau 1), et d'autre part sur le plan physiologique via différents phénotypes épileptiques tels que l'épilepsie familiale focale à foyers variables (FFEVF, OMIM : 604364), l'épilepsie frontale à crises nocturne autosomique dominante (ADNFLE, OMIM : 600513) et l'épilepsie du lobe temporelle (TLE, OMIM : 600512) que l'on compte parmi les plus fréquents et qui augmentent les risques de mort subite inexplicée. De ce fait, la prise en charge de ces syndromes repose essentiellement sur des approches pharmacologiques (agent antiépileptiques) ciblant le système GABAergique (Perucca, 2005; Campos et al.,

2016, Fisher, 2011), mais aussi chirurgicales dans les cas les plus réfractaires (environ 30%) (De Tisi et al., 2011).

Les syndromes DEPDC5 et NPRL3 dans la littérature : données électrophysiologiques

Les syndromes épileptiques liés aux gènes DEPDC5, NPRL2 et NPRL3 ont fait l'objet d'un intérêt accru dans le domaine clinique et de la recherche au cours de la dernière décennie. Sur la base des principales théories concernant la physiopathologie des encéphalopathies épileptiques, plusieurs études ont tenté de clarifier les effets physiologiques des mutations des gènes DEPDC5, NPRL2 et NPRL3, et particulièrement leur impact sur la fonction et la structure corticale.

Les principaux modèles murins ont permis de statuer sur le caractère léthal de l'inactivation complète du gène DEPDC5 (DEPDC5^{-/-}), dans les cellules de la lignée germinale. Toutefois, des données obtenues chez un modèle de rat hétérozygote pour le gène DEPDC5 (DEPDC5^{+/-}) ont démontré de manière significative une excitabilité accrue des neurones pyramidaux, médiée par l'hyperactivation de la voie mTOR. En 2018, les travaux de Yuskaitis et collaborateur chez la souris confirment ces premières observations; en effet, les chercheurs ont observé une diminution significative du seuil de déclenchement des crises, associée à la perte de fonction du gène DEPDC5 dans les neurones (Yuskaitis et al., 2018). D'autres données encore témoignent de la perte de fonction du gène DEPDC5 comme mécanisme sous-jacent à une hyperexcitabilité corticale et notamment au niveau du cortex moteur durant le développement, chez le poisson zèbre. Par ailleurs, ces symptômes étaient significativement atténués par la rapamycine, ce qui témoigne ici encore d'une hyperactivation de la voie mTOR comme mécanismes médiateurs des phénotypes observés (De Calbiac et al., 2018). Sur la base de modèles de souris hétérozygotes (DEPDC5^{+/-}) générés in utero, il a récemment été démontré qu'une seconde mutation somatique du gène DEPDC5 permet de reproduire chez l'animale l'ensemble des manifestations cliniques observées chez l'humain; notamment les crises convulsives, la dysplasie corticale focale ainsi que la mort subite liée aux crises (Ribierre et al., 2018; Hu et al., 2018; Dawson et al.,

2019). Ces données corroborent l'hypothèse récemment proposée d'un mosaïcisme, germinale et somatique, à la base des manifestations cliniques (épilepsie et dysplasie focale) associées à la perte de fonction des gènes DEPDC5 et NPRL3 (Bar-Peled et al., 2013; Baulac et al., 2015).

Ce n'est que très récemment qu'on a pu éclaircir le rôle du gène DEPDC5 dans la transmission GABAergique et ce, notamment grâce à l'étude de Swaminatha et collaborateurs, menée en 2018 chez le poisson zèbre. D'une part leur étude confirme que l'inactivation du gène DEPDC5 dans les neurones entraîne une désinhibition de la voie de signalisation mTOR menant à l'épilepsie. D'autre part, leurs données mettent en évidence un défaut dans la genèse et le développement des synapses GABAergiques sous-jacent à l'épilepsie, dus à l'inactivation du gène DEPDC5. Cependant, ce second mécanisme physiopathologique ne semble pas être associé à une hyperactivation de la voie de signalisation mTOR. Ces données suggèrent donc un lien causal entre le gène DEPDC5 et le système GABAergique qui ne semble pouvoir impliquer ou non la voie de signalisation mTOR (Swaminatha et al., 2018). Par ailleurs, en comparant différents profils génotypiques pour le gène DEPDC5 chez la souris, De Fusco et collaborateurs ont récemment démontré qu'une inactivation aigüe du gène au niveau neuronal entraîne: une augmentation de la taille des somas et du nombre de dendrites des neurones pyramidaux ainsi qu'une exacerbation des transmissions excitatrices par rapport aux transmissions inhibitrices; médiées par une hyperactivation de la voie mTOR (De Fusco et al., 2020).

Problématiques

À ce jour, on ne dispose pas encore de suffisamment de données (notamment chez l'humain) quant aux encéphalopathies épileptiques liées aux gènes du complexe GATOR1. Par exemple dans l'étude de stimulation magnétique transcrânienne menée par Stern et collaborateurs dans le syndrome de Dravet, on peut souligner quelques limites qu'il est important de prendre en compte afin d'approfondir notre compréhension de la neurophysiologie des encéphalopathies épileptiques (Stern et al., 2017). Tout d'abord, bien qu'il s'agisse d'une étude humaine, elle n'inclut que des sujets adultes. Or on sait que le

profil électrophysiologique des adultes peut être différent de celui des enfants. Pour un syndrome aussi précoce que le syndrome de Dravet, des données obtenues chez l'enfant permettraient une meilleure compréhension des mécanismes qui mènent aux phénotypes cliniques qui apparaissent et s'intensifient au cours de temps. En outre, les chercheurs n'ont utilisé qu'une seule technique dans le cadre de cette étude, à savoir la stimulation magnétique transcrânienne. Avec cette approche les chercheurs ont pu montrer l'impact de la mutation du gène SCN1A sur le système GABAergique, notamment sur l'activité des récepteurs GABA-A. Cependant on peut se demander si d'une part les changements relatifs au système GABAergique dans le syndrome de Dravet sont communs à d'autres syndromes épileptiques; et si d'autre part ces changements se limitent à l'activité des récepteurs ou s'ils s'étendent aux propriétés électrophysiologiques des neurones GABAergiques ou encore à disponibilité même du métabolite. Ainsi, d'autres aspects la physiopathologie des encéphalopathies épileptiques pourraient être explorés et même corrélés avec ce qui est obtenu grâce à la stimulation magnétique transcrânienne, pour peu que différentes approches ne soient combinées.

En ce qui concerne les syndromes épileptiques liés aux gènes DEPDC5 et NPRL2 et NPRL3, l'essentiel des recherches n'a débuté qu'il y a environ dix ans. Jusqu'en 2018, un total de 140 variants des gènes du complexe GATOR1 avaient pu être répertoriés chez 183 patients atteints d'épilepsie focale; le gène DEPDC5 comptabilisant 83% des variants, NPRL2 et NPRL3 comptabilisant 6% et 11% des variants respectivement. Néanmoins, le spectre des variants des gènes du complexe GATOR1 ainsi que leurs effets physiologiques ne cesse de s'élargir. Par ailleurs, beaucoup de phénotypes épileptiques héréditaires semblent résulter de mécanismes polygéniques. De ce fait, il est encore difficile à ce jour d'établir des corrélations génotype-phénotypes propres à chaque gène. Au cours d'une étude récente, Baldassari et Baulac ont évalué les effets physiologiques de 73 nouveaux variants des gènes DEPDC5, NPRL2 et NPRL3 dans le but de parfaire le tableau clinique des pathologies liées au complexe GATOR1 (ou 'GATORopathies'). Des analyses diagnostiques ont permis de définir un spectre phénotypique varié (aussi bien en termes de sévérité que d'âge d'apparition des symptômes), allant des spasmes infantiles (10% des patients), à l'épilepsie hypermotrice liée au sommeil (36% des patients), en passant par

l'épilepsie du lobe frontal (32% des patients). Des analyses d'imagerie par résonance magnétique (IRM) et tomographie par émission de positrons (TEP) ont révélé des anomalies structurelles chez 38% des patients, la plupart étant due à des troubles du développement cortical. Chez 60% des patients de cette nouvelle cohorte, l'épilepsie était associée à des troubles cognitifs et psychiatriques; 20% d'entre eux présentaient des déficits intellectuels modérés et 6% présentaient des déficits sévères. Par ailleurs, un suivi effectué sur une période allant de huit mois à deux ans, a révélé une résistance aux traitements antiépileptiques chez 54% des patients de la cohorte.

Néanmoins, à l'instar des travaux de Baldassari et Baulac en 2019, la majorité des études menées chez l'humain sont de type exploratoire (études descriptives, rapports de cas, etc.). Pour ces syndromes, aucune étude humaine à ce jour n'adresse les mécanismes corticaux en jeu dans la physiopathologie des encéphalopathies épileptiques. Le peu de données dont on dispose, du moins les plus robustes, portent essentiellement sur le gène DEPDC5 et ne concernent encore que les modèles animaux.

Hypothèse de recherche

Considérant les données existantes, nous avons émis l'hypothèse qu'en comparaison à des individus sains, un dysfonctionnement du système GABAergique devrait être notable chez les individus porteurs de mutation des gènes DEPDC5 et NPRL3. Les mutations des gènes DEPDC5 et NPRL3 sont les plus prévalentes dans les cas d'épilepsies liées au complexe GATOR1 (Ricos et al., 2016 ; Weckhuysen et al., 2016 ; Baldassari et al., 2019). Par conséquent, du fait de la rareté de cas répertoriés de mutations du gène NPRL2, nous nous limitons aux gènes DEPDC5 et NPRL3 dans le cadre de ce projet de recherche.

Objectifs

L'objectif principal de ce projet de recherche est d'évaluer l'intégrité du système inhibiteur GABAergique dans les syndromes DEPDC5 et NPRL3. Afin d'établir un profil holistique du système GABAergique dans ces syndromes, trois approches distinctes seront utilisées, à savoir : la stimulation magnétique transcrânienne, l'électroencéphalographie et la spectroscopie par résonance magnétique.

Ces trois approches permettront respectivement :

1. La quantification des mécanismes d'inhibition et de facilitation intra corticaux médiés notamment par différents récepteurs GABAergiques.
2. La mesure des concentrations corticales et sous-corticales de neurotransmetteurs (GABA et Glutamate).
3. L'évaluation de l'activité/l'excitabilité neuronale corticale.

Les sections suivantes s'attardent à la description des outils et approches analytiques qui seront mis à profit pour atteindre ces objectifs dans le cadre de ce projet.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La stimulation magnétique transcrânienne

La stimulation magnétique transcrânienne (TMS : *transcranial magnetic stimulation*) est une technique non-invasive de stimulation du tissu nerveux, largement utilisée dans le domaine des neurosciences. En 1980, Merton et Morton se sont interrogés sur la possibilité de stimuler les muscles autrement que par l'intermédiaire de leurs terminaisons nerveuses. Ainsi, au moyen d'un stimulateur électrique à haute tension, ils ont démontré qu'il était possible d'induire une activité musculaire, via la stimulation du cortex moteur primaire, à travers le crâne (Merton & Morton, 1980). En effet, l'application d'un choc électrique sur la région du crâne surplombant le cortex moteur primaire résultait en une contraction musculaire assez brève et synchrone, mesurée par électromyographie - définie par la suite comme étant un *potentiel évoqué moteur (PEM)*. Bien qu'efficace, la stimulation électrique transcrânienne s'avère être une technique relativement douloureuse, ce qui limite ses applications en recherche tout comme en clinique. Afin de s'affranchir de cette contrainte, cinq ans plus tard, Anthony Barker propose une méthode de stimulation du cortex cérébral qui repose, non plus sur un courant électrique à haute tension, mais sur un champ magnétique de haute intensité (Barker et al, 1985). D'après le principe d'induction électromagnétique établi par Michael Faraday, en faisant circuler un courant électrique à l'intérieur d'une bobine de fil, placée à la surface de la tête, on génère un champ magnétique hautement variable et suffisamment intense pour traverser le crâne et atteindre le cerveau (Faraday, 1838; Kobayashi & Pascual-Leone, 2003). Bien qu'il soit légèrement atténué par les différents tissus qu'il traverse (peau, os, liquide cérébro-spinal, etc.) (Wanalee et al, 2015), ce champ magnétique induit à son tour un champ électrique, de courte durée et parallèle au plan de la bobine (Wagner et al., 2006; Wagner et al., 2007a; Wagner et al., 2009; Valéro-Cabré et al, 2011, Klomjai et al, 2015). La force de ce champ électrique dépend essentiellement de la variation du champ magnétique de sorte qu'une variation plus rapide du champ magnétique entraîne un champ électrique plus fort,

permettant ainsi la stimulation d'une plus large surface corticale (Cowey, 2005, Wasserman et al, 2008; Huerta & Volpe, 2009).

Le champ électrique induit par l'impulsion magnétique génère au sein du cortex des courants ioniques qui résultent en une diminution des potentiels membranaires (Amassian & Maccabee, 2006) puis une dépolarisation synchrone des neurones superficiels. Cette dépolarisation dépend notamment du type de neurone, de leur potentiel de membrane au repos, ainsi que de leur orientation par rapport au courant électrique induit. Par exemple, il a été clairement démontré que l'application de la TMS au niveau du cortex visuel primaire provoque l'apparition de tâches sombres dans le champ visuel, que l'on appelle phosphènes ainsi que la formation transitoire de lacunes immobiles dans le champ visuel, due à l'absence de perception dans une partie de la rétine (scotome). L'étude du cortex moteur et l'intégrité des voies motrices centrales fait toutefois l'objet de la majorité des travaux effectués en TMS, lesquels ont notamment permis d'approfondir notre compréhension des mécanismes régissant l'excitabilité corticale (Huerta & Volpe, 2009)

La voie corticospinale – L'ensemble des mouvements volontaires (effectués par les membres supérieurs et inférieurs) repose sur une communication efficace entre le cortex en amont et la moelle épinière en aval (Welnarz et al., 2017, Javed et al, 2021). À l'origine de cette communication, on retrouve un quota de neurones pyramidaux (p ex. cellules de Betz) essentiellement au niveau de la cinquième couche du cortex moteur primaire; mais également au niveau du cortex cingulaire moteur, du cortex prémoteur et de l'aire motrice supplémentaire. Le cortex moteur s'organise de manière somatotopique aussi bien en termes de structure que de fonction (Penfield & Boldrey, 1937; Schott, 1993). Cela implique un lien direct entre la complexité des mouvements à effectuer et l'étendue des structures qui en sont à l'origine. Ainsi, une plus grande population de neurones sera dédiée au contrôle de la main, capable de mouvements particulièrement élaborés, divers et variés. Cette communication emprunte ensuite une voie descendante majeure au sein du système nerveux central, via les axones de ces neurones corticaux qui forment le faisceau cortico-spinal (ou tractus cortico-spinal). D'un point de vue anatomique, ce faisceau traverse le tronc cérébral au niveau duquel il présente une décussation de ses fibres. Sur la face

ventrale et médiale du bulbe rachidien, les axones du faisceau cortico-spinal se regroupent pour former les pyramides bulbaires où environ 90% des fibres croisent la ligne médiane. Le faisceau cortico-spinal (ou faisceau pyramidale) ainsi croisé se prolonge donc le long du cordon latéral de la moelle épinière, pour finalement rejoindre les motoneurones et interneurones de la corne médullaire ventrale. Le faisceau pyramidal croisé contrôle essentiellement la motricité des parties distales des membres supérieurs et inférieurs (Javed et al, 2021; Saladin et al., 2021). Au niveau des pyramides, les fibres restantes (environ 10%), poursuivent une voie ipsilatérale le long du cordon ventral de la moelle épinière (faisceau pyramidale direct ou antérieur). Le faisceau pyramidal direct est impliqué dans le contrôle des parties les plus proximales des membres ainsi que des muscles axiaux (Saladin et al, 2021; Javed et al., 2021). Néanmoins, ces axones croisent également la ligne médiane au sein de la moelle épinière, préalablement à leur jonction aux motoneurones et interneurones dans la corne ventrale. De ce fait, les fibres en provenance de l'hémisphère droit émettent une commande motrice à destination des membres supérieurs et inférieurs gauches, tandis que les fibres en provenance de l'hémisphère gauche émettent une commande motrice à destination des membres supérieurs et inférieurs droits.

Excitabilité corticale - On rappelle que les neurones soumis au champ électrique induit par la stimulation magnétique transcrânienne subissent un changement de leur potentiel membranaire. Lorsqu'appliquée au niveau du cortex moteur, une impulsion magnétique provoque donc une série de transmissions descendant le long de la voie cortico-spinale (volées cortico-spinales). Au niveau cortical, la TMS évoque l'activité des neurones essentiellement de manière indirecte, ou trans-synaptique; mais également de manière directe, au niveau du cône d'émergence des axones (Hallett, 2000; Kobayashi & Pascual-Leone., 2003; Di Lazzaro & Ziemann., 2013; Stout & Beloozerova, 2013). La voie d'activation indirecte concerne principalement les neurones cortico-spinaux à conduction lente (fibres de type $A\gamma$), tandis que les neurones cortico-spinaux à conduction rapide (fibre de type $A\alpha$) sont activés de manière directe (Andrew & Part, 1972; Russell, 1980). Ce signal se propage jusqu'aux interneurones et motoneurones spinaux qui le transmettent à leur tour aux fibres musculaires cibles où est générée une réponse motrice. Cette réponse motrice consiste en une modification du potentiel membranaire des fibres musculaires que

l'on appelle potentiel évoqué moteur (PEM). On peut mesurer les PEM par électromyographie, à l'aide d'électrodes placées au niveau des muscles distaux controlatéraux (Kobayashi & Pascual-Leone., 2003; Sohn & Hallett, 2004). La génération de PEM dépend principalement de l'intensité de stimulation appliquée au niveau du cortex. Pour chaque individu, l'intensité de stimulation minimale permettant de générer des PEM est définie comme le seuil moteur au repos ou rMT (resting motor threshold), (Kobayashi & Pascual-Leone., 2003; Rossini et al., 2015). Il est d'usage courant en TMS d'acquérir plusieurs PEM par prise de mesures, puis de les moyenner afin de réduire le rapport du signal sur le bruit. La figure 1 illustre l'appareillage et le montage typiquement utilisé dans le contexte de prise de mesure en TMS.

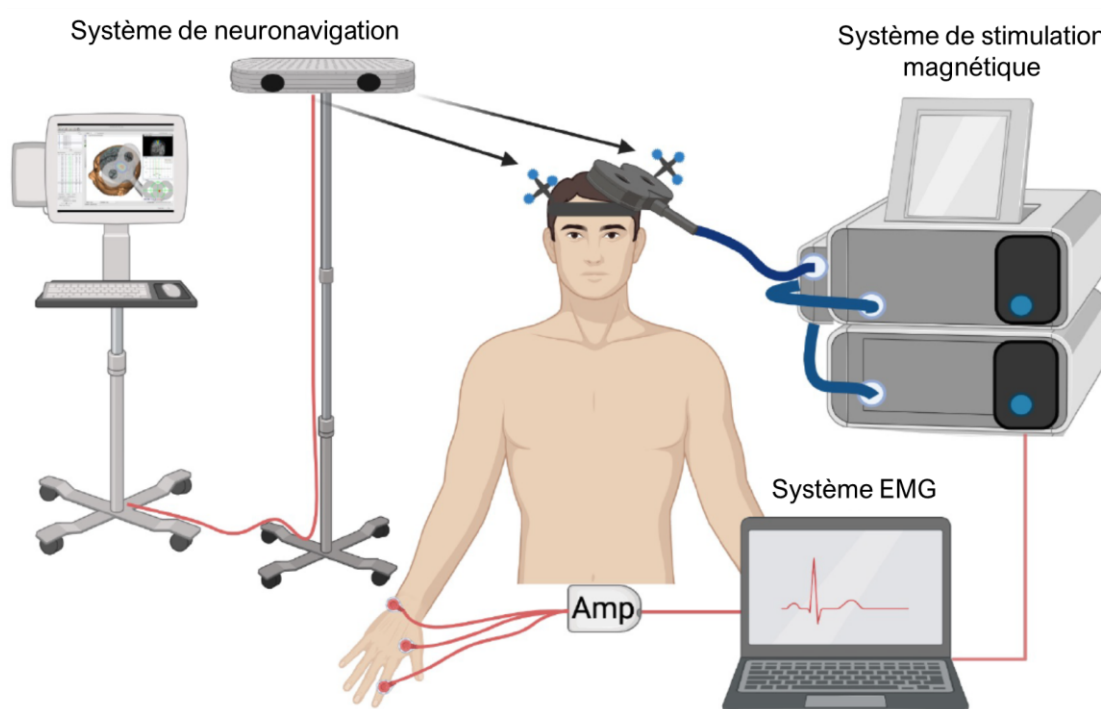


Figure 2. Procédure de stimulation magnétique transcrânienne.

Dans le cadre de notre projet, la TMS fut appliquée au niveau du cortex moteur gauche chez 21 sujets sains, 3 sujets atteints du syndrome DEPDC5 et 4 sujets atteints du syndrome NPRL3. L'impulsion magnétique a été transmise à l'aide d'une bobine de fil de cuivre en figure de 8 placée à la surface de la tête, à 45 degrés du plan sagittal médian (le long du

gyrus précentral postérieur gauche) (Rossini et al., 2015). Un système de neuro-navigation nous a permis de localiser et maintenir un site de stimulation optimal pour chaque sujet. Les PEM ont été enregistré à l'aide : d'une électrode positive, une électrode négative et une électrode de masse placées au niveau du premier muscle interosseux droit, la phalange moyenne de l'index droit, et la face médiale de l'avant-bras droit, respectivement; reliées à un système d'électromyographie informatisé (Figure 2). Le seuil moteur au repos fut établi pour chaque sujet comme l'intensité de stimulation minimale permettant d'acquérir au moins 5 PEM consécutifs d'une amplitude totale d'au moins 50 μ V, d'après la méthode de fréquence relative (Rossini et al., 1994; Groppa et al., 2012; Rossini et al., 2015). Pour chaque participant, une première série de 15 impulsions délivrées à 125% du seuil moteur au repos a été effectuée. L'amplitude des PEM obtenus a ensuite été moyennée pour constituer une ligne de base.

Tableau 2. Description des protocoles de stimulation magnétique transcrânienne.

Phénomène mesuré	Récepteurs impliqués	Type d'impulsion	Protocole de Stimulation	Ordre d'impulsions	Intervalle inter-stimuli
Inhibition	GABA-A	Appariée	SICI	1: SC - 2: ST	2 ms, 4ms
Facilitation	NMDA	Appariée	ICF	1: SC - 2: ST	10 ms, 15 ms
Facilitation	GABA	Appariée	SICF	1: ST - 2: SC	3 ms
Inhibition	GABA-B	Appariée	LICI	1: ST - 2: ST	100 ms
Désinhibition	GABA-A	Appariée	LICF	1: ST - 2: ST	220 ms
Inhibition	GABA-B	Simple	CSP	-	-
Excitabilité corticale	Canaux sodiques voltage dépendant	Simple	Courbe I/O	-	-

SC = stimulus de conditionnement. TS = Stimulus test. I/O = input/output. SICI = short interval cortical inhibition. ICF = intracortical facilitation. SICF = short interval cortical facilitation. LICI = long interval cortical inhibition. LICF = long interval cortical facilitation. CSP = cortical silent period.

Les Indices d'excitation et d'inhibition intra corticale – Comme mentionné précédemment, au niveau cortical, l'impulsion magnétique agit sur les neurones principalement de manière trans-synaptique. Via l'application subséquente d'une seconde impulsion, on peut agir sur les potentiels pré- et/ou post-synaptiques et ainsi évaluer les phénomènes d'inhibition et de facilitation intra-corticaux. En TMS, la stimulation appariée repose typiquement sur l'application d'une impulsion d'intensité inférieure à celle du seuil moteur (stimulus de conditionnement), et une impulsion d'intensité supérieure à celle du seuil moteur (stimulus test). En modulant notamment l'ordre ainsi que l'intervalle entre les deux stimuli, différents protocoles de stimulation appariés ont pu être établis. Des études pharmacologiques en TMS, ont permis de mettre en évidence le rôle de récepteurs pré- et post-synaptiques inhibiteurs (e.g. GABAergiques) et excitateurs (e.g. NMDA) au cours de ces protocoles (Ziemann et al., 2014; Ziemann, 2021). Le tableau 2 rapporte le détail des différentes procédures de stimulation utilisées dans le cadre de notre projet. C'est le rapport moyen des PEM issus de la stimulation appariée sur la ligne de base qui permet de quantifier la facilitation et l'inhibition intra-corticale. Autrement dit, les rapports moyens inférieurs à 1 témoignent d'une inhibition tandis que les rapports moyens supérieurs à 1 témoignent d'une facilitation.

La stimulation magnétique transcrânienne dans l'étude du syndrome de Dravet (Stern et al., 2017) - En 2017, Stern et collaborateurs ont mené et publié une étude qui a fourni les premières données relatives au système GABAergique dans le syndrome de Dravet chez l'humain. Via la stimulation magnétique transcrânienne du cortex moteur primaire ils ont pu évaluer et distinguer l'inhibition et l'excitation intra-corticale chez 6 patients atteints du syndrome de Dravet, 9 patients épileptiques contrôles et 10 individus sains. Entre autres protocoles de stimulation appariés les données relatives à l'inhibition corticale à intervalle court ou SICI démontrent une différence significative entre les patients atteints du syndrome de Dravet et l'ensemble des contrôles (épileptiques et sains). En effet, appliquée à 2ms et 5ms d'intervalle inter-stimuli, les chercheurs ont observé des PEM d'amplitude moyenne significativement plus élevés chez les patients atteints du syndrome de Dravet (2.18 ± 0.47 , $p < 0.0001$; 1.74 ± 1.03 , $p < 0.0001$) en comparaison aux 20 sujets contrôles (0.44 ± 0.15 , $p < 0.0001$; 0.86 ± 0.32 , $p < 0.0001$), ce qui témoigne d'un manque

d'inhibition notable et porte d'avantage d'attention sur l'intégrité des récepteurs GABA-A dans la physiopathologie du syndrome de Dravet. Ainsi les données obtenues par Stern et collaborateurs valident l'utilisation de la TMS dans l'étude d'un modèle archétypal d'encéphalopathie épileptique.

La spectroscopie par résonance magnétique

On peut définir la spectroscopie comme l'analyse d'un phénomène physique (ex. par exemple l'absorption et l'émission de lumière par la matière) via sa décomposition sur une échelle de grandeur (ex. différents niveaux d'énergies, fréquences).

Le phénomène de résonance magnétique est aujourd'hui largement exploité aussi bien dans le domaine clinique qu'expérimental. En chimie, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) permet l'identification de molécules, par l'analyse de leurs propriétés biophysiques. La résonance magnétique a particulièrement révolutionné le cadre du diagnostic clinique grâce à l'acquisition non-invasive d'images anatomiques (imagerie par résonance magnétique) ainsi que la quantification in vivo de métabolites (spectroscopie par résonance magnétique); permettant ainsi de distinguer non la structure et la biochimie du corps humain dans un contexte physiologique et pathologique.

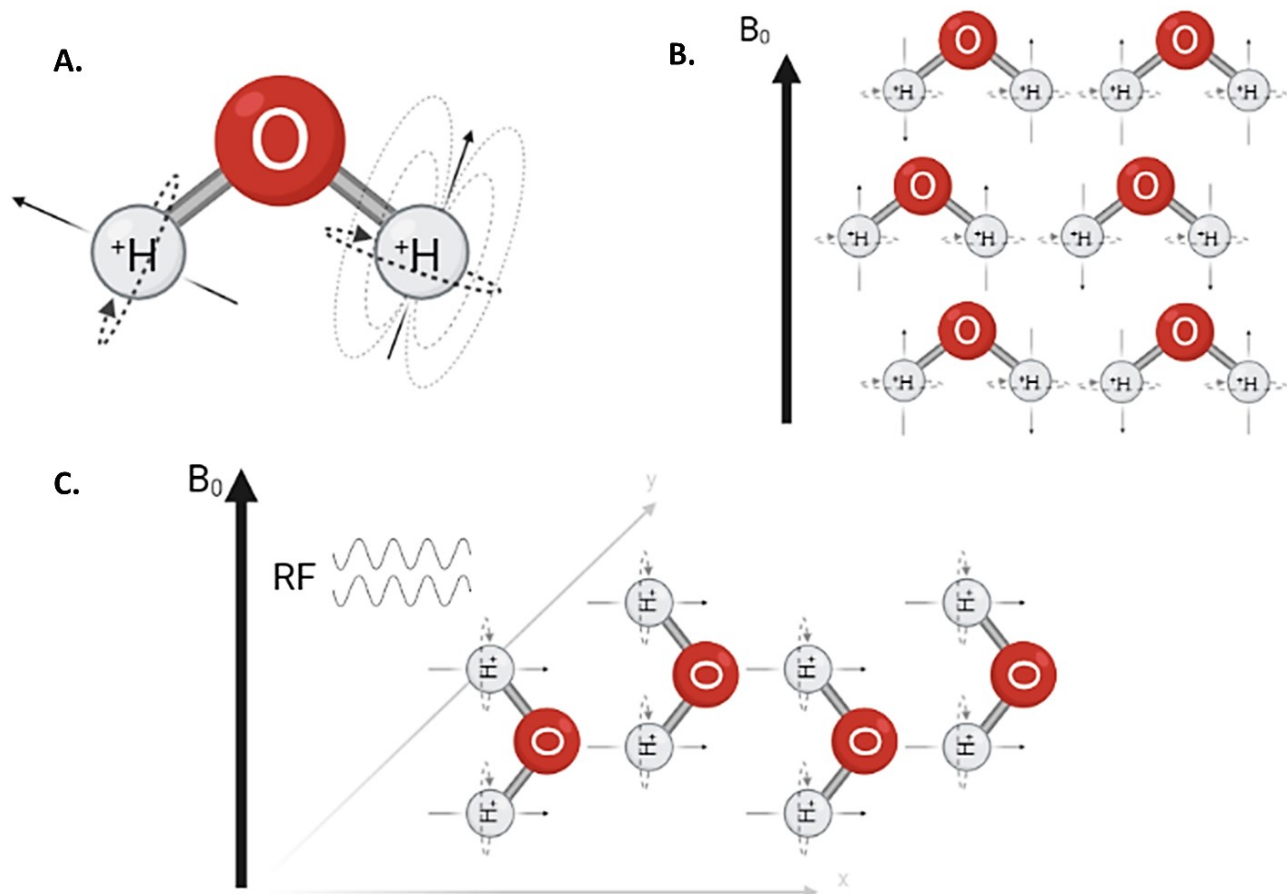


Figure 3. Magnétisme des protons des atomes d'hydrogène de l'eau. (A) En l'absence d'un champ magnétique suffisamment fort, les moments magnétiques des spins des protons des atomes d'hydrogène sont orientés de manière aléatoire. (B) Sous l'effet d'un champ magnétique (B_0), les spins des protons s'alignent par rapport au plan longitudinal et précessent autour de l'axe de B_0 (axe z). (C) L'impulsion d'une électromagnétique (de type radiofréquence) fait basculer les spins des protons du plan longitudinal vers la plan transverse.

Acquisition – L'acquisition de données d'imagerie est un nécessaire préambule à l'acquisition de données de spectroscopie par résonance magnétique. Le scanner IRM agit comme un aimant qui va permettre de générer un champ (B_0), généralement de 1.5 ou 3T. Il consiste en une bobine de fils à travers lesquels circulent un courant électrique, à très haute vitesse, créant ainsi un champ puissant champ magnétique.

Placée à proximité de la région d'intérêt (en l'occurrence le cerveau), cette bobine joue un rôle d'émetteur-récepteur pour mesurer la résonance magnétique des atomes d'hydrogène présents dans les tissus. Via des canaux émetteurs, elle émet d'une part le signal de radiofréquence (RF) qui sera absorbé par les protons des atomes d'hydrogène, et agit d'autre part comme une antenne, via des canaux récepteurs, pour recevoir l'énergie émise en retour par les protons, à la même fréquence.

Dans le cadre de la spectroscopie on s'intéresse au signal des protons présents au sein de métabolites (N-Acétylaspartate, Glutamate, GABA, etc) qui sont beaucoup moins abondants que les protons de l'eau. Ainsi les protons de ces métabolites contribuent au signal pour peu que le signal des protons de l'eau ne soit supprimé. On compte jusqu'à 25 métabolites différents pouvant être identifiés sur la base de leur nature fréquentielle grâce à la spectroscopie par résonance magnétique (Landheer et al., 2019). Par ailleurs, l'acquisition de données spectroscopiques est restreinte à de plus petites régions d'intérêt que l'on appelle les voxels. Comme pour l'imagerie, différentes séquences d'impulsion permettent la sélection d'un petit volume tissulaire (généralement de l'ordre de quelques cm^3) au sein duquel mesurer la résonance magnétique des protons et par conséquent quantifier les différents métabolites (spectroscopie à voxel unique). La séquence à résolution de points ou PRESS (Point-RESolved Spectroscopy) compte parmi les fréquences de spectroscopie les plus fréquemment utilisées. Elle consiste en une succession de trois impulsions RF (une première impulsion de 90° , suivie de deux impulsions de 180°), concomitantes à l'application de 3 gradients de sélection de tranche (selon les axes x, y et z), de sorte que le signal mesuré au TE provient des protons se trouvant à l'intersection de ces 3 axes (Mandal, 2007). Ce n'est qu'à l'issue de l'échantillonnage que l'information fréquentiel du signal est utilisée pour distinguer les protons en fonction de leur environnement chimique. Par exemple, les protons du glutamate résonnent à une fréquence différente des protons du GABA. On parle de déplacement chimique pour caractériser la fréquence de résonance des protons des différentes métabolites. Ce déplacement chimique est exprimé en parts par millions (ppm) sur le spectre correspondant au signal.

Dans les années 90, Mescher et Garwood proposent une modification de la séquence PRESS qui repose sur l'ajout de deux impulsions dites 'd'édition' (MEGA) entre les impulsions de 180 puis avant le TE (Mescher et al., 1998). Ces impulsions d'édition permettant une identification plus précise des différents métabolites. En effet, au sein de certaines molécules ont lieu des interactions indirectes entre les spins des différents protons via leurs liaison chimique, que l'on appelle le couplage scalaire. Par conséquent, en termes de fréquence et de phase, la résonance magnétique d'un système de spins diffère de celle d'un spin indépendant. En appliquant une impulsion RF spécifique à la fréquence d'un système de spin, on obtient des pics de fréquences caractéristiques de certains métabolites. Au cours des années, la séquence MEGA-PRESS (MEscher-GARwood-Point Resolved Spectroscopy) s'est révélée être l'une des méthodes les plus efficace pour l'identification et la quantification du GABA et du glutamate. Il s'agit donc de la séquence utilisée dans le cadre de ce projet. En soustrayant le spectre d'un échantillon non-édité (OFF) à celui d'un échantillon édité (ON), on génère un spectre édité pour les métabolites d'intérêt tout en s'affranchissant du signal d'autres molécules, telles que la Créatine, qui sont très proche du signal du GABA (Mullins et al., 2014; Bogner et al., 2016; Sanaei Nezhad et al., 2017).

Traitement - Les données acquises en spectroscopie par résonance magnétique reflètent d'avantage des ratios plutôt que des concentrations absolues en métabolites. Cela s'explique entre autres par les inhomogénéités microscopiques du champ magnétiques ou encore de la composition des tissue (Cecil, 2014). Différents outils informatiques ont été développés pour le traitement de données de spectroscopie par résonance magnétique.

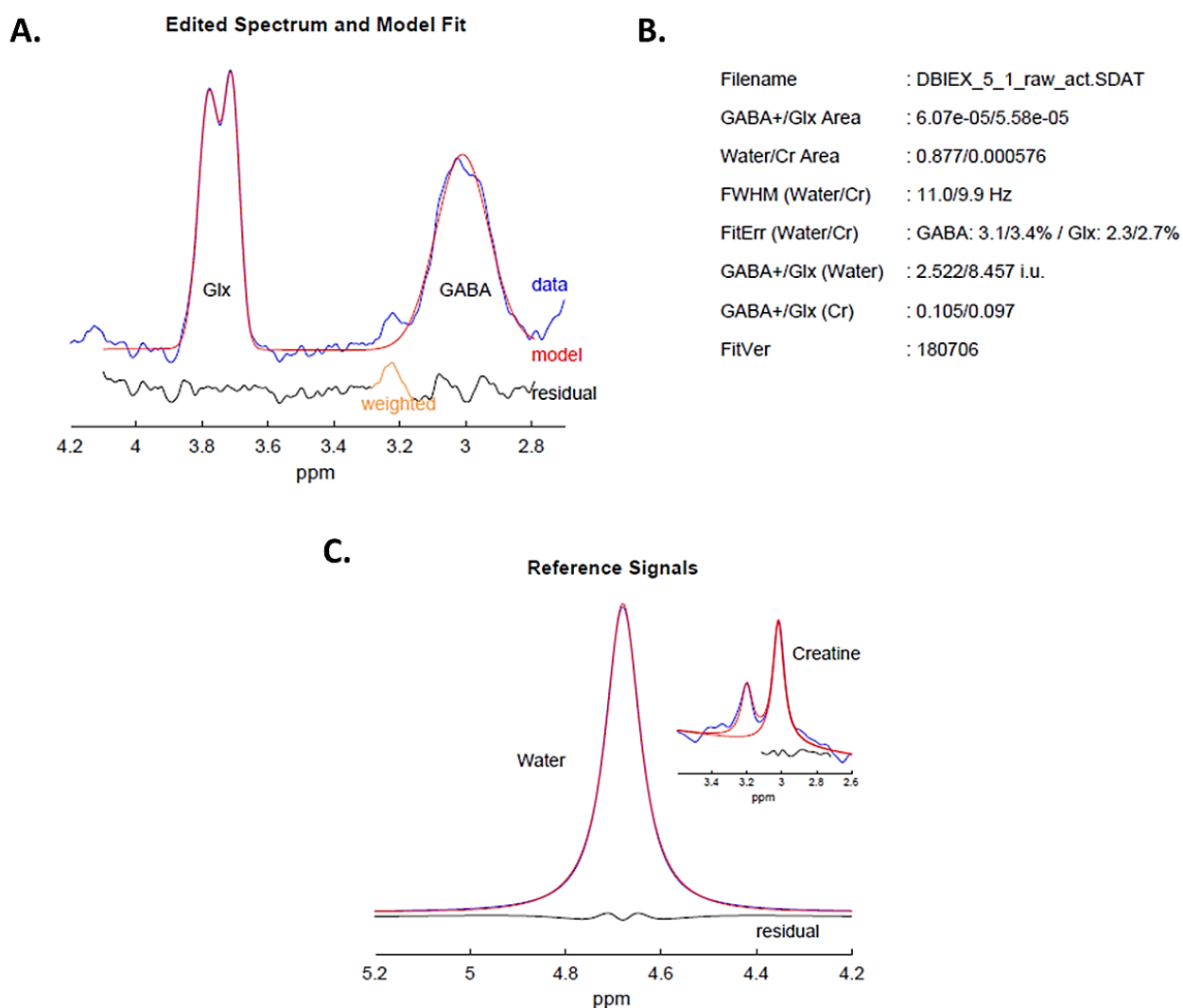


Figure 4. Traitement de données spectroscopiques via Gannet3.1. (A) Spectres différentiels édités pour le GABA et le glutamate. (B) Quantification du GABA et glutamate contenu dans un voxel. (C). Spectre des molécules de référence.

Dans le cadre de ce projet, les données sont traitées à l'aide de Gannet3.1. Gannet est une boîte à outil, implémenté dans MATLAB, conçue pour le traitement de données spectroscopiques, particulièrement les spectres différentiels édités pour le signal du GABA et du glutamate. Le traitement consiste notamment en une correction de fréquence et de phase des spins couplés du GABA et du glutamate. Une transformation de Fourier rapide est ensuite conduite afin de convertir le signal en un spectre fréquentiel. Ce spectre se

traduit par différents pics correspondant au déplacement chimique en ppm. Pour chaque lot de données, les spectres édités du GABA et du glutamate sont modélisés selon une intégrale Gaussienne, et superposés à un modèle de prédiction. Les signaux du GABA et du glutamate sont exprimés par rapport au signal de la créatine et par rapport au signal de l'eau, tous deux acquis au cours de l'échantillonnage non-édité. Les différentes mesures fournies incluent notamment : les valeurs des aires sous la courbe des modèles Gaussiens du GABA et du glutamate par rapport à la créatine et l'eau; les concentrations de GABA et glutamate par rapport à la créatine et l'eau en unités institutionnelles (Figure 4).

L'électroencéphalographie

Histoire - L'électroencéphalographie (EEG) est la technique la plus couramment utilisée pour l'enregistrement non-invasif de l'activité cérébrale. On attribue la découverte de l'EEG humain au psychiatre et physiologiste allemand Hans Berger qui, à la fin des années 1920, enregistre les premiers signaux électriques associés à l'activité cérébrale humaine. Il décrit des signaux ondulatoires de magnitude plus ou moins élevée et variant de façon rythmique lorsque les sujets avaient les yeux fermés et lorsqu'ils étaient ouverts (Swartz, B. E. 1998; Haas, L.F., 2003; Britton et al, 2016). Ces premières observations de Berger ainsi que les conclusions qu'il en a tiré ont d'abord été réfutés au sein de la communauté scientifique sur la base de différents arguments. Notamment, il était généralement admis à l'époque que l'activité cérébrale se reflétait essentiellement à travers les potentiels d'actions. Après avoir réitéré cette expérience en 1934, les physiologistes britanniques Edgar Adrian et Bryan Matthews ont confirmé les conclusions de Berger, validant ainsi l'EEG comme mesure non-invasive de l'activité électrique du cerveau. Fort de ce succès, l'EEG a ensuite été sujette à une rapide évolution qui en fait aujourd'hui un outil incontournable aussi bien dans le domaine clinique qu'expérimental.

Principes biophysiques de l'enregistrement EEG – L'activité électrique du cerveau résulte des flux de courants ioniques circulants continuellement au sein même des neurones ainsi que dans leur environnement. À l'échelle d'un neurone, le potentiel d'action reflète un courant bref et de haute amplitude générée par la modification du potentiel de membrane de

-70mV (potentiel de repos) à -55mV, et se propageant le long de l'axone. Ces potentiels d'action sous-tendent une communication qui est également médiée par la libération de neurotransmetteurs au niveau des boutons terminaux des axones. À l'échelle d'un groupe de neurones, les potentiels postsynaptiques reflètent ainsi des courants plus lents et de plus faible amplitude faisant suite à libération des neurotransmetteurs dans le milieu extracellulaire. On comprend alors que l'activité neuronale peut se traduire en signaux mesurables, à différentes échelles.

Par le biais d'analogies on peut tenter d'illustrer plus clairement ce principe. Considérons un chant interprété par un chœur mixte, au sein duquel on retrouve différentes voix féminines (soprano, mezzo-soprano, alto) et masculines (ténor, baryton, basse), des plus aigües aux plus graves. Si l'on décidait d'enregistrer cette interprétation, à l'aide d'un outil d'enregistrement audio sonore (de type dictaphone) on pourrait envisager trois cas de figure. Dans le premier, en se plaçant à proximité d'un choriste, l'enregistrement permettrait de distinguer l'alto du mezzo-soprano par exemple. Dans le même esprit, la technique du patch-clamps permet d'enregistrer les potentiels d'action générés au sein d'un neurone, via l'application d'une microélectrode à la membrane cellulaire. Dans le second cas de figure, en se plaçant à l'avant de la salle, juste devant la scène, l'enregistrement permettrait cette fois de distinguer les voix féminines des voix masculines. De la même façon, en électrophysiologie, lorsqu'on place une microélectrode au sein d'un groupe de neurones, on peut obtenir des signaux transitoires, de plus faible amplitude, qui résultent de l'activité de chaque cellule environnante. Ces signaux perçus en extracellulaire constituent les potentiels de champs locaux ou LFP (Local Field Potentials) et reflètent de l'activité de populations neuronales distinctes. Pour finir si l'on envisage un cas de figure dans lequel on serait situé à l'arrière de la salle, l'enregistrement obtenu à l'issue de l'interprétation ne permettrait plus de distinguer les types de voix (soprano, mezzo-soprano, alto ou Ténor, Baryton, Basse) ni les catégories auxquelles elles appartiennent (voix féminine ou masculine). En revanche l'enregistrement contiendrait le chant résultant de la performance de l'ensemble des choristes. Ainsi la façon dont on perçoit le chant résultant va dépendre de l'harmonisation des différentes voix, notamment en termes de gamme, d'intervalle ou encore de rythme. A l'aide d'électrodes placées à la surface de la tête, l'EEG va permettre

de détecter et d'enregistrer l'activité électrique du cerveau à l'échelle corticale. Autrement dit, à défaut d'enregistrer des potentiels d'action ou des potentiels de champs locaux l'EEG va permettre d'enregistrer la somme des potentiels post-synaptiques dans l'ensemble du cortex. Le signal perçu par l'EEG constitue ainsi la résultante globale des signaux électriques produits à l'échelle cellulaire et à l'échelle tissulaire; semblable à un chant ou une mélodie que l'on écouterait depuis le fond d'une salle de concert.

On note que la qualité du signal EEG dépendra également de différents paramètres. D'une part, il est important de mentionner que dépendamment de leur source neuronale, les potentiels électriques seront plus ou moins susceptibles de se propager à travers le cortex et ainsi être perçus au niveau du scalp. L'orientation et la structure neuronale jouent donc un rôle clé dans la production du signal perçu (Edelman & Mountcastle, 1978; Kaiser, 2005; Biasiucci et al., 2019). Les neurones pyramidaux notamment, du fait de la taille importante de leur soma ainsi que leur orientation perpendiculaire au cortex, produisent les signaux les plus forts que l'on peut enregistrer à l'aide de l'EEG. En effet, leurs dendrites se projettent jusqu'à la superficie du cortex, tandis que leur corps cellulaire se retrouvent dans les couches plus profondes. À cette orientation s'ajoute une organisation en colonne que l'on retrouve dans la plupart des régions corticales (Mountcastle, 1997), ce qui permet aux neurones pyramidaux de générer un champ électrique particulièrement stable (Luck, 2005; Buzsáki et al., 2012). D'autre part, lorsqu'ils sont générés à l'échelle de milliards de neurones, de façon simultanée et à intervalle réguliers, la sommation de ces potentiels post-synaptiques crée un champ électrique suffisamment stable pour se propager à travers le cortex. Bien qu'atténuée par divers facteurs physiques tels que la résistance produite par les différents tissus (liquide cébrospinal, os, peau, etc.), cette activité électrique conserve une magnitude suffisante pour que l'on puisse l'enregistrer au niveau du cuir chevelu. Elle se traduit par des signaux rythmiques (oscillations ou ondes) de type sinusoïdal qui se déclinent selon un spectre de fréquences allant de 0.05 à 500 Hz (Buzsáki et al., 2004, Sugiyama et al., 2021). Ainsi, la décomposition du signal EEG permet d'extraire et d'exploiter toute l'information spectrale qu'il contient. En partant de ce principe, on a pu à ce jour, caractériser cette information spectrale selon différentes bandes de fréquences. Du fait de son excellente résolution temporelle l'EEG permet non-seulement d'enregistrer

l'activité cérébrale mais également d'en évaluer l'intégrité aussi bien en condition physiologique que pathologique. C'est pourquoi, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence la prédominance ou contraire l'absence de certaines oscillations au cours de certains processus cognitifs.

Les marqueurs de l'activité corticale – Tout d'abord la bande fréquence Delta (0.5-3Hz), comprends les oscillations les plus lentes mais d'amplitude les plus élevées. Les ondes Delta sont essentiellement générées au cours du sommeil profond ou non paradoxal (sommeil à mouvement oculaires non-rapides). Inversement, leur occurrence dans le cadre de l'éveil dénote généralement des troubles du sommeil liés à certaines pathologies telles que la maladie de Parkinson, la schizophrénie ou encore la démence (Niedermeyer & da Silva, 2012). De nombreuses études, ont permis de comprendre que les oscillations de plus basses fréquences étaient prédominantes lorsque le cerveau est engagé dans une activité peu complexe. En effet, pendant le sommeil, l'essentiel de l'activité cérébrale concoure à une seule et même tâche, augmentant ainsi l'intensité ou l'amplitude du signal produit (Tinguely et al., 2006; Paquereau, 2007, Bersagliere et al., 2018). Outre leur rôle dans le sommeil, les oscillations de basse fréquence semblent également être pertinentes dans le cas de certaines dépendances tels que l'alcoolisme. En effet, Colrain et collaborateur ont mis en évidence une baisse de signal dans les basses fréquences, notamment de type delta, chez des individus alcooliques comparativement à des individus sains (Colrain et al., 2009).

Par ordre croissant de fréquences viennent ensuite les oscillations Thêta (3-8Hz) (Schomer et al., 2011). A l'instar des oscillations delta, on leur reconnait un rôle dans le sommeil, particulièrement la phase précédant l'éveil (Vyazovskiy et al., 2005). En outre, plusieurs arguments sont en faveur du rôle supposé des ondes Thêta dans les activités appelant à l'assimilation d'information et la concentration telles que la résolution de problèmes mathématiques. Plusieurs données suggèrent également que l'intensité du signal dans la bande de fréquence Thêta corrèle avec la formation de la mémoire épisodique (ou mémoire à court terme) (Klimesch, 1996; O'Keffe et al., 1999; Schack et al., 2005).

Ensuite les ondes alpha (ou rythme alpha) représentent des oscillations neuronales situées dans la bande de fréquences allant de 8 à 14 Hz (Foster et al, 2017). Aussi connues, sous le nom d'ondes de Berger, ces fréquences constituent le premier modèle d'oscillation neuronale enregistré à cette époque de la découverte de l'EEG (Karbowski, 2002). Il est maintenant communément admis que le rythme alpha émerge principalement dans le lobe occipital lors d'un état de relaxation éveillé (c'est-à-dire lorsque les sujets sont au repos, les yeux fermés), mais s'affaiblit lorsque les yeux sont ouverts (alpha blocking) (Niedermeyer, 1997). Les rythmes à basse fréquence tels que alpha, enregistré au niveau du lobe occipital, dans des conditions de relaxation, comptent parmi les signaux EEG les plus robustes.

Les oscillations Beta quant à elle s'inscrivent dans une bande de fréquence variant entre 15 et 30Hz. Elles sont principalement observées au niveau des lobes frontaux ainsi que dans le cortex sensorimoteur (Kilavik et al., 2013; Kropotov, 2016). Décrites pour la première fois par Hans Berger, elles ont été nommées d'après leur amplitude inférieure à celle du signal produit par les ondes alpha (Buzsáki, 2006). Au niveau frontal, le rythme bêta se manifeste généralement et de façon plus ou moins intense selon différents niveaux de conscience, particulièrement pendant la concentration. Les ondes bêta les plus lentes ou bêta 1 (14 à 16 Hz) reflètent généralement un état de concentration calme et intériorisé. Les ondes bêta intermédiaires ou bêta 2 (16 à 20 Hz) sont d'avantage associées à une concentration active, voire une pensée anxieuse. Les ondes bêta les plus rapides ou bêta 3 (21 à 30 Hz) sont concomitantes à un état de surexcitation, stress ou anxiété. (Baumeister et al., 2008; Abhang et al., 2016; Kropotov, 2016). En effet, ces oscillations ont été décrites par Berger comme « les phénomènes concomitants de l'activité mentale » (Berger, 1929; Kropotov, 2016).

Pour finir, les oscillation gamma se regroupent au sein de la gamme de fréquences les plus hautes connues (30-100Hz), mais de plus faible amplitude. Bien que l'EEG ne fût pas initialement conçu pour percevoir des signaux d'aussi haute fréquences, les oscillations gamma se sont rapidement retrouvées au cœur de la recherche en électroencéphalographie et dans une certaine mesure, en neurosciences. Leur rôle physiologique soulève encore à ce jour de nombreux débats mais l'hypothèse la plus soutenue affirme le rôle des oscillations

gamma dans le traitement et l'intégration de l'information sensorielle, pris en charge par différentes régions corticales (Sörnmo, 2005; Ray & Maunsell, 2014; Leicht et al., 2021). D'autres données encore supportent l'implication des ondes gamma dans l'attention, l'apprentissage et la mémoire à long terme (Tiitinen et al., 1993; Herrmann et al., 2004; Headley & Weinberger, 2011).

Le contraste entre les différentes bandes de fréquences et les fonctions auxquelles ont les associées permet d'entrevoir une corrélation négative entre la fréquence et l'amplitude du signal EEG. Autrement dit, l'amplitude du signal est d'autant plus grande que la fréquence est basse. Inversement, l'amplitude du signal est d'autant plus faible que la fréquence est haute, dans le cas d'une activité cérébrale plus complexe. Par ailleurs, malgré la robustesse du spectre conventionnel des fréquences, certains biais sont à prendre en compte lorsqu'on procède à la décomposition du signal EEG (Annexe 3). Notamment ce procédé repose sur l'hypothèse selon laquelle l'intégralité du signal est de type sinusoïdal. Or, l'activité électrique corticale résulte plutôt d'un amalgame complexe de signaux sinusoïdaux et non-sinusoïdaux, rythmiques et parfois arythmiques.

La décomposition du signal EEG nous permet d'analyser l'information spectrale relativement à deux facteurs essentiels à la compréhension et l'interprétation de l'activité cérébrale que l'on va pouvoir quantifier.

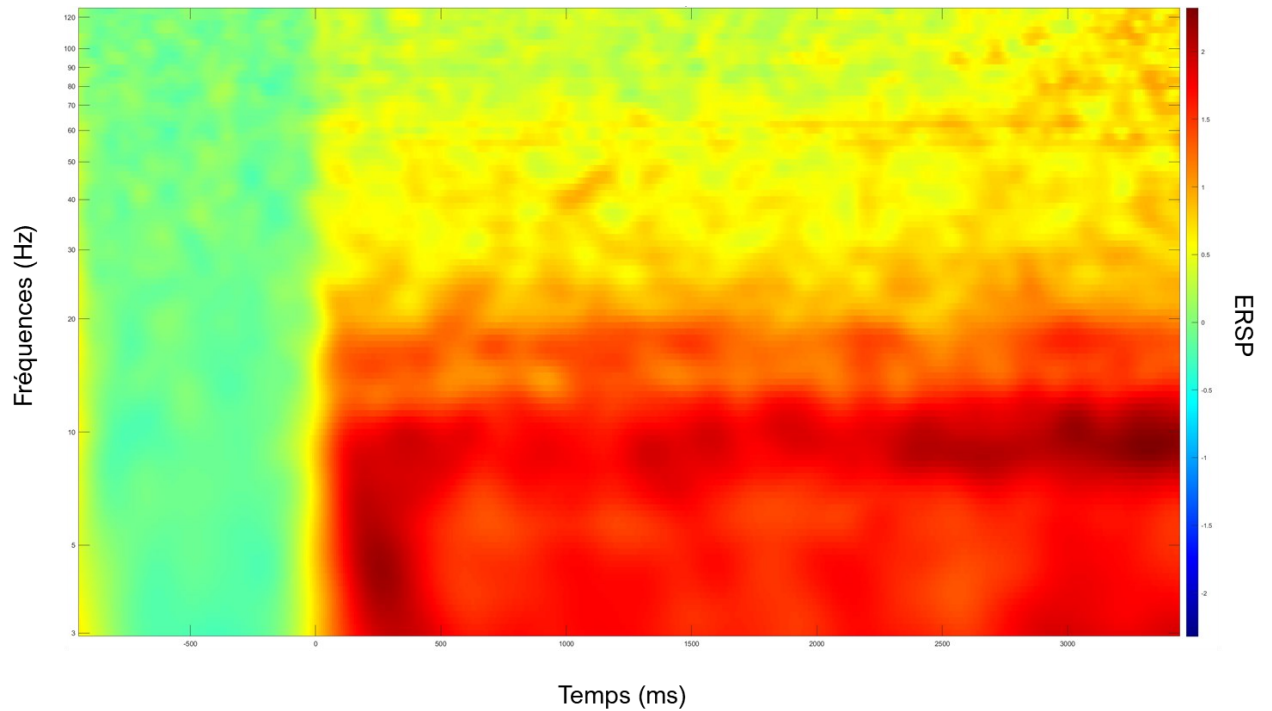


Figure 5. Carte de perturbation spectrale liée à l'évènement (ERSP) moyenne. La carte ERSP moyenne reflète la variation de la puissance des différentes fréquences au cours du temps, par rapport à la ligne de base (zone verte). Les zones qui tendent vers le rouge représentent une augmentation de la puissance spectrale tandis que les zones qui tendent vers le bleu représente une diminution de la puissance spectrale.

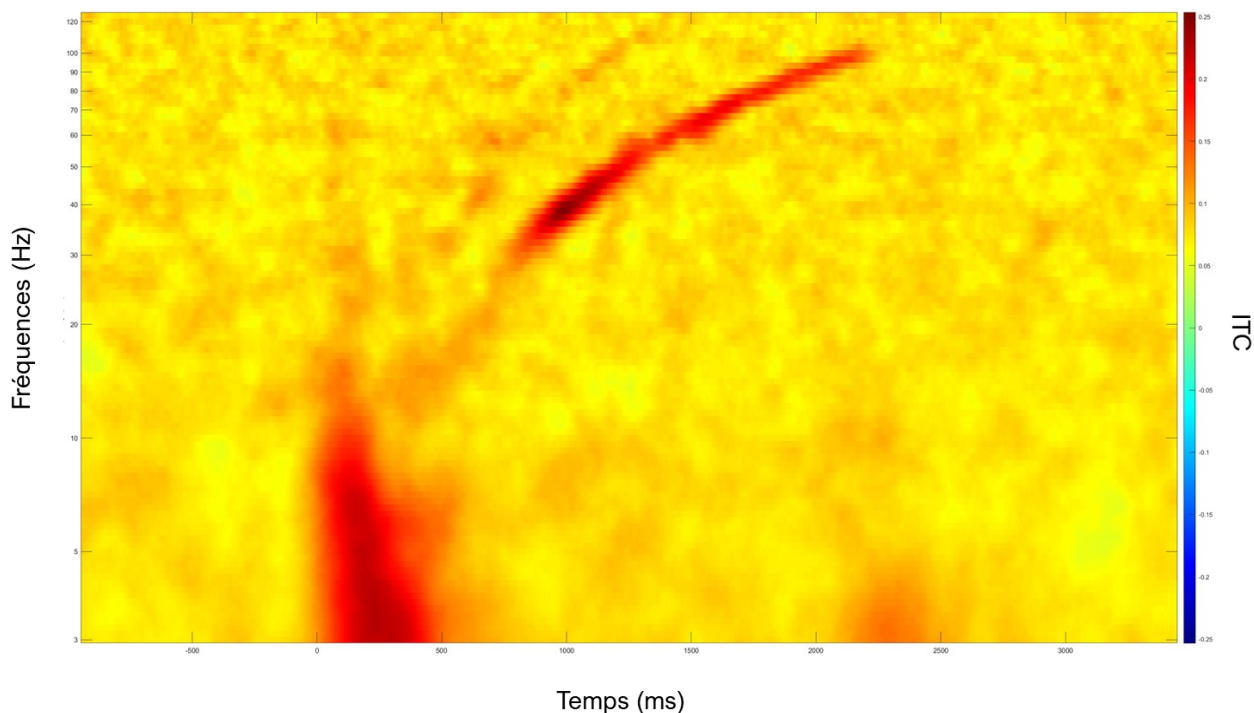


Figure 6. Carte de cohérence inter-essais (ITC) moyenne. La carte ITC moyenne reflète la cohérence des phases oscillatoires en réponse au stimulus, à travers les essais. La cohérence inter-essais (ITC) représente un indice de synchronisation défini entre 0 et 1. Sur la carte, les zones qui tendent vers le rouge représentent une augmentation de la puissance spectrale tandis que les zones qui tendent vers le bleu représente une diminution de la puissance spectrale.

L'analyse temps-fréquence nous renseigne donc sur : (1) la puissance spectrale (c'est-à-dire l'amplitude ou l'intensité) de chaque fréquence qui constitue le signal, et que l'on définit comme la perturbation spectrale liée à l'événement ou ERSP (Event-Related Spectral Perturbation) (Figure 5). (2) la cohérence de phase de ces différentes fréquences à travers les essais (c'est-à-dire la stabilité de la réponse cérébrale suite une stimulation externe répétée), que l'on définit comme la cohérence inter-essais ou ITC (Inter-Trial Cohérence). (Figure 6). La décomposition du signal EEG sur la base fréquentielle, permet de distinguer l'activité cérébrale évoquée (observée en réponse à un stimulus externe) de l'activité cérébrale spontanée. Dans la mesure où le cerveau est constamment en activité, l'EEG ouvre une nouvelle fenêtre sur la dynamique temporelle de certaines fonctions cérébrales non seulement en condition physiologique mais aussi en condition pathologique. En modulant certains paramètres tels que le type de stimulation, la durée du stimulus, ou

encore le mode de présentation du stimulus, on peut évoquer l'activité cérébrale de façon relativement stable et surtout de façon répétée. Ainsi, dans la majorité des études ayant recours à l'EEG, le signal résultant est moyenné afin de minimiser l'effet des artéfacts électriques tels que l'activité cardiaque, l'activité musculaire ou encore les signaux électriques ambiants (Biasucci et al, 2019).

Des données obtenues chez l'animal et l'humain relatives au déséquilibre entre excitation et inhibition corticale, nous permettent d'anticiper une activité significativement moins importante des récepteurs GABAergiques révélée par la stimulation magnétique transcrânienne (Stern et al., 2017). Par ailleurs, les modèles animaux de mutation des gènes DEPDC5 et NPRL3 démontrent de façon unanime une hyperexcitabilité corticale, notamment des neurones pyramidaux. Bien que mesurée directement au niveau du cortex chez l'animal, nous pouvons nous attendre à ce que cette hyperexcitabilité soit également notable chez l'humain, lorsque mesurée à la surface de la tête, via l'électroencéphalographie.

À ce jour, on ne trouve que très peu d'étude utilisant la spectroscopie par résonance magnétique comme outil d'investigation dans l'épilepsie focale. Cependant, il est plausible de prédire un déséquilibre biochimique en faveur du principal neurotransmetteur exciteur, à savoir le glutamate, et donc au détriment du GABA dans le cas des syndromes épileptiques liés aux gènes DEPDC5 et NPRL3. Par ailleurs, on rappelle que nombre de traitements antiépileptiques agissent directement sur le système GABAergique, empêchant par exemple la recapture et le recyclage du GABA et augmentant par conséquent sa disponibilité extracellulaire.

ARTICLE 1

Neurophysiological assessment of cortical activity in DEPDC5- and NPRL3-related epileptic mTORopathies.

Auteurs de l'article: Madora Mabika¹, Kristian Agbogba^{3,4}, Samantha Côté¹, Sarah Lippé^{3,4,5,6}, Émilie Riou^{1,2}, Cécile Cieuta^{1,2}, Jean-François Lepage^{1,2}.

¹Département of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Sherbrooke University, Sherbrooke, Canada.

²Sherbrooke University Hospital Research Center, Sherbrooke, Canada.

³Neuroscience of Early Development (NED), Montreal (QC), Canada.

⁴Research center of the CHU Sainte-Justine Mother and Child University Hospital Center, Montreal (QC), Canada.

⁵Department of Psychology, Université de Montréal, Montreal (QC), Canada.

⁶Centre de Recherche en Neuropsychologie et Cognition (CERNEC), Montreal (QC), Canada.

Statut de l'article: Soumis

Journal : Orphanet Journal of Rare Diseases

Contributions:

Investigateur principal : Jean-François Lepage

Responsable de l'analyse des données EEG: Sarah Lippé

Recrutement des participants : Dr. Cécile Cieuta, Dr. Émilie Riou

Traitement et analyses des données EEG : Kristian Agbogba

Première auteur, responsable de la collecte et du traitement des données : Madora Mabika

Number of words in abstract: 149

Number of words in the main text: 6340

Number of figures: 8

Number of tables: 1

*Corresponding author

Jean-Francois Lepage, PhD

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences

Sherbrooke University

3001-12th Avenue North.

Sherbrooke (Québec) J1H 5N4

Phone. 819-821-8000, ext. 71020

Email. jean-francois.lepage@usherbrooke.ca

Résumé de l'article :

Les mutations des gènes du complexe GATOR1 (DEPDC5, NPRL2, NPRL3) sont régulièrement associées à différents phénotypes épileptiques réfractaires et à des risques accrus de mort subite inattendue. Les études animales de ces mutations ont mis en évidence le rôle du système GABAergique dans ce processus physiopathologique, mais jusqu'à présent les données humaines sont rares et aucun consensus n'existe quant à l'effet de ces mutations sur les mécanismes inhibiteurs ou excitateurs chez l'humain.

Dans cet article, nous avons évalué les fonctions corticales inhibitrices et excitatrices chez des patients épileptiques et des porteurs sains de mutations DEPDC5 et NPRL3 en utilisant une combinaison de techniques non invasives, qui inclue notamment la stimulation magnétique transcrânienne, la spectroscopie par résonance magnétique protonique et l'électroencéphalographie. Nous montrons que les variants épileptiques DEPDC5 et NPRL3 présentent des signes électrophysiologiques d'hyperexcitabilité corticale, vraisemblablement médiée par une exacerbation de l'activité de mTOR.

Neurophysiological assessment of cortical activity in DEPDC5- and NPRL3-related epileptic mTORopathies.

Madora Mabika¹, Kristian Agbogba^{3,4}, Samantha Côté¹, Sarah Lippé^{3,4,5,6}, Émilie Riou^{1,2}, Cécile Cieuta^{1,2}, Jean-François Lepage^{1,2}.

¹Département of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Sherbrooke University, Sherbrooke, Canada.

²Sherbrooke University Hospital Research Center, Sherbrooke, Canada.

³Neuroscience of Early Development (NED), Montreal (QC), Canada.

⁴Research center of the CHU Sainte-Justine Mother and Child University Hospital Center, Montreal (QC), Canada.

⁵Department of Psychology, Université de Montréal, Montréal (QC), Canada.

⁶Centre de Recherche en Neuropsychologie et Cognition (CERNEC), Montréal (QC), Canada.

*Corresponding author:

Jean-Francois Lepage, PhD

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences

Sherbrooke University

3001-12th Avenue North.

Sherbrooke (Québec) J1H 5N4

Phone. 819-821-8000, ext. 71020

Email. jean-francois.lepage@usherbrooke.ca

Abstract

Background

Mutations in the GATOR1 complex genes, DEPDC5 and NPRL3, play a major role in the development of lesional and non-lesional focal epilepsy through increased mTORC1 signalling. We aimed to assess the effects of mTORC1 hyperactivation on GABAergic inhibitory circuits, in 3 and 5 individuals carrying DEPDC5 and NPRL3 mutations respectively using a multimodal approach including transcranial magnetic stimulation (TMS), magnetic resonance spectroscopy (MRS), and electroencephalography (EEG).

Results

Inhibitory functions probed by TMS and MRS showed no effect of mutations on cortical GABAergic receptor-mediated inhibition and GABA concentration, in both cortical and subcortical regions. However, stronger EEG theta oscillations and stronger and more synchronous gamma oscillations were observed in DEPDC5 and NPRL3 mutations carriers.

Conclusions

These results suggest that DEPDC5 and NPRL3-related epileptic mTORopathies may not directly modulate GABAergic functions but are nonetheless characterized by a stronger neural entrainment that may be reflective of a cortical hyperexcitability mediated by increased mTORC1 signaling.

Keywords

mTORC1, GATOR1, DEPDC5, NPRL3, epilepsy, GABA, inhibition TMS, MRS, EEG

Introduction

The mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR) has been shown to play a crucial role in the developing brain, supporting the differentiation and migration of neural progenitors [1,2], as well as myelination through the differentiation of oligodendrocytes [3]. Accumulating data converge towards the role of multiprotein complexes mTOR Complex 1 (mTORC1) activation in synaptic plasticity and memory consolidation [4–7]. Hence, the balanced activity of mTORC1 signaling is critical to the structural and functional development of the central nervous system and depends on a proper upstream regulation of the complex. Particularly, the amino acid-responsive nature of mTORC1 constitutively promotes its activation [8] ; therefore, the GAP-activity-toward-RAGs complex 1 (GATOR1) acts as a strict regulator to mTORC1, inhibiting its activity. Unsurprisingly, upstream dysregulations of mTORC1 signaling have emerged as important mechanisms underlying various neurological disorders [9,10] , many of which are marked by intractable epilepsy [11,12]. In fact, loss-of-function mutations in GATOR1 genes such as DEPDC5, NPRL2, NPRL3 have been frequently associated with malformations of cortical development leading to focal, drug-resistant epilepsy with fair risks of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) [13–18]. Consistent with what has been observed in resected human brain tissues, following epileptic surgeries, animal models of GATOR1 genes knockdown have exhibited altered neuronal networks' morphology and excitability [19].

Rodent models have pointed DEPDC5 loss-of-function mutations as a major cause of focal epilepsy mediated by mTORC1 hyperactivation [20–22]. Such models have uncovered the role of DEPDC5 in the architectural and functional development of excitatory neuron networks. Frequently associated with focal cortical dysplasia, the broad spectrum of DEPDC5-related epilepsies appears ever more relevant to the hypothesis of a ‘two-hit’ germline and somatic mutational mechanism [23–25]. More recently, a mouse model of NPRL2 and NPRL3-related mTORopathies could be assimilated to DEPDC5 knockdown models, displaying increased spontaneous seizures and cellular dysmorphism, specific to excitatory networks and astrocytes; a phenotype that is significantly alleviated with rapamycin treatment [26]. A recent study further showed a dose-dependent effect of DEPDC5 knockdown in increasing the intrinsic activity of excitatory neuron networks, mediated by mTORC1 hyperactivation [27], while the inactivation of DEPDC5 highlighted a novel role of mTORC1 upregulation in the pathogenesis of epilepsy through defects in the development of GABAergic neural networks in the zebrafish [28]. Particularly, the inactivation of DEPDC5 downregulated GABAergic branching related genes thereby reducing seizures threshold [28]. Altogether, these data support a causative link between aberrant mTORC1 activity and cortical hyperexcitability leading to epileptic phenotypes in animal models of mTORopathies. Although animal models’ data coincide on the effects of mTORC1 hyperactivation on cortical excitability, whether the imbalance underlying epileptogenesis is mostly due to excessive excitation or lack of inhibition remains elusive.

Alterations in GABAergic function have regularly been associated with in archetypal models of epileptic encephalopathies [29–31]. Using transcranial magnetic stimulation Stern and colleagues showed a significant lack of GABA_A-mediated inhibition in patients

with Dravet syndrome (SCN1A mutation carriers) [32]. Alternatively, Sanchez-Carpintero and collaborators used electroencephalography (EEG) to show reduced brain gamma oscillations, putatively reflective of GABAergic interneurons activity [33], in response to auditory stimulation in Dravet children compared to healthy controls [34]. Consistent with the effects of the SCN1A gene mutation observed in mouse models of Dravet syndrome, this finding confirms impaired gamma oscillatory activity as a relevant marker of the disease. In type 1 neurofibromatosis (NF1), proton magnetic resonance spectroscopy was used to elucidate the effect of NF1 mutation on the GABAergic function and revealed a significant decrease in cortical GABA concentrations in NF1 patients compared to healthy controls; thus, clarifying the mediating role of GABAergic dysfunction on cognitive impairments observed in NF1 patients [35].

In the present study we address markers of cortical excitability and GABAergic function in DEPDC5 and NPRL3 mutations carriers, as well as in healthy controls, using transcranial magnetic stimulation (TMS), magnetic resonance spectroscopy (MRS) and electroencephalography (EEG) as complementary measures of GABAergic function. We hypothesized that the dynamic between cortical excitation and inhibition should be significantly imbalanced at the expense of inhibitory functions, in DEPDC5 and NPRL3 mutations carriers compared to healthy subjects. Particularly, we suspected this imbalanced to either origin from a dysfunction in GABAergic receptors-mediated inhibition, lower GABA concentrations, cortical hyperexcitability, or from a combination of these mechanisms.

Material & Methods

Participants & Study design

Twenty-nine (29) participants (12-65 years old; Mean: 28.9; SD: 10.9) took part in the experiment. Participants were divided into three groups: (1) 21 healthy adults subjects; (2) 3 patients with DEPDC5 mutation; (3) 5 patients with NPRL3 mutation (Table 1 for details of DEPDC5 and NPRL3 patients). Healthy adult subjects were recruited via word of mouth and public ads. Patients with DEPDC5 and NPRL3 mutations were recruited by treating neurologists from the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS). All participants were screened for TMS and MRI contraindication using standard questionnaires [36] prior to testing. The presence of metallic items or device in the body and any history of traumatic brain injury were considered as absolute exclusion criteria. Signed informed consent was obtained from all adult participants and from minor participants' legal representatives. The study was approved by the local ethics committee (Comité d'Éthique de la Recherche du CIUSSS de l'Estrie – CHUS) and met the standards of the 1964 Helsinki Declaration. Participants were invited to the CHUS research center for a single visit. In a random order, each participant was submitted to a 1h transcranial magnetic stimulation (TMS) session, a 1h magnetic resonance spectroscopy imaging and 1h30 EEG recording. When testing epileptic patients, foam mats were installed in the TMS room, and pediatric neurologists were available on call (CC, ER) for immediate support in the unlikely event of a seizure during the experiment, either spontaneous or related to the use of TMS.

Transcranial Magnetic Stimulation (TMS)

Experiment - TMS was performed using a Magstim Bistim2 apparatus (The Magstim® BiStim², Wales, UK) equipped with a 70mm figure-of-eight coil. We were inspired by the work of Morin-parent and collaborators in fragile X syndrome to assess intracortical activity following the same TMS paradigms and using similar experimental settings [37]. A test stimulus (TS), set at 125% of the resting motor threshold (rMT - established using the relative frequency criterion [38]) was applied in single-pulse procedures assessing cortical excitability (100-150% of rMT pulses in 10% steps) and corticospinal silent period (during voluntary muscle contraction at 20% of maximum force). TS was paired with a conditioned stimulus (CS), set at 70% of rMT, with different interstimulus intervals (ISI) in procedures assessing: short intracortical inhibition (SICI – 2ms, 4ms ISI), intracortical facilitation (ICF – 10ms, 15ms ISI), Short intracortical facilitation (SICF – 3ms ISI) and Long intracortical inhibition and facilitation (LICI/F – 100ms and 220ms ISI). Fifteen trials were obtained for each of these measures, providing a Chronbach's alpha >.90 [39].

Data processing - TMS data was processed offline using LabChart 8 (ADInstruments) on a Macintosh Powerbook. TMS-elicited peak-to-peak MEP amplitudes were measured for all protocols (Figure 1), except for the CSP. Average peak-to-peak MEP amplitudes were calculated for baseline MEP, SICI (2-4ms), ICF (10-15ms), and SICF (3ms), For SICI, ICF and SICF, ratios were computed over baseline MEP to obtain indices of inhibition (<1) or facilitation (>1). For each trial of the LICI (100-220ms), the amplitude of the second MEP was divided by the amplitude of first to compute ratios of inhibition, which were then averaged. Average peak-to-peak MEP amplitudes were also calculated for each intensity of the cortical excitability gradient to produce input/output curves. The CSP was defined as the average duration (ms) between TMS pulse and the return to baseline EMG activity.

Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS)

Experiment - Magnetic resonance imaging took place at the molecular imaging center of Sherbrooke (CIMS), located at the CRCHUS. MRI and MRS data were acquired using a whole-body 32-channel head coil scanner (Ingenia 3.0T MR system, Philips, USA). Each session began with the acquisition of anatomical images of the whole brain in T1-weighted contrast. These images were then used as a benchmark for the placement of the spectroscopic voxels of interest (VOI, 18 cm³). Two single voxel spectroscopy measurements were obtained, the first VOI was placed in the occipital cortex bilaterally, and the second VOI was placed on the basal ganglia's globus pallidus of the left hemisphere (Figure 2). The MEscher-Garwood Point RESolved Spectroscopy (MEGA-PRESS) sequence [40] was used to measure the signals of the metabolites of interest, applying the following parameters: TR (repetition time) = 2000ms; TE (echo time) = 68ms; Excite flip angle = 90°; Refocus flip angle = 180°. Water suppression was first performed applying a water-suppressing band at 4.7 ppm, using the excitation technique.

Data processing - Data were processed with the Gannet3.1 (GABA-MRS Analysis Tool) pipeline in MATLAB. Tissue segmentation was performed using SPM to acquire grey matter, white matter, and cerebrospinal contents within each voxel. GABA and glutamate concentrations were corrected for voxels' gray and white matter contents and normalized to groups-average contents for all the participants [41] (Supplementary figure 1).

Electroencephalography (EEG)

Experiment - The EEG recording was performed using a 64 channel ActiCap Slim (Brain Products©). Electrode wires were gathered in two sets of 32 bundles through splitter boxes

then routed to two standard BrainAmp amplifiers (Brain Vision Solutions©). The signal was digitized through a USB 2 adapter connected to the amplifiers then recorded at the computer using Brain vision recorder at a 1000 Hz sampling rate. Participants were comfortably seated on a chair with their back to the EEG installation. Auditory stimuli were presented using Psyscope XB77 software. Sounds were transmitted through audio speakers placed bilaterally, approximately 25cm from their ears, with sound volume set at 65. During the procedure, participants watched a silent movie to facilitate collaboration and avoid movement artefacts as much as possible. The task was similar to the one used by Ethridge and colleagues [42,43] where an auditory chirp stimulus made of a pure tone (1000Hz) which amplitude was modulated by a sinusoid increasing linearly in frequency from 0 to 120 Hz over 2000ms was presented 160 times, with ISI varying randomly between 1500 and 2500ms.

Signal processing - Signal preprocessing was performed using the EEGLAB toolbox in MATLAB. A 0.5 – 150 Hz bandpass and a 60 Hz notch filter were applied. Prior further processing steps, 19 electrodes with poor signal quality were removed in the anterior-frontal, frontotemporal, temporal, parietal, and parieto-occipital regions, for all participants. Upon visual inspection additional noisy electrodes were manually removed, and all electrodes for which the signal amplitude had a standard deviation of less than 2mV and greater than 120 mV were automatically removed. On average 40 (\pm 4) electrodes were conserved for healthy subjects and 37 (\pm 4) for patients. Blinks, saccades, and cardiac activity-related artifacts were isolated using Independent Component Analysis (ICA), and the artifacted components were then rejected, blind to participant groups. Data was segmented into 4.5 seconds epochs (1s pre-stimulus and 3.5s post-stimulus). Artifact rejection was performed semi-automatically: epochs containing amplitudes $> 200 \mu\text{V}$ and $<$

-200 μ V were tagged and artifactual segments were manually removed during subsequent visual inspection, accounting for all remaining artifacts (movement etc.). On average, 140 (± 19) epochs were kept for controls and 131 (± 29) epochs were kept for patients after this step. For data quality and interpretation purposes, all subsequent analyses focused on four defined regions of interest (ROI), defined by an average of a specific group of electrodes located over the frontal region (Fz: F3, F1, Fz, F2, F4), central region (Cz: C1, Cz, C2, FC1, FCz, FC2), parietal region (Pz: P3, P1, Pz, P2, P4); and occipital region (Oz: O1, Oz, O2, PO3, POz, PO4). (Supplementary figure 2)

Time-Frequency Analyses – Time-frequency analyses were performed in EEGLab (implemented in MATLAB). Event-related spectral perturbation (ERSP) and inter-trial coherence (ITC) indices were used to quantify frequencies' amplitude and phase coherence across trials. Whole sample ERSP and ITC maps were generated for all regions of interest. The complex Morlet wavelet transform was used to get ERSP and ITC components of the signal. Evoked responses were marked by greater phase-locking over the frontal region, from which two masks were then generated by selecting all points with an ITC > 0.13 . A first mask was generated for the response to the chirp onset and a second mask was generated for the entrainment response to the chirp sound (Figure 3). These masks fitted into fixed time ranges (onset response: 0 to 500ms; entrainment response: 750 to 2250ms) which allowed us to extract within-masks frequencies' amplitude and phase coherence indices from all ERSP and ITC maps across subjects. For all regions of interest, these values were then modeled as curves indicating the average ERSP increase (logarithmic gain in decibels) on one hand; and the average ITC increase (synchronization gain) on the other hand, in all subjects.

Statistical analyses

Analyses were performed using the Jamovi statistical software (The Jamovi project (2021), version 2.2.1) and in MATLAB. For all TMS, EEG and MRS measurements, assumption of normality and equality of variances were checked using the Shapiro-Wilk and Levene tests respectively. Differences between groups were computed using One-way ANOVA. For both masks, group-average ERSP and ITC were calculated across trials, for the 4 regions of interest. For the chirp onset response mask, areas of maximum power (ERSP) and phase-locking (ITC) were identified (based on the curves of average amplitude and synchronization increases) and set for analyses for frequencies ranging from: 3 to 8 Hz (Theta band), 8 to 14 Hz (Alpha band), and 14 to 17 Hz (Beta band). For the chirp entrainment response, areas of maximum power (ERSP) and phase-locking (ITC) were similarly identified and set for analyses for frequencies ranging from: 30 to 55 Hz (low gamma) and 65 to 100 Hz (high gamma). Differences between groups were then computed in Jamovi using One-way ANOVA and were considered significant for $p < 0.05$. Post hoc analyses were conducted with Tuckey and Games-Howell tests.

Results

The TMS session could not be completed in one participant with DEPDC5 mutation, and one participant with NPRL3 mutation was excluded based on medical advice from the treating neurologist. One NPRL3 carrier refused to proceed to the MRS experiment. Due to technical issues, EEG data acquisition could not be completed for two NPRL3 carriers.

TMS – For all pair-pulsed TMS measures, the one-way ANOVAs showed no significant difference between the three groups (all $p > 0.05$), suggesting no sizable changes in intracortical excitation and inhibitory mechanisms (Figures 4). Similarly, no difference was observed for TMS measures pertaining to cortical excitability and cortical silent period (Supplementary Figure 3 & 4).

MRS - The three groups did not differ in terms of tissue content proportions within both spectroscopy voxel ($p > 0.05$). No significant differences were observed with regards to extracellular GABA or Glx concentrations in either voxel (Figure 5).

EEG – Significant differences in EEG onset and entrainment responses to the chirp sound were found in DEPDC5 and NPRL3 individuals as compared to healthy subjects, particularly in the theta (ERSP: $F = 6.518$, $p = 0.006$; ITC: $F = 6.482$, $p = 0.006$) and gamma (ERSP: $F = 10.1$, $p < 0.001$; ITC: $F = 6.42$, $p = 0.006$) frequency ranges (supplementary figures 5-7). However, we must keep in mind that each mutation seems to affect carriers' GABAergic functions differently as some display epileptic phenotypes whereas other are seizure-free (Table 1). In addition to the lack of statistical power, one may question the relevance and validity of such differences.

In this context, using a descriptive, rather than a statistical approach, EEG results are presented

here on a case-by-case basis comparing the results of an epileptic patient and a seizure-free carrier

in each of the DEPDC5 and NPRL3 subgroups. To our knowledge, none of the DEPDC5 and NPRL3 carrier and epileptic patients had a history of cortical dysplasia. In the absence

of further clinical data (EEG recording, MRI data) that would have directed the analysis of our results, we focus here on the regions that were prone to the most significant differences within theta and low gamma frequency ranges, during group-average comparisons, namely the frontal and parietal regions.

When comparing DEPDC5 epileptic patient and seizure-free carrier, oscillatory responses modulated by the stimulus onset could be observed within low frequency bands, in both individuals. Over the frontal and parietal regions, these responses were marked by increased spectral power and phase coherence that appear more significant in the seizure-free carrier compared to the epileptic patient, as indicated by the color bar (Figure 6). On one hand, In the epileptic patient, the stimulus onset induced oscillatory responses associated with $2 \text{ dB} < \text{ERSP} < 3 \text{ dB}$ in the frontal region and $2 \text{ dB} < \text{ERSP} < 3 \text{ dB}$ in the parietal region, within 3 – 10 Hz (Figure 6A). On the other hand, both frontal and parietal oscillatory responses are associated with $\text{ERSP} \geq 3 \text{ dB}$ in the seizure-free carrier, particularly within theta (3-8Hz) frequency range (Figure 6B). In response to the stimulus onset, the seizure-free carrier also showed a significantly more increased theta phase coherence ($\text{ITC} \geq 0.25$) over the frontal and parietal regions (Figure 6B), which was only observed over the parietal region in the epileptic patient (Figure 6A)

Similar patterns are observed for entrainment responses to the chirp sound across trials, pertaining to high frequency oscillations. In the seizure-free DEPDC5 carrier, mean ERSP and ITC map sections highlight a distinct spectral power increase within 35 to 50Hz, and a greater phase coherence increase within 30 to 60Hz, with maximum ITC values around 40Hz gamma band (Figure 7B). Like the seizure-free carrier, the mean ITC map highlights a significant increase phase-coherence, with maximum ITC values around 40Hz gamma

band, in the epileptic patient (Figure 7A). However, entrainment responses to the chirp sound across trials caused no remarkable increase in gamma spectral power in the epileptic patient (as suggested by the absence of this characteristic diagonal shape).

In the case of NPRL3 mutation, EEG responses to the chirp sound appear quite similar to that described in DEPDC5 mutation. The stimulus onset caused a significant increase in theta spectral power, with maximum ERSP values (≥ 3 dB) over the parietal region in the unaffected carrier (Figure 8A) and over the frontal region in the epileptic patient (Figure 8B). Theta phase-coherence was equally subject to a maximum increase ($ITC \geq 0.25$) in both epileptic and unaffected NPRL3 carrier (Figure 8A, 8B), over the frontal and parietal regions.

As in DEPDC5 individuals, figure 9 shows that entrainment responses to chirp sound are pertaining to the gamma frequency band. Particularly, mean ITC maps show distinct chirp-modulated phase coherence increase within 30 to 100Hz. In the frontal and parietal regions, both NPRL3 epileptic patient and unaffected display aberrant gamma phase coherence, as depicted by the characteristics diagonal shape, with maximum ITC (≥ 0.25) values reached between 35 to 45 Hz.

Interestingly, we observed in both mutations that entrainment responses to the chirp sound across trials are marked by a significant increase in theta spectral power ($ERSP \geq 3$) specific to the epileptic individual (Figure 7A) as compared to the unaffected carrier (Figure 9B)

Discussion

Genes coding for the mTORC1-regulating complex GATOR1 proteins are strongly associated with various phenotypes across the spectrum of inherited focal epilepsies, that may also involve malformations of cortical development [44]. While animal models and resected human brain tissue analyses provided evidence for the mediating role of mTORC1 hyperactivation in epileptogenesis, essentially following DEPDC5, but also NPRL2 and NPRL3 loss-of-function mutations [19,45,46]. The exact mechanisms by which this increased mTORC1 activity disrupts the balance between cortical excitation and inhibition remain to be established. In the present study, we aimed to assess whether mTORC1 hyperactivity following DEPDC5 and NPRL3 mutations involves changes in the GABAergic system, the primary inhibitory neurotransmitter of the central nervous system. We used a combination of non-invasive techniques to probe three distinct elements pertaining to GABAergic function.

First, we found that TMS measures of intracortical inhibition were not different in DEPDC5 and NPRL3 carriers, compared to healthy controls. Interpretation of unchanged GABAergic receptor-mediated cortical inhibition here should consider in insight from other TMS studies in neurogenetic conditions marked by refractory epilepsy. In that regard, these findings differ from what is observed in patients with Dravet syndrome [32] and fragile X syndrome (FXS) [37], two disorders associated with epilepsy, where reduced GABA-mediated inhibition was observed.

Overall, our data do not support the hypothesis of a mutation effect on GABA-mediated inhibition. Despite similarities in the clinical phenotypes, discrepancies between data relating to the GABAergic system in the fragile X syndrome and our results can be

explained by the different genetic mechanisms involved in the etiology of these syndromes. However, we must keep in mind that the small sample size remains the greatest limitation here and likely explains the lack of significant results.

To our knowledge, no other study has addressed the neurochemical effects of GATOR1 genes mutations in the development of epileptic phenotypes so far, in animal or in human. In the present study, ¹H-MRS revealed no significant group differences in GABA concentrations. To test whether the epileptic phenotypes were attributable to an excess of excitatory neurotransmitters, we similarly measured glutamate and glutamine concentrations. Here again, the absence of significant group difference suggests no effect of GATOR1 gene mutations on cortical and subcortical neurochemical balance. However, some limitations are to be considered with these results; first and foremost, the approach used here does not differentiate intracellular from extracellular GABA concentrations [47]. To continue, although most carriers were seizure-free, few of our participants were treated with combination of AEDs that are known to act on the GABAergic system, hence affecting cortical and subcortical GABA levels, directly or indirectly. A mutation effect on cortical and subcortical GABA concentrations might have been observed, had our study benefited from a larger sample. So far, MRS has not been extensively used to further assess neurochemical changes in focal, inherited epilepsies, and the scarce available data appear inconsistent in temporal lobe epilepsy and focal cortical dysplasia [48,49]. Although GATOR1 genes, particularly DEPDC5, have been associated to mesial and lateral temporal lobe epilepsy and more frequently to FCD-associated epilepsy, no information about the genetic profile of the TLE and FCD patients is provided in these studies. Their conclusions must therefore be considered with caution.

The sheer nature of epileptic seizures, which are characterized by a large-scale hypersynchronous activity of neuron populations [50], make the use of electroencephalography (EEG) particularly relevant in the study of focal epilepsies, such as mTOR-related epileptic syndromes. The auditory task used in this study meets the requirements for recording EEG oscillations that fall in the frequency range of theta and gamma rhythms. The 1 - 120 Hz- modulated Chirp sound elicits EEG responses generated in this same frequencies' interval, with no active participation required from the subjects. In the analysis, we used indices that simultaneously addressed the magnitude of and phase of the decomposed EEG spectrum. For each epoch, the event-related spectral perturbation (ERSP) measures the mean dynamic changes in frequencies' amplitude (in dB) over time, while the inter-trial coherence (ITC) reflects the consistency of the cerebral response across trials, showing the degree of frequencies' phase alignment in response to the stimulus [51,52].

Theta oscillations represent one of the most regular EEG activities that can be recorded, emerging both from cortical and subcortical regions. Due to the high density of its neural layers, the hippocampus is considered one of the main sources of EEG theta [53–56]. In the cases presented here we describe EEG theta features common to both mutations and specific to epileptic patients as compared to unaffected carriers. Although it is worth mentioning that amplitude generally increase as frequencies decrease, here, the presence of aberrant theta spectral power in both DEPDC5 and NPRL3 epileptic patients align with the growing body of research highlighting aberrant theta oscillations; in adults with genetic and neurological disorders [57] including FXS [43,58] and generalized epilepsy [59,60].

Considering the GATOR1 genes mutations effect on the mTOR signaling pathway, one can suspect the mTORC1 hyperactivation to impede the cognitive and memory functions that rely on theta: in the present case, the processing of auditory information. However, one must consider the potential effects of medications regarding these results. Indeed, neuropharmacological studies of AEDs have proved compounds such as carbamazepine to cause a power increase of low frequency oscillations, particularly theta oscillations, not only in healthy individuals but also in epileptic patients [61,62]. This may explain the significant increase in theta power induced by the stimulus onset, particularly in the NPRL3 patient presented here, treated with carbamazepine.

While pyramidal cells primarily contribute to the generation of hippocampal theta oscillations, it has also been observed that interneurons, particularly GABAergic interneurons, act as essential modulators of theta oscillations [63–65], regulating the firing tone of pyramidal cells and promoting local network synchronization [66–68], particularly during seizures [69]. It is now-established that GABAergic interneurons act as the main generators of high-frequency oscillations [70]. Particularly, the parvalbumin-expressing GABAergic interneurons, characterized as fast-spiking, are typically associated with cortical but also hippocampal gamma oscillations through which they rhythmically inhibit networks of pyramidal cells [33,71–73]. It is generally acknowledged that the coherence of such high-frequency oscillations supports a dynamic communication between neural ensembles across brain regions that is essential to cognitive functions [74–76]. Unsurprisingly, changes in gamma activity are observed in intractable epilepsy [77]. Recent work by Sato and colleagues focused on the spatiotemporal characteristics of gamma oscillations in FCD-related epilepsy. Analyzing intracranial EEG data, they highlighted

dynamic changes in GABAergic interneurons synchronization underlying epileptiform activity and seizure generation [78]. Contrasting individual data in each of the mutations, we observed that EEG gamma responses to the chirp sound are significantly more coherent in unaffected carriers compared to epileptic patients. In the case of DEPDC5 mutation, not only EEG gamma responses are more coherent, but they are also of greater amplitude in the unaffected carrier, suggesting a hyper-synchronization of the neural networks responsible for these oscillations, presumably due to faulty GABAergic interneurons activity. Yet, it is worth mentioning that in epileptic patients this effect may be attenuated by AEDs.

In each of the mutation, we also note that theta and gamma are aberrantly co-occurring in entrainment responses to the stimulus across trials, as evidenced by the significant increase in theta spectral power concomitant with maximum increases in gamma phase-locking. This is particularly remarkable in epileptic patients, compared to seizure-free carriers. Interestingly, recordings of single units and local field potentials in animals have shown a match between neocortical gamma power and hippocampal theta phase, suggesting the entrainment of neocortical neuron ensembles to high-frequency oscillations by low-frequency oscillations [79,80]. In fact, alterations in theta-gamma cross-frequency coupling are now considered a biomarker of neurologic conditions that share GABAergic dysfunction, especially Alzheimer's disease and epilepsy [81,82]. Notwithstanding the potential effect of AEDs on theta spectral power as previously mentioned, this observation raises questions regarding a potential effect of DEPDC5 and NPRL3 mutations on the coupling of theta and gamma activities leading to a failure in the functions they support [83,84]. With this in mind, and accounting for the nature and main features of mTORopathies, it can be hypothesized that although mutations in the GATOR1 genes do

not directly affect GABAergic functions at the synaptic level, they likely promote electrophysiological changes within neuron ensembles, including GABAergic circuits, through increased mTORC1 activity, resulting in cortical hyperexcitability driven by hippocampal-neocortical interactions [85].

Although, the mechanisms by which GATOR1 genes mutations create changes in human cortical excitability remain unclear, single-cases comparison here suggest that DEPDC5 and NPRL3 mutations effects on cortical excitability, may vary with phenotypic profile.

Conclusion

Alterations in GABAergic function are likely common driving mechanisms in generalized and focal epileptic syndromes. However, these changes may occur at different levels depending on the etiology of the disease. Consistent with previous work and current knowledge of focal epilepsy, TMS and MRS here revealed no changes in physiological and biochemical factors of GABAergic transmission in DEPDC5 and NPRL3-related epileptic mTORopathies. In contrast, aberrant EEG theta and gamma oscillations, in response to auditory stimulation, were remarkable in DEPDC5 and NPRL3 seizure-free carriers and patients. This finding may be relevant as an electrophysiological sign of cortical hyperexcitability involved in epileptogenesis through increased mTORC1 activation.

List of abbreviations

mTOR: mammalian/mechanistic target of rapamycin

GATOR1: GAP-activity-toward-RAGs complex 1

DEPDC5: DEP (Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin)-Domain Containing 5

NPRL3: Nitrogen Permease Regulator Like 3

SUDEP: sudden unexpected death in epilepsy

TMS: Transcranial Magnetic Stimulation

SCN1A: Sodium Channel voltage-gated type 1 alpha subunit

SICI: Short interval cortical inhibition

LICI: Long interval cortical inhibition

ICF: Intra cortical facilitation

SICF: Short interval cortical Facilitation

CSP: Cortical silent period

ASD: Autism spectrum disorder

FXS: Fragile X syndrome

NMDAr: N-methyl-D-aspartate receptors

¹H-MRS: Proton- Magnetic Resonance Spectroscopy

GABA: Gamma-aminobutyric acid

Glx: Glutamate + glutamine

NF1: Neurofibromatosis type 1

AEDs: Anti-epileptic drugs

FCD: Focal cortical dysplasia

TLE: Temporal lobe epilepsy

ERSP: Event-related spectral perturbation

ITC: Inter-trial coherence

References

1. Fishwick KJ, Li RA, Halley P, Deng P, Storey KG. Initiation of neuronal differentiation requires PI3-kinase/TOR signalling in the vertebrate neural tube. *Developmental Biology*. 2010 Feb;338(2):215–25.
2. Han J, Wang B, Xiao Z, Gao Y, Zhao Y, Zhang J, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the neuronal differentiation of neural progenitors induced by insulin. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2008 Sep;39(1):118–24.
3. Dai J, Bercury KK, Macklin WB. Interaction of mTOR and Erk1/2 signaling to regulate oligodendrocyte differentiation: Signaling Regulating Oligodendrocyte Differentiation. *Glia*. 2014 Dec;62(12):2096–109.
4. Wong ST, Athos J, Figueroa XA, Pineda VV, Schaefer ML, Chavkin CC, et al. Calcium-Stimulated Adenylyl Cyclase Activity Is Critical for Hippocampus-Dependent Long-Term Memory and Late Phase LTP. *Neuron*. 1999 Aug;23(4):787–98.
5. Parsons RG, Gafford GM, Helmstetter FJ. Translational Control via the Mammalian Target of Rapamycin Pathway Is Critical for the Formation and Stability of Long-Term Fear Memory in Amygdala Neurons. *Journal of Neuroscience*. 2006 Dec 13;26(50):12977–83.
6. Stoica L, Zhu PJ, Huang W, Zhou H, Kozma SC, Costa-Mattioli M. Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Mar 1;108(9):3791–6.
7. Gafford GM, Parsons RG, Helmstetter FJ. Memory accuracy predicts hippocampal mTOR pathway activation following retrieval of contextual fear memory: mTOR and Memory Accuracy. *Hippocampus*. 2013 Sep;23(9):842–7.

8. Jewell JL, Russell RC, Guan KL. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Mar;14(3):133–9.
9. Malagelada C, Ryu EJ, Biswas SC, Jackson-Lewis V, Greene LA. RTP801 Is Elevated in Parkinson Brain Substantia Nigral Neurons and Mediates Death in Cellular Models of Parkinson's Disease by a Mechanism Involving Mammalian Target of Rapamycin Inactivation. *Journal of Neuroscience.* 2006 Sep 27;26(39):9996–10005.
10. Swiech L, Perycz M, Malik A, Jaworski J. Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2008 Jan;1784(1):116–32.
11. Meng XF, Yu JT, Song JH, Chi S, Tan L. Role of the mTOR signaling pathway in epilepsy. *Journal of the Neurological Sciences.* 2013 Sep;332(1–2):4–15.
12. Bockaert J, Marin P. mTOR in Brain Physiology and Pathologies. *Physiological Reviews.* 2015 Oct;95(4):1157–87.
13. Baybis M, Yu J, Lee A, Golden JA, Weiner H, McKhann G, et al. mTOR cascade activation distinguishes tubers from focal cortical dysplasia. *Ann Neurol.* 2004 Oct;56(4):478–87.
14. Ljungberg MC, Bhattacharjee MB, Lu Y, Armstrong DL, Yoshor D, Swann JW, et al. Activation of mammalian target of rapamycin in cytomegalic neurons of human cortical dysplasia. *Ann Neurol.* 2006 Aug 15;60(4):420–9.
15. Lipton JO, Sahin M. The Neurology of mTOR. *Neuron.* 2014 Oct;84(2):275–91.
16. van Kranenburg M, Hoogeveen-Westerveld M, Nellist M. Preliminary Functional Assessment and Classification of *DEPDC5* Variants Associated with Focal Epilepsy. *Human Mutation.* 2015 Feb;36(2):200–9.
17. Møller RS, Weckhuysen S, Chipaux M, Marsan E, Taly V, Bebin EM, et al. Germline and somatic mutations in the *MTOR* gene in focal cortical dysplasia and epilepsy. *Neurol Genet.* 2016 Dec;2(6):e118.
18. Baldassari S, Picard F, Verbeek NE, van Kempen M, Brilstra EH, Lesca G, et al. The landscape of epilepsy-related GATOR1 variants. *Genet Med.* 2019 Feb;21(2):398–408.
19. Iffland PH, Baybis M, Barnes AE, Leventer RJ, Lockhart PJ, Crino PB. *DEPDC5* and *NPRL3* modulate cell size, filopodial outgrowth, and localization of mTOR in neural progenitor cells and neurons. *Neurobiology of Disease.* 2018 Jun;114:184–93.
20. Ishida S, Picard F, Rudolf G, Noé E, Achaz G, Thomas P, et al. Mutations of *DEPDC5* cause autosomal dominant focal epilepsies. *Nat Genet.* 2013 May;45(5):552–5.

21. Marsan E, Ishida S, Schramm A, Weckhuysen S, Muraca G, Lecas S, et al. *Depdc5* knockout rat: A novel model of mTORopathy. *Neurobiology of Disease*. 2016 May;89:180–9.
22. Dawson RE, Nieto Guil AF, Robertson LJ, Piltz SG, Hughes JN, Thomas PQ. Functional screening of GATOR1 complex variants reveals a role for mTORC1 deregulation in FCD and focal epilepsy. *Neurobiology of Disease*. 2020 Feb;134:104640.
23. Baulac S, Ishida S, Marsan E, Miquel C, Biraben A, Nguyen DK, et al. Familial focal epilepsy with focal cortical dysplasia due to *DEPDC 5* mutations: FCD and *DEPDC5* Mutations. *Ann Neurol*. 2015 Apr;77(4):675–83.
24. Hu S, Knowlton RC, Watson BO, Glanowska KM, Murphy GG, Parent JM, et al. Somatic *Depdc5* deletion recapitulates electroclinical features of human focal cortical dysplasia type IIA: Somatic *Depdc5* deletion. *Ann Neurol*. 2018 Jul;84(1):140–6.
25. Ribierre T, Deleuze C, Bacq A, Baldassari S, Marsan E, Chipaux M, et al. Second-hit mosaic mutation in mTORC1 repressor *DEPDC5* causes focal cortical dysplasia-associated epilepsy. *Journal of Clinical Investigation*. 2018 Jun 1;128(6):2452–8.
26. Ishida S, Zhao D, Sawada Y, Hiraoka Y, Mashimo T, Tanaka K. Dorsal telencephalon-specific *Nprl2* - and *Nprl3* -knockout mice: novel mouse models for GATORopathy. *Human Molecular Genetics*. 2021 Nov 20;ddab337.
27. De Fusco A, Cerullo MS, Marte A, Michetti C, Romei A, Castroflorio E, et al. Acute knockdown of *Depdc5* leads to synaptic defects in mTOR-related epileptogenesis. *Neurobiology of Disease*. 2020 Jun;139:104822.
28. Swaminathan A, Hassan-Abdi R, Renault S, Siekierska A, Riché R, Liao M, et al. Non-canonical mTOR-Independent Role of *DEPDC5* in Regulating GABAergic Network Development. *Current Biology*. 2018 Jun;28(12):1924-1937.e5.
29. Briggs SW, Galanopoulou AS. Altered GABA Signaling in Early Life Epilepsies. *Neural Plasticity*. 2011;2011:1–16.
30. Kang JQ. Defects at the crossroads of GABAergic signaling in generalized genetic epilepsies. *Epilepsy Research*. 2017 Nov;137:9–18.
31. Ruffolo G, Cifelli P, Roseti C, Thom M, van Vliet EA, Limatola C, et al. A novel GABAergic dysfunction in human Dravet syndrome. *Epilepsia*. 2018 Nov;59(11):2106–17.
32. Stern WM, Sander JW, Rothwell JC, Sisodiya SM. Impaired intracortical inhibition demonstrated in vivo in people with Dravet syndrome. *Neurology*. 2017 Apr 25;88(17):1659–65.

33. Cardin JA, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, et al. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*. 2009 Jun;459(7247):663–7.
34. Sanchez-Carpintero R, Urrestarazu E, Cieza S, Alegre M, Artieda J, Crespo-Eguilaz N, et al. Abnormal brain gamma oscillations in response to auditory stimulation in Dravet syndrome. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2020 Jan;24:134–41.
35. Violante IR, Patricio M, Bernardino I, Rebola J, Abrunhosa AJ, Ferreira N, et al. GABA deficiency in NF1: A multimodal [¹¹C]-flumazenil and spectroscopy study. *Neurology*. 2016 Aug 30;87(9):897–904.
36. Lefaucheur JP, André-Obadia N, Poulet E, Devanne H, Haffen E, Londero A, et al. Recommandations françaises sur l'utilisation de la stimulation magnétique transcrânienne répétitive (rTMS) : règles de sécurité et indications thérapeutiques. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology*. 2011 Dec;41(5–6):221–95.
37. Morin-Parent F, Champigny C, Lacroix A, Corbin F, Lepage JF. Hyperexcitability and impaired intracortical inhibition in patients with fragile-X syndrome. *Transl Psychiatry*. 2019 Dec;9(1):312.
38. Groppa S, Oliviero A, Eisen A, Quartarone A, Cohen LG, Mall V, et al. A practical guide to diagnostic transcranial magnetic stimulation: Report of an IFCN committee. *Clinical Neurophysiology*. 2012 May;123(5):858–82.
39. Chang WH, Fried PJ, Saxena S, Jannati A, Gomes-Osman J, Kim YH, et al. Optimal number of pulses as outcome measures of neuronavigated transcranial magnetic stimulation. *Clinical Neurophysiology*. 2016 Aug;127(8):2892–7.
40. Mescher M, Merkle H, Kirsch J, Garwood M, Gruetter R. Simultaneous in vivo spectral editing and water suppression. *NMR Biomed*. 1998 Oct;11(6):266–72.
41. Harris AD, Puts NAJ, Edden RAE. Tissue correction for GABA-edited MRS: Considerations of voxel composition, tissue segmentation, and tissue relaxations: Tissue Correction for GABA-Edited MRS. *J Magn Reson Imaging*. 2015 Nov;42(5):1431–40.
42. Ethridge LE, White SP, Mosconi MW, Wang J, Pedapati EV, Erickson CA, et al. Neural synchronization deficits linked to cortical hyper-excitability and auditory hypersensitivity in fragile X syndrome. *Molecular Autism*. 2017 Dec;8(1):22.
43. Ethridge LE, De Stefano LA, Schmitt LM, Woodruff NE, Brown KL, Tran M, et al. Auditory EEG Biomarkers in Fragile X Syndrome: Clinical Relevance. *Front Integr Neurosci*. 2019 Oct 9;13:60.
44. Moloney PB, Cavalleri GL, Delanty N. Epilepsy in the mTORopathies: opportunities for precision medicine. *Brain Communications*. 2021 Oct 1;3(4):fcab222.

45. Hughes J, Dawson R, Tea M, McAninch D, Piltz S, Jackson D, et al. Knockout of the epilepsy gene *Depdc5* in mice causes severe embryonic dysmorphology with hyperactivity of mTORC1 signalling. *Sci Rep*. 2017 Dec;7(1):12618.
46. Iffland PH, Carson V, Bordey A, Crino PB. GATORopathies: The role of amino acid regulatory gene mutations in epilepsy and cortical malformations. *Epilepsia*. 2019 Nov;60(11):2163–73.
47. Levy LM, Degnan AJ. GABA-Based Evaluation of Neurologic Conditions: MR Spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2013 Feb;34(2):259–65.
48. He C, Liu P, Wu Y, Chen H, Song Y, Yin J. Gamma-aminobutyric acid (GABA) changes in the hippocampus and anterior cingulate cortex in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior*. 2021 Feb;115:107683.
49. Gong T, Liu Y, Chen Y, Lin L, Lin Y, Wang G. Focal cortical dysplasia in epilepsy is associated with GABA increase. *NeuroImage: Clinical*. 2021;31:102763.
50. Truccolo W, Ahmed OJ, Harrison MT, Eskandar EN, Cosgrove GR, Madsen JR, et al. Neuronal Ensemble Synchrony during Human Focal Seizures. *Journal of Neuroscience*. 2014 Jul 23;34(30):9927–44.
51. Makeig S, Debener S, Onton J, Delorme A. Mining event-related brain dynamics. *Trends in Cognitive Sciences*. 2004 May;8(5):204–10.
52. Bishop DVM, Anderson M, Reid C, Fox AM. Auditory Development between 7 and 11 Years: An Event-Related Potential (ERP) Study. Koenig T, editor. *PLoS ONE*. 2011 May 9;6(5):e18993.
53. Konopacki J, Bland BH, Bruce MacIver M, Roth SH. Cholinergic theta rhythm in transected hippocampal slices: independent CA1 and dentate generators. *Brain Research*. 1987 Dec;436(2):217–22.
54. Alonso A, García-Austt E. Neuronal sources of theta rhythm in the entorhinal cortex of the rat: I. Laminar distribution of theta field potentials. *Exp Brain Res*. 1987 Aug;67(3):493–501.
55. Cantero JL, Atienza M, Stickgold R, Kahana MJ, Madsen JR, Kocsis B. Sleep-Dependent θ Oscillations in the Human Hippocampus and Neocortex. *J Neurosci*. 2003 Nov 26;23(34):10897–903.
56. Nuñez A, Buño W. The Theta Rhythm of the Hippocampus: From Neuronal and Circuit Mechanisms to Behavior. *Front Cell Neurosci*. 2021 Mar 4;15:649262.
57. Klimesch W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Research Reviews*. 1999 Apr;29(2–3):169–95.

58. Pedapati EV, Schmitt LM, Ethridge LE, Liu R, Smith E, Sweeney JA, et al. Neocortical Localization and Thalamocortical Modulation of Neuronal Hyperexcitability in Fragile X Syndrome [Internet]. *Neurology*; 2021 May [cited 2022 Apr 6]. Available from: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.05.12.21256925>
59. Clemens B, Szigeti G, Barta Z. EEG frequency profiles of idiopathic generalised epilepsy syndromes. *Epilepsy Research*. 2000 Dec;42(2–3):105–15.
60. Clemens B. Pathological theta oscillations in idiopathic generalised epilepsy. *Clinical Neurophysiology*. 2004 Jun;115(6):1436–41.
61. Wu X, Xiao CH. Quantitative Pharmacology-EEG of Carbamazepine in Volunteers and Epileptics. *Clinical Electroencephalography*. 1996 Jan;27(1):40–5.
62. Höller Y, Helmstaedter C, Lehnertz K. Quantitative Pharmacology-Electroencephalography in Antiepileptic Drug Research. *CNS Drugs*. 2018 Sep;32(9):839–48.
63. Csicsvari J, Hirase H, Czurkó A, Mamiya A, Buzsáki G. Oscillatory Coupling of Hippocampal Pyramidal Cells and Interneurons in the Behaving Rat. *J Neurosci*. 1999 Jan 1;19(1):274–87.
64. Amilhon B, Huh CYL, Manseau F, Ducharme G, Nichol H, Adamantidis A, et al. Parvalbumin Interneurons of Hippocampus Tune Population Activity at Theta Frequency. *Neuron*. 2015 Jun;86(5):1277–89.
65. Sun MK, Zhao WQ, Nelson TJ, Alkon DL. Theta Rhythm of Hippocampal CA1 Neuron Activity: Gating by GABAergic Synaptic Depolarization. *Journal of Neurophysiology*. 2001 Jan 1;85(1):269–79.
66. Buzsáki G, Lai-Wo S. L, Vanderwolf CH. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Research Reviews*. 1983 Oct;6(2):139–71.
67. Buzsáki G. Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron*. 2002 Jan;33(3):325–40.
68. Chamberland S, Topolnik L. Inhibitory control of hippocampal inhibitory neurons. *Front Neurosci* [Internet]. 2012 [cited 2022 Apr 13];6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2012.00165/abstract>
69. Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*. 1995 Nov;378(6552):75–8.
70. Buzsáki G, Wang XJ. Mechanisms of Gamma Oscillations. *Annu Rev Neurosci*. 2012 Jul 21;35(1):203–25.

71. Penttonen M, Kamondi A, Acsády L, Buzsáki G. Gamma frequency oscillation in the hippocampus of the rat: intracellular analysis *in vivo*. *European Journal of Neuroscience*. 1998 Feb;10(2):718–28.
72. Bartos M, Vida I, Jonas P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Jan;8(1):45–56.
73. Antonoudiou P, Tan YL, Kontou G, Upton AL, Mann EO. Parvalbumin and Somatostatin Interneurons Contribute to the Generation of Hippocampal Gamma Oscillations. *J Neurosci*. 2020 Sep 30;40(40):7668–87.
74. Fries P. A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends in Cognitive Sciences*. 2005 Oct;9(10):474–80.
75. Fries P. Rhythms for Cognition: Communication through Coherence. *Neuron*. 2015 Oct;88(1):220–35.
76. Buzsáki G, Schomburg EW. What does gamma coherence tell us about inter-regional neural communication? *Nat Neurosci*. 2015 Apr;18(4):484–9.
77. Hughes JR. Gamma, fast, and ultrafast waves of the brain: Their relationships with epilepsy and behavior. *Epilepsy & Behavior*. 2008 Jul;13(1):25–31.
78. Sato Y, Wong SM, Iimura Y, Ochi A, Doesburg SM, Otsubo H. Spatiotemporal changes in regularity of gamma oscillations contribute to focal ictogenesis. *Sci Rep*. 2017 Dec;7(1):9362.
79. Sirota A, Montgomery S, Fujisawa S, Isomura Y, Zugaro M, Buzsáki G. Entrainment of Neocortical Neurons and Gamma Oscillations by the Hippocampal Theta Rhythm. *Neuron*. 2008 Nov;60(4):683–97.
80. Belluscio MA, Mizuseki K, Schmidt R, Kempter R, Buzsaki G. Cross-Frequency Phase-Phase Coupling between Theta and Gamma Oscillations in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 2012 Jan 11;32(2):423–35.
81. Kitchigina VF. Alterations of Coherent Theta and Gamma Network Oscillations as an Early Biomarker of Temporal Lobe Epilepsy and Alzheimer’s Disease. *Front Integr Neurosci*. 2018 Aug 27;12:36.
82. Liu X, Han F, Fu R, Wang Q, Luan G. Epileptogenic Zone Location of Temporal Lobe Epilepsy by Cross-Frequency Coupling Analysis. *Front Neurol*. 2021 Nov 16;12:764821.
83. Lynn PA, Sponheim SR. Disturbed theta and gamma coupling as a potential mechanism for visuospatial working memory dysfunction in people with schizophrenia. *Neuropsychiatr Electrophysiol*. 2016 Dec;2(1):7.

84. Jansen NA, Perez C, Schenke M, van Beurden AW, Dehghani A, Voskuyl RA, et al. Impaired θ - γ Coupling Indicates Inhibitory Dysfunction and Seizure Risk in a Dravet Syndrome Mouse Model. *J Neurosci*. 2021 Jan 20;41(3):524–37.
85. Buzsáki G. The Hippocampo-Neocortical Dialogue. *Cereb Cortex*. 1996;6(2):81–92.

Declarations

Acknowledgments

The authors thank all participants and their families, as well as the MRI technicians who assisted in data collection.

Authors' contributions

JFL acquired the funds, designed and supervised the research. CC and ER contacted and recruited the participants. MM acquired, processed, and analyzed the data. KA processed and analyzed the data. JFL and SL interpreted the data. MM, SC and JFL drafted the manuscript. The final manuscript was read and approved by all authors.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the local ethics committee (Comité d'Éthique de la Recherche du CIUSSS de l'Estrie – CHUS). Signed informed consent was obtained from all adult individual and from minors' legal representatives prior to participation.

Consent for publication

Signed informed consent was obtained from all adult participants and from minor participants' legal representatives.

Availability of data and materials

The datasets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by the Quebec Research Funds for Health (FRQS), Fondation des étoiles, and the Sherbrooke University Mother and Child research center.

Tables & Figures

Table 1. Characteristics of DEPDC5 and NPRL3 participants.

ID	Sexe	Age (years)	Medication (mg/day)
DEPDC5_01	F	33	ESL (400), CLB (10), LTG (150)
DEPDC5_02	F	48	None
DEPDC5_03	F	68	None
NPRL3_01	F	39	None
NPRL3_02	M	12	None
NPRL3_03	F	14	CBZ (400)
NPRL3_04	F	16	CBZ (1200); CLB (1)
NPRL3_05	F	36	None

CBZ = Carbamazepine; CLB = Clobazam; ESL = Eslicarbazepine acetate; LTG = Lamotrigine.

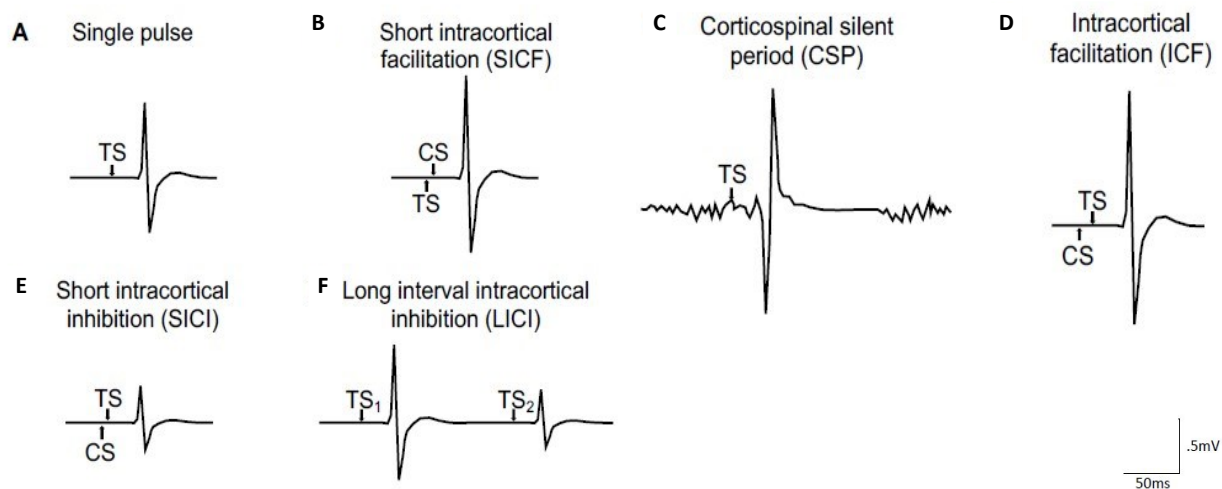


Figure 1. Standard plot of motor evoked potential as measured by electromyography for different transcranial magnetic stimulation protocols. CS = conditioned stimulus. TS = test stimulus.

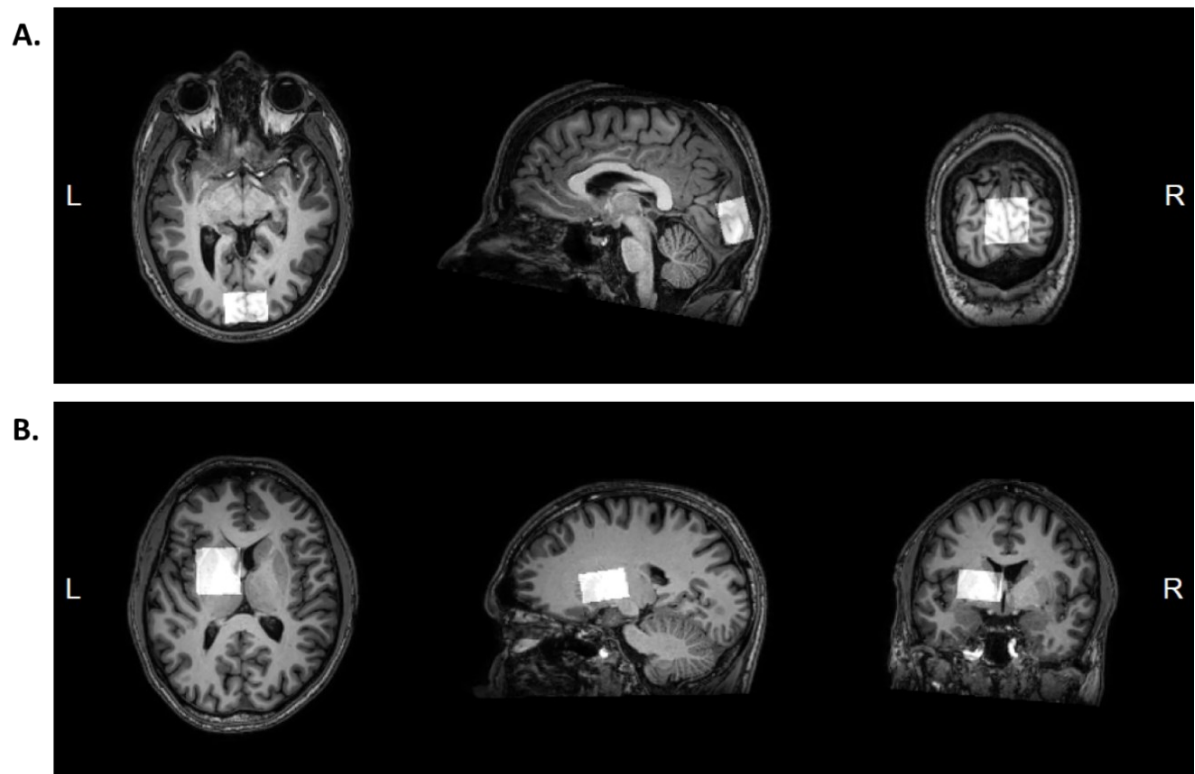


Figure 2. Anatomical landmarks for single voxel spectroscopy (T1-weighted images). (A) The first voxel was located bilaterally at the primary visual cortex. (B) The second voxel was located at the globus pallidus, in the left hemisphere.

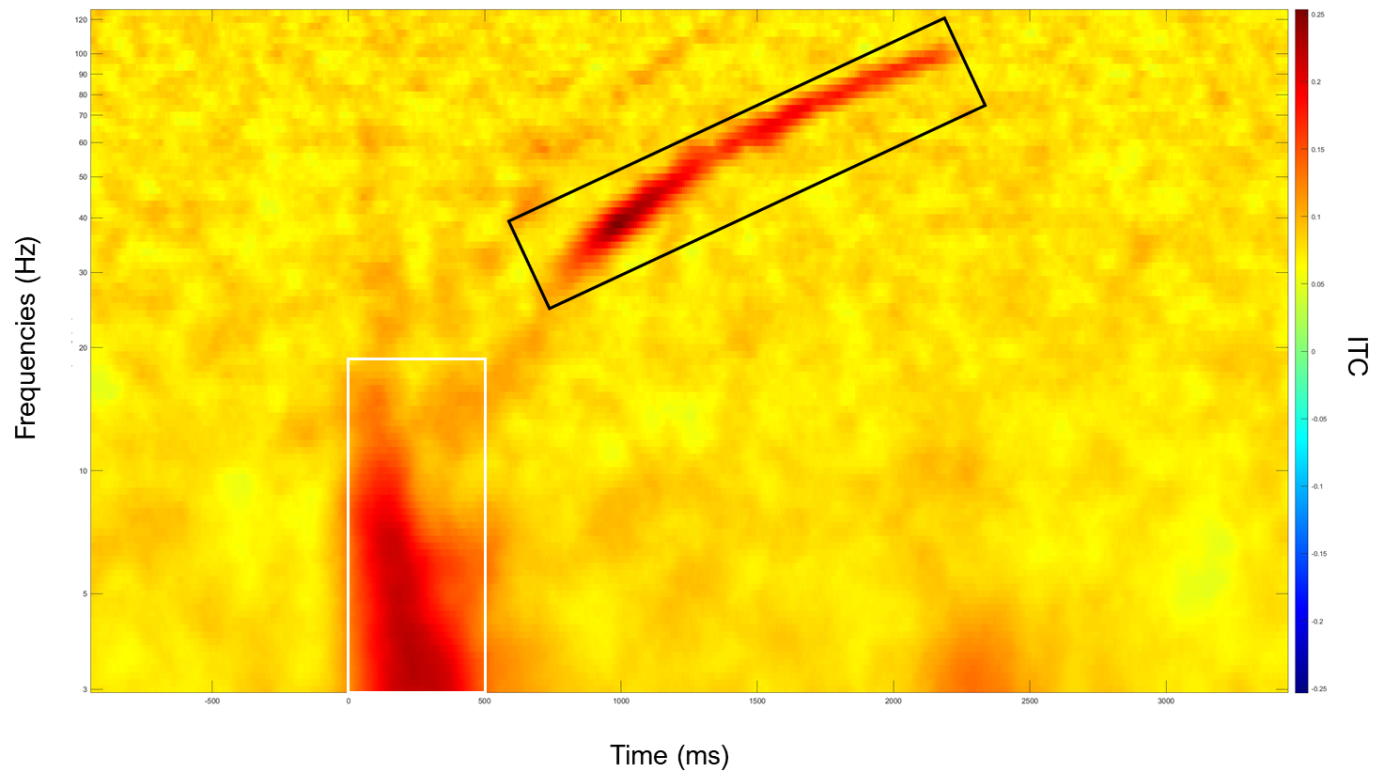


Figure 3. Chirp onset and entrainment responses mask regions. The present map represents the whole sample's mean inter-trial coherence of the chirp-evoked oscillatory response, with rectangles focusing on areas of maximum inter-trial coherence. The white rectangle shows the chirp onset response region (0 – 500ms), and the black rectangle shows the chirp entrainment response region (750 – 2500ms), within which time-frequency points with $ITC \geq 0.13$ were selected and masked.

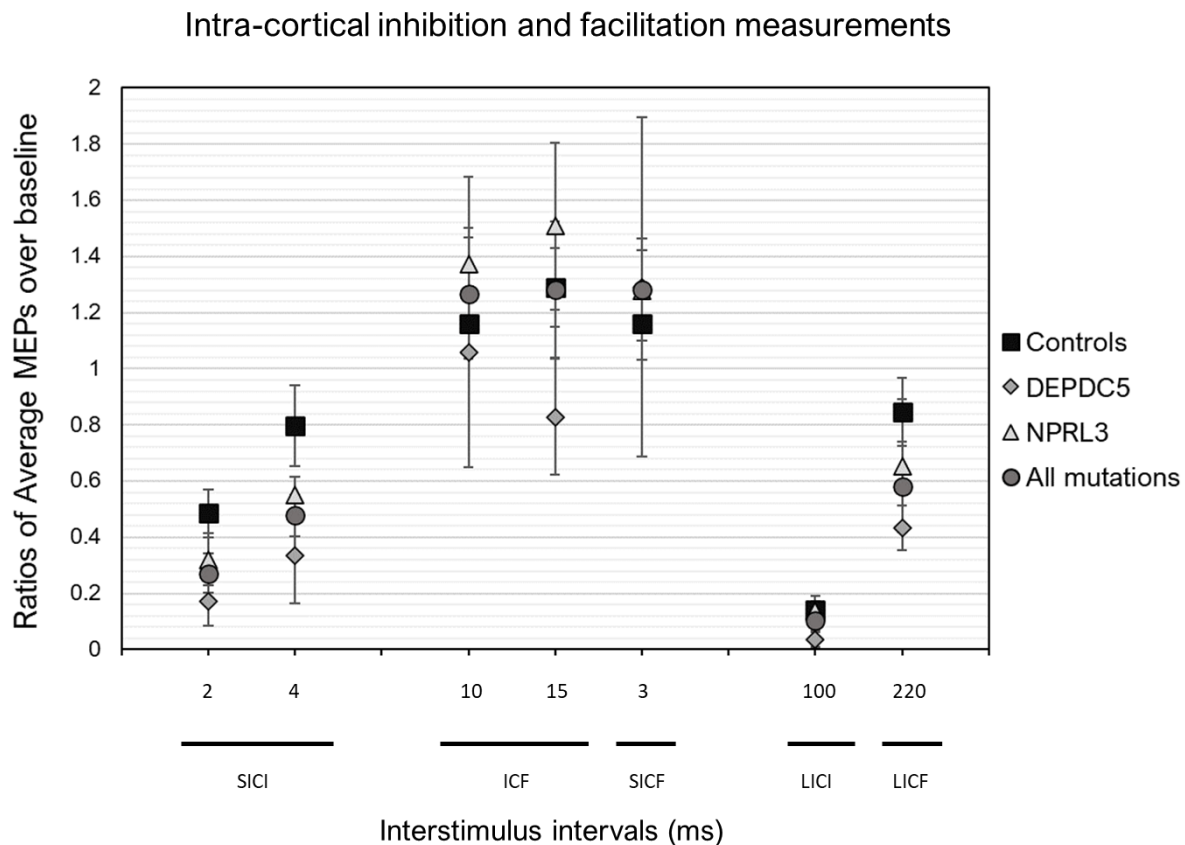


Figure 4. Quantification of intra-cortical inhibition and facilitation. Ratio values are indicated as mean \pm standard error. SICI = Short interval cortical inhibition. ICF = Intra-cortical facilitation. SICF = Short Interval Cortical Facilitation. LICI = Long Interval Cortical Inhibition. LICF = Long Interval Cortical Facilitation. MEP = Motor Evoked Potentials.

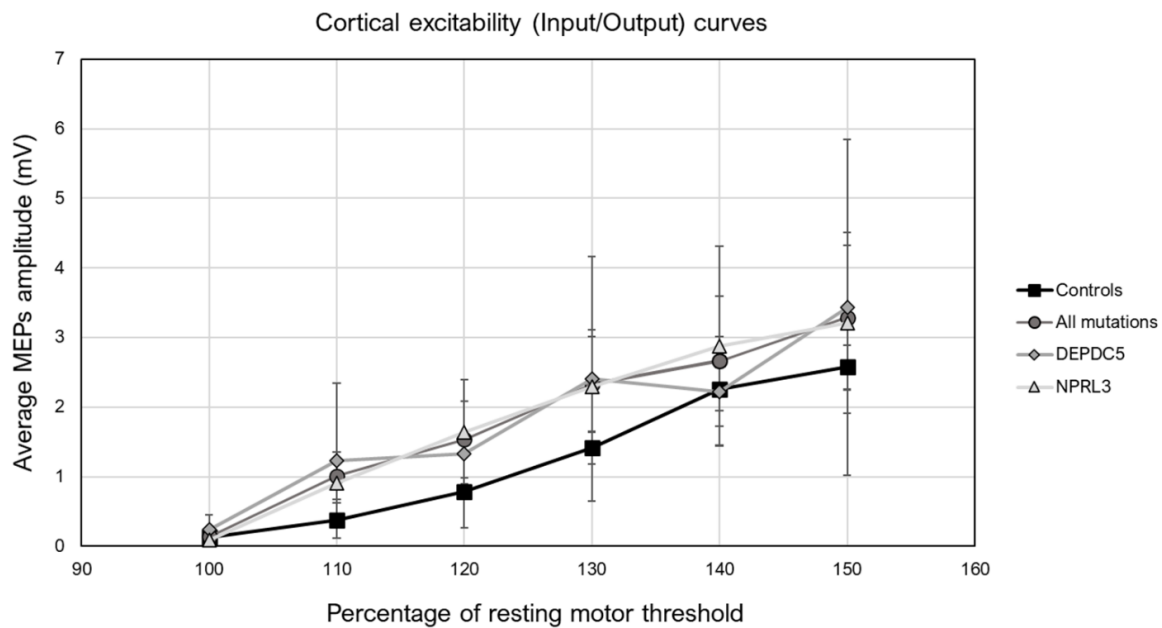


Figure 5. Curves of cortical excitability. For each percentage of resting motor threshold point, the average MEPs' amplitude is represented as mean \pm standard error.

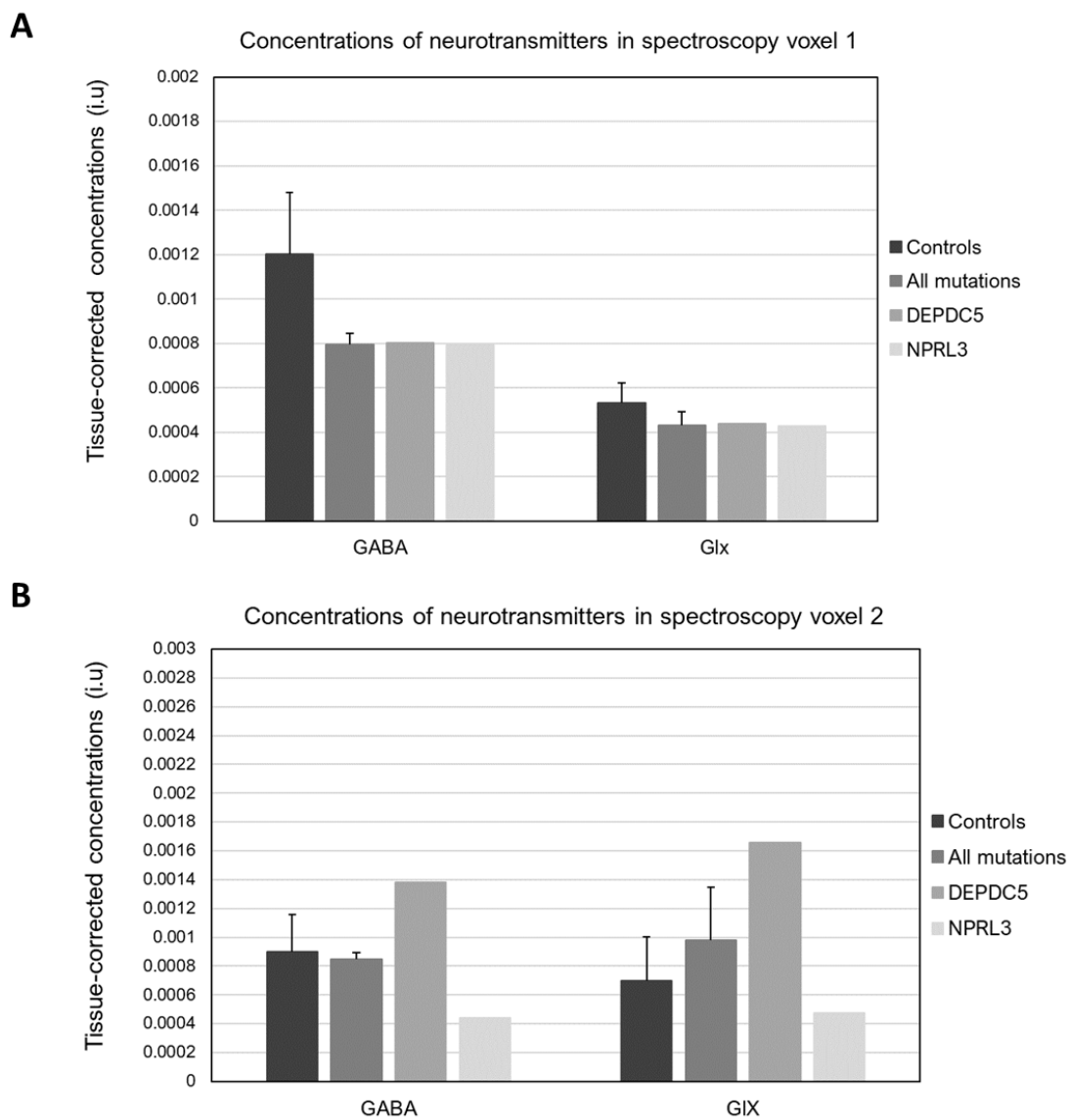


Figure 5. Neurotransmitters' concentrations. Concentrations in the primary visual cortex (A) and left globus pallidus (B). Concentrations are indicated as mean \pm standard error.

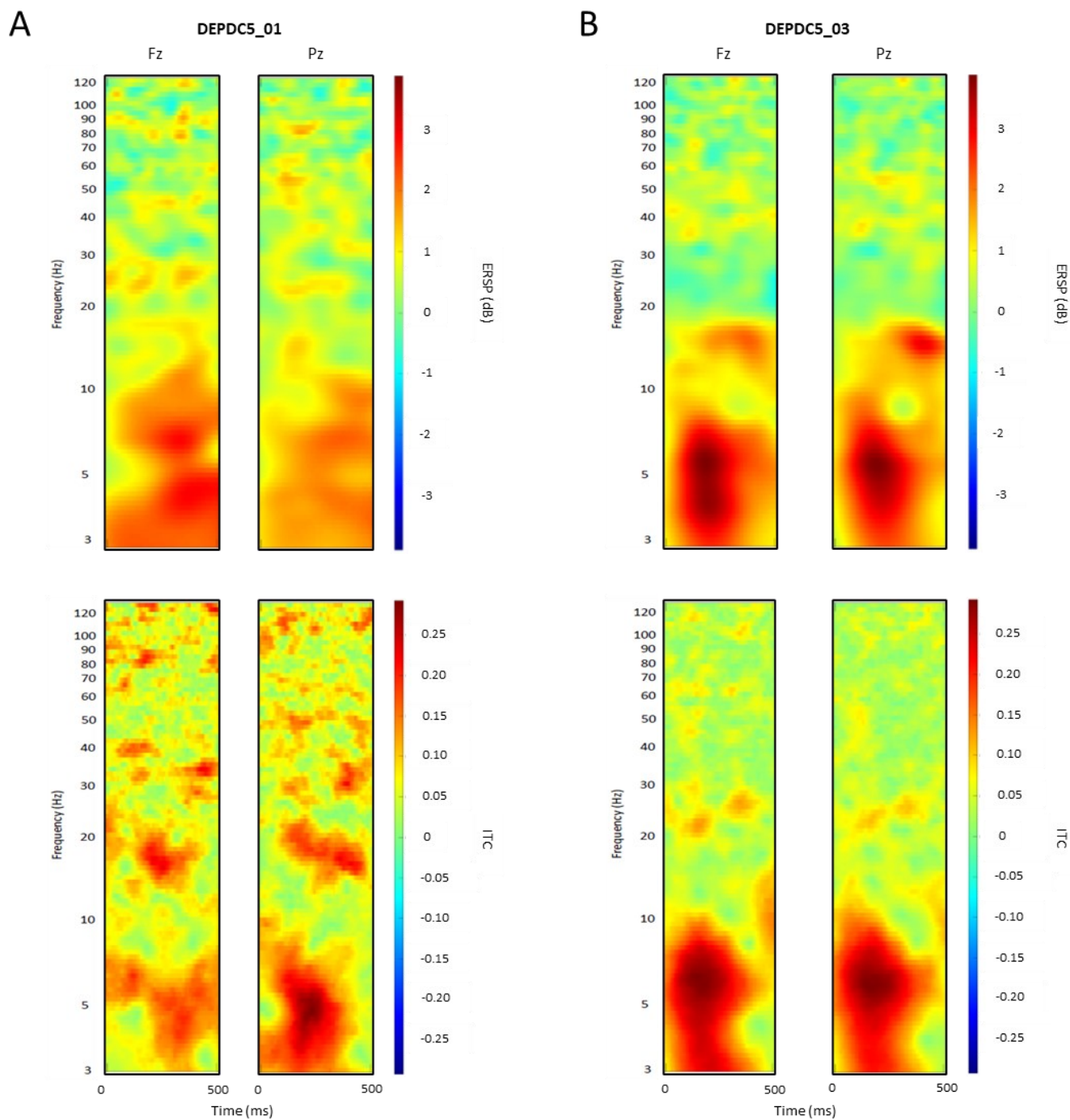
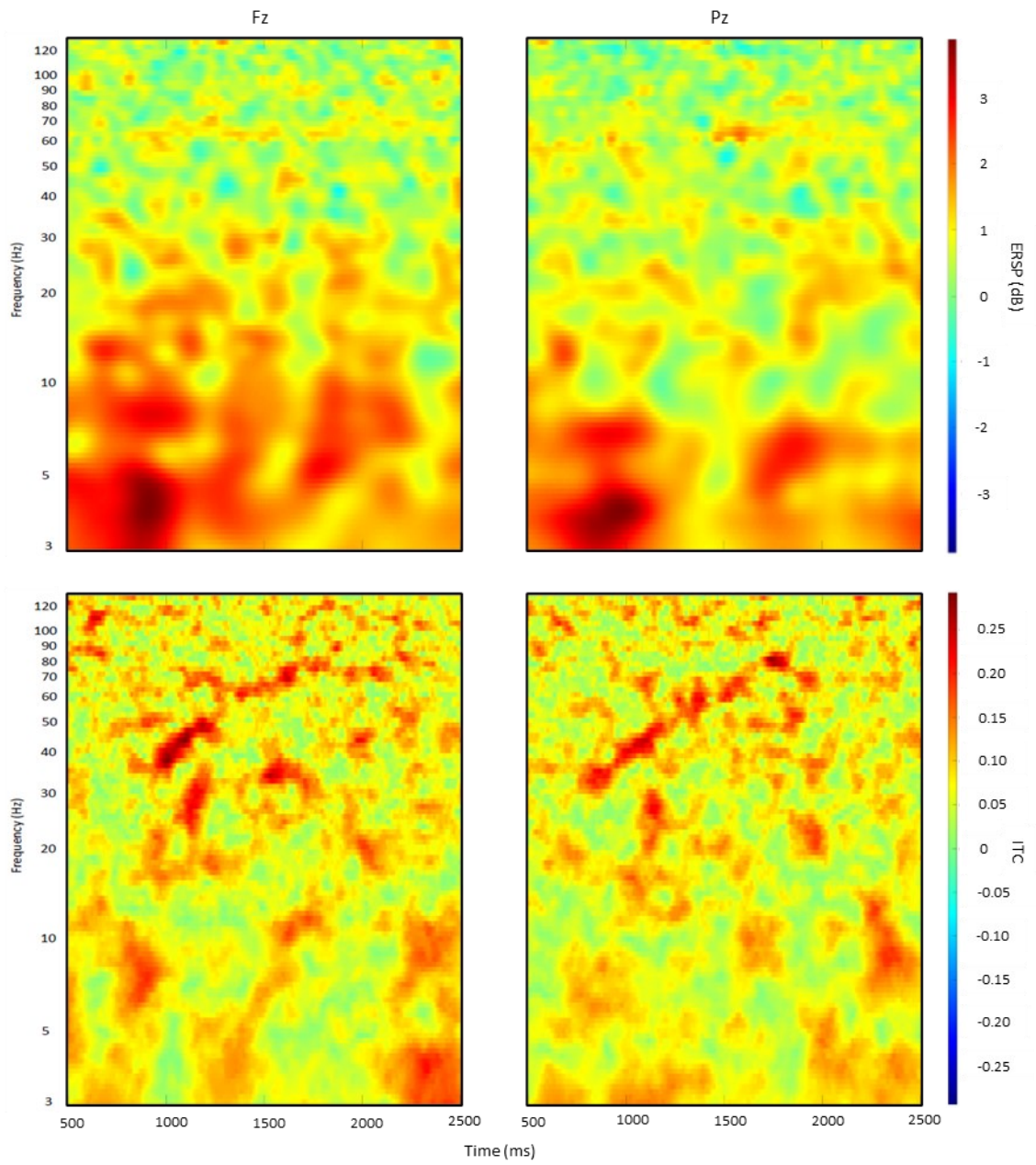


Figure 6. Oscillatory responses to chirp sound onset in DEPC5 epileptic patient vs. seizure-free carrier. Mean ERSP and ITC map sections show oscillatory responses to stimulus onset across trials in one epileptic patient (A) and one seizure-free carrier (B). Variations in frequencies' spectral power and phase coherence are indicated by the color bars.

A

DEPDC5_01



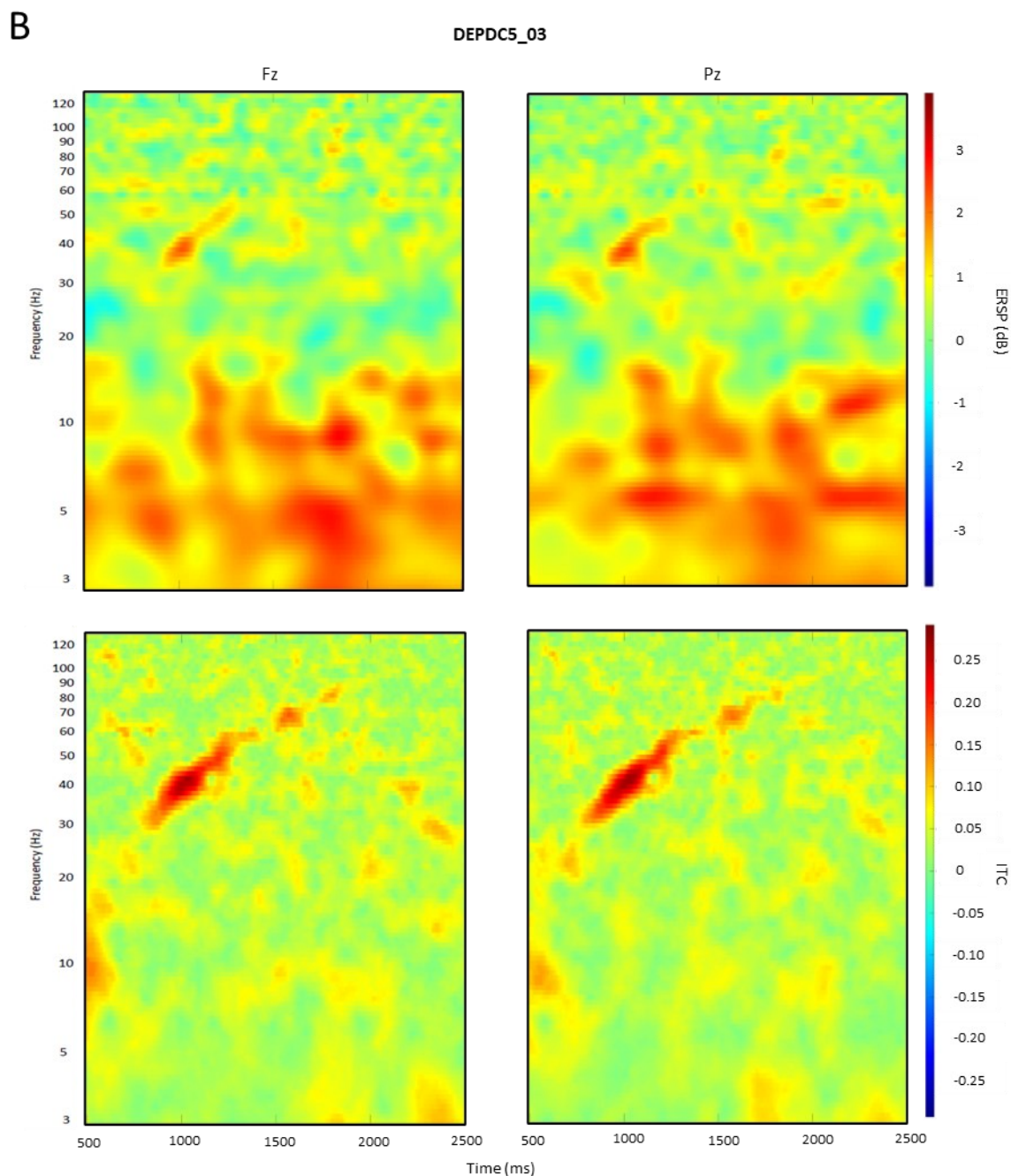


Figure 7. Oscillatory entrainment responses to chirp sound in DEPDC5 epileptic patient vs. seizure-free carrier. Mean ERSP and ITC map sections show entrainment responses to the stimulus across trials in one epileptic patient (A) and one seizure-free carrier (B). Variations in frequencies' spectral power and phase coherence are indicated by the color bars.

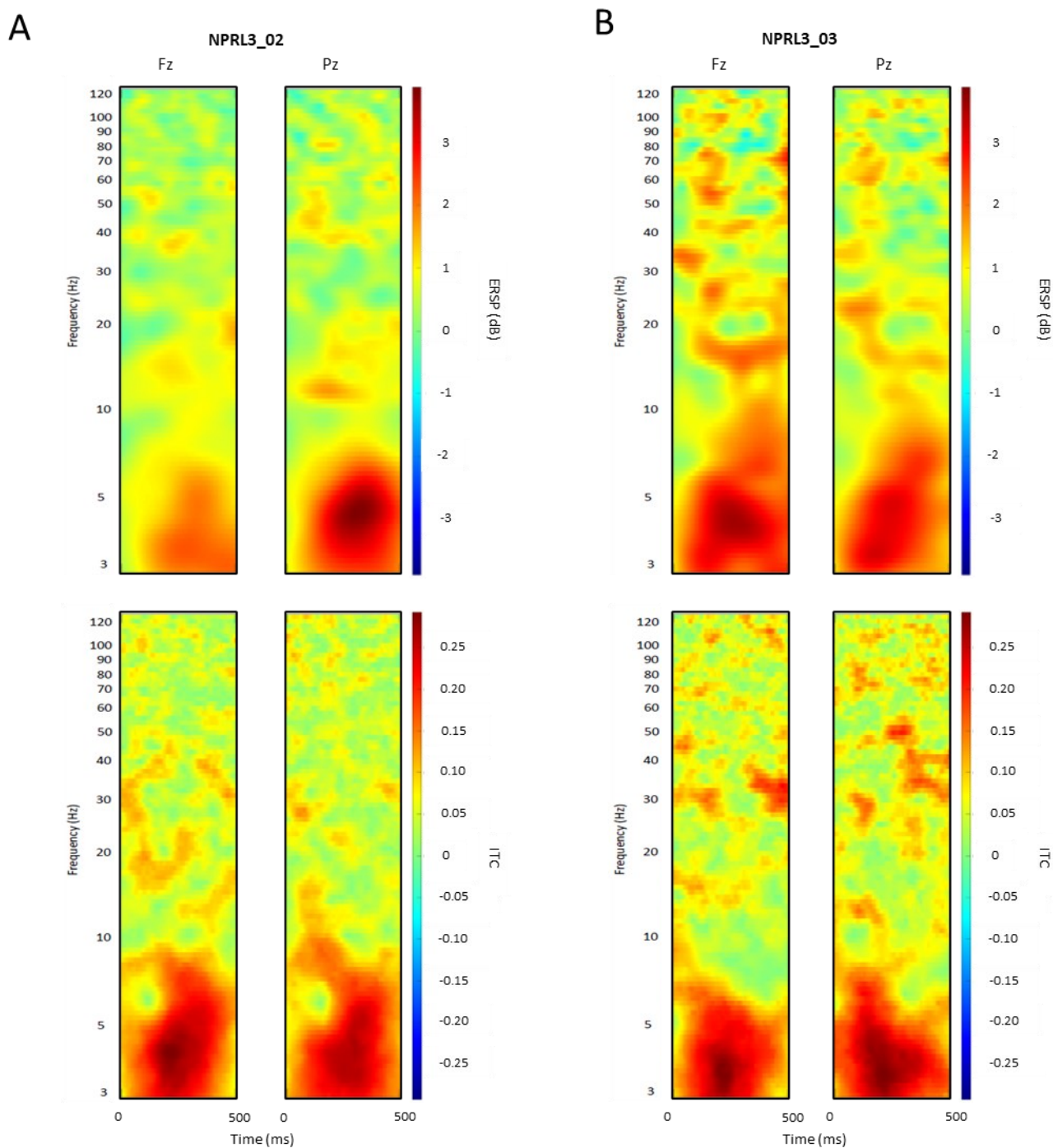
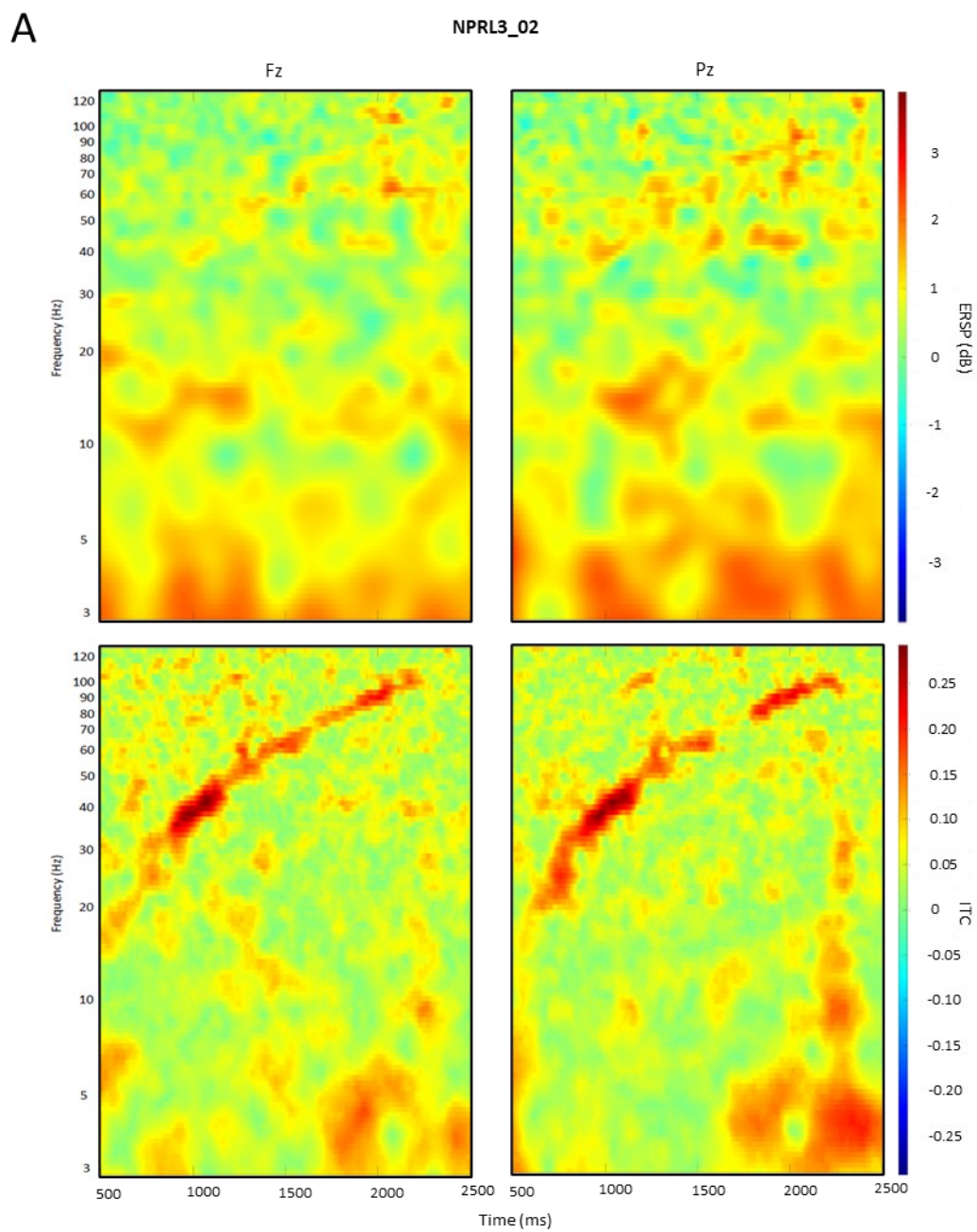


Figure 8. Oscillatory responses to chirp sound onset in NPRL3 epileptic patient vs. seizure-free carrier. Mean ERSP and ITC map sections show oscillatory responses to the stimulus onset across trials in one seizure-free carrier (A) and one epileptic patient (B) Variations in frequencies' spectral power and phase coherence are indicated by the color bars.



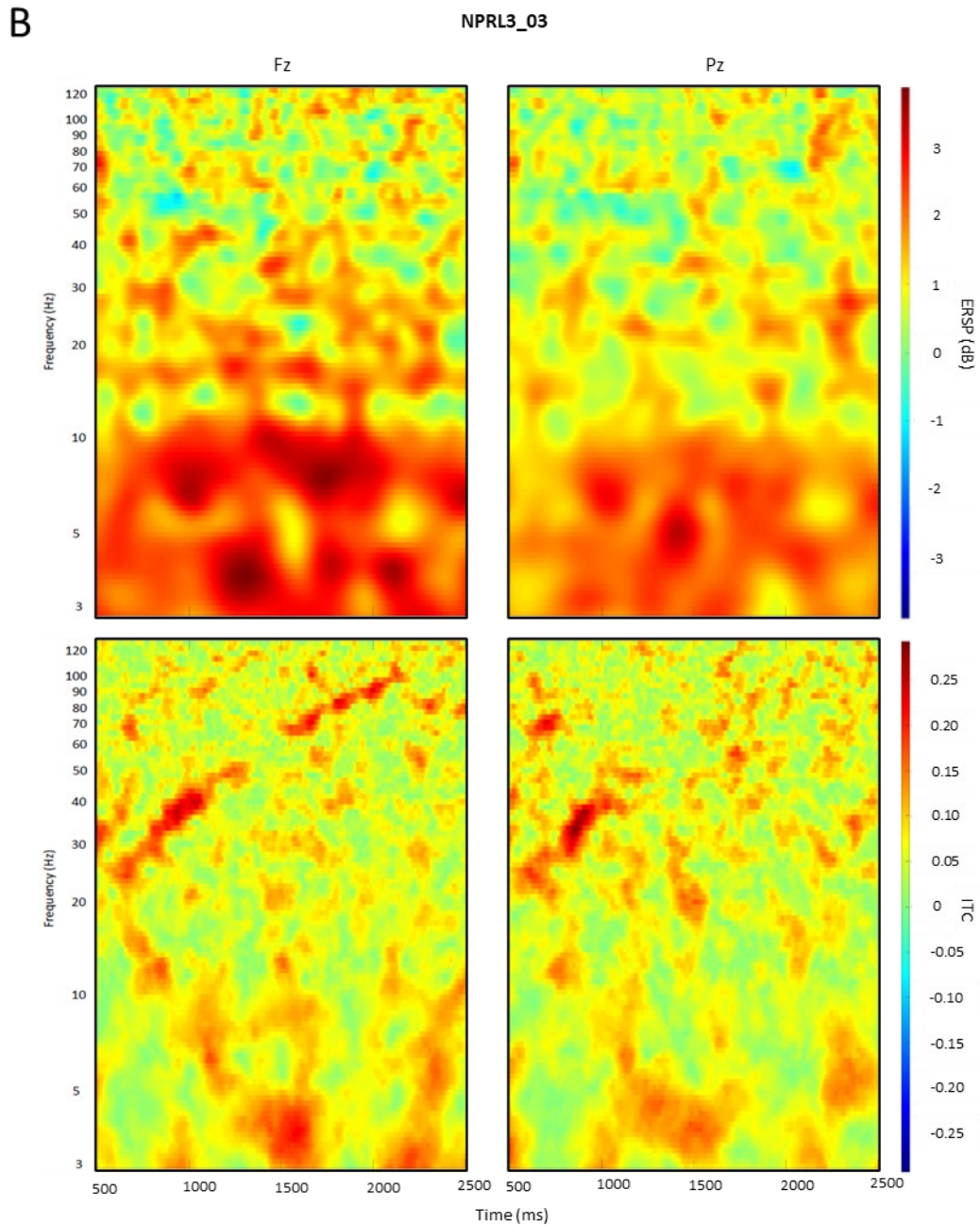


Figure 9. Oscillatory entrainment responses to chirp sound in DEPC5 epileptic patient vs. seizure-free carrier. Mean ERSP and ITC map sections show entrainment responses to the stimulus across trials in one seizure-free carrier (A) and one epileptic patient (B). Variations in frequencies' spectral power and phase coherence are indicated by the color bars.

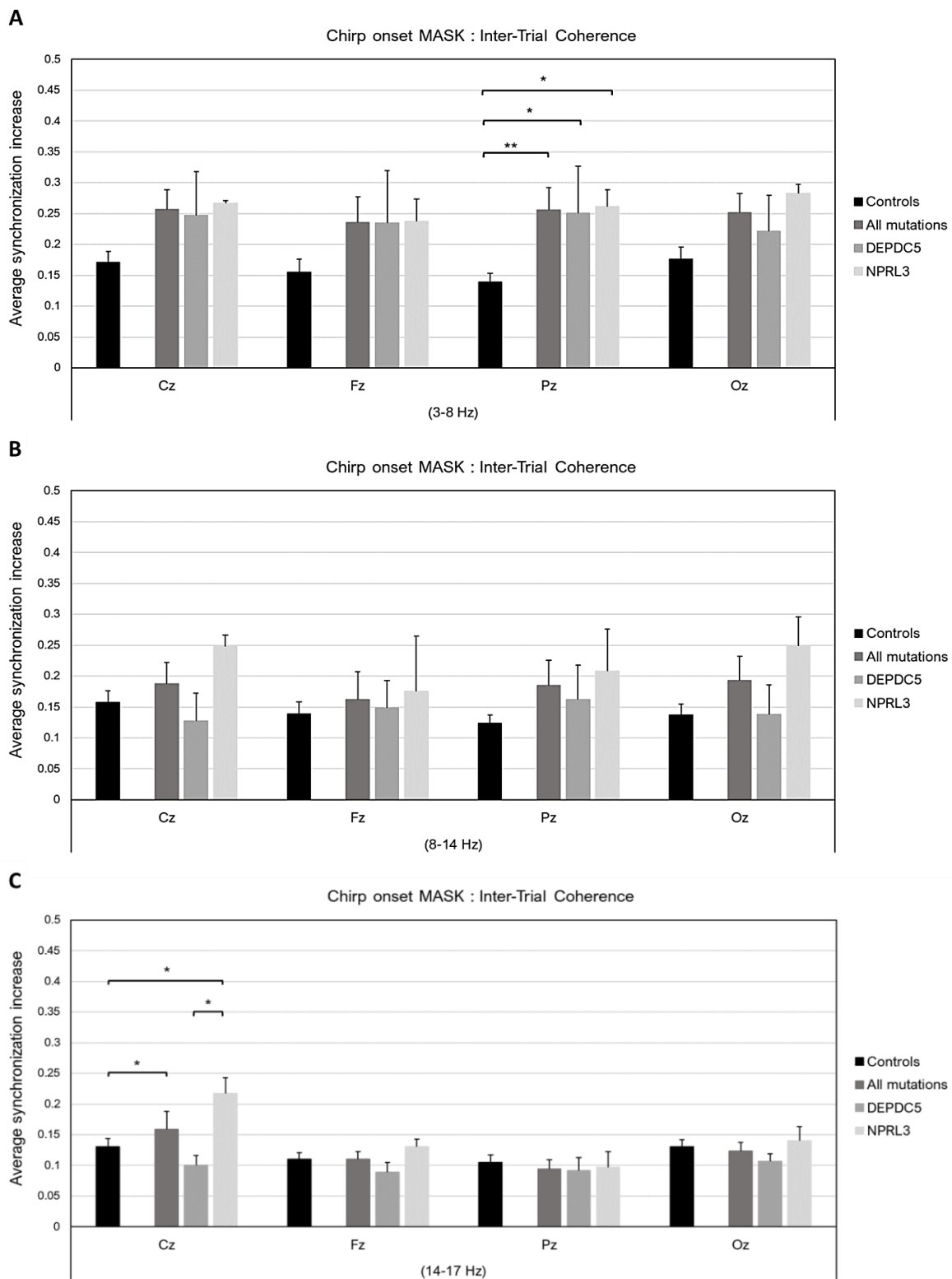


Figure 7. Group-average changes in frequencies' ITC during the Chirp onset. Average synchronization increases are indicated as mean \pm standard error.

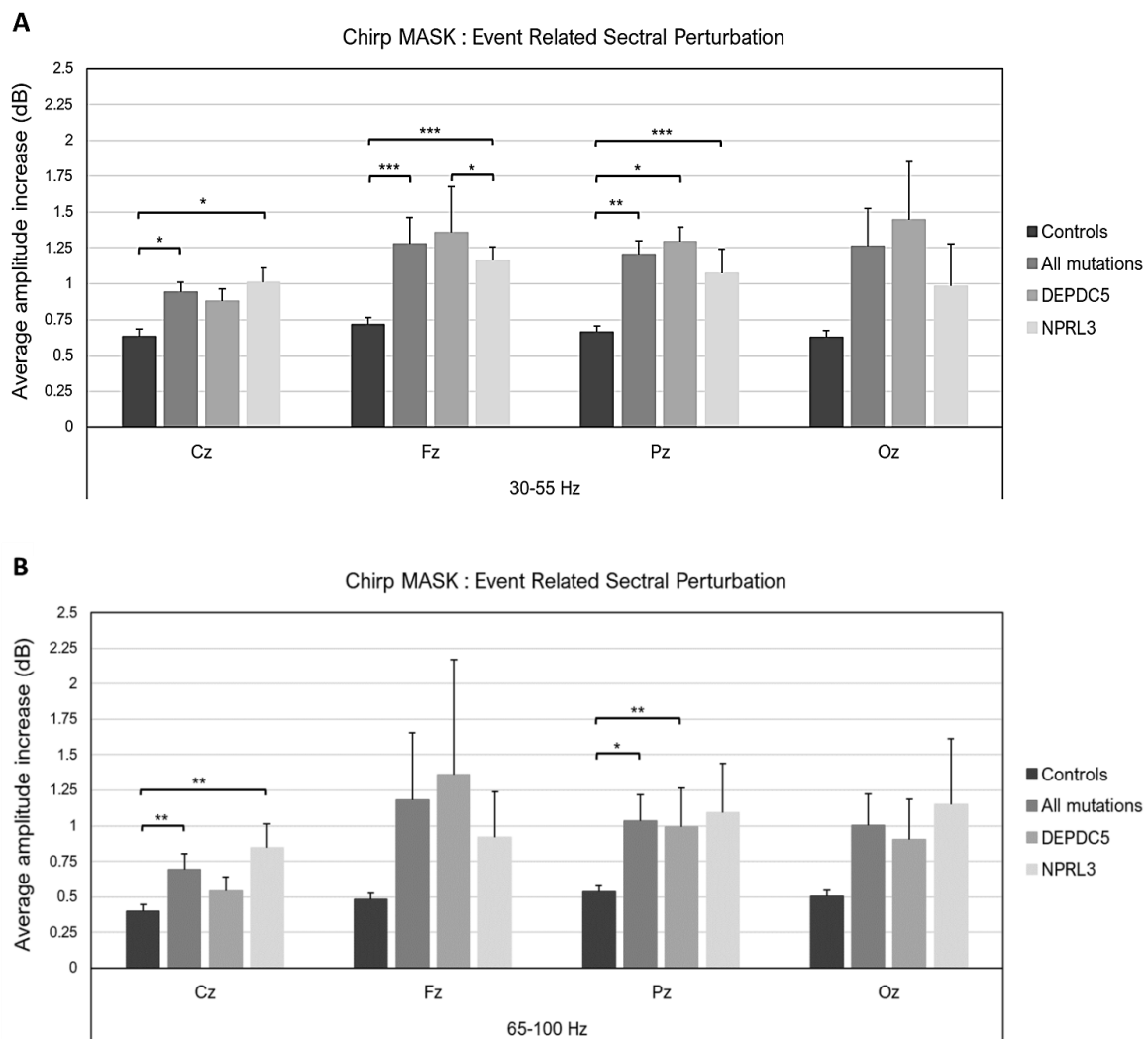
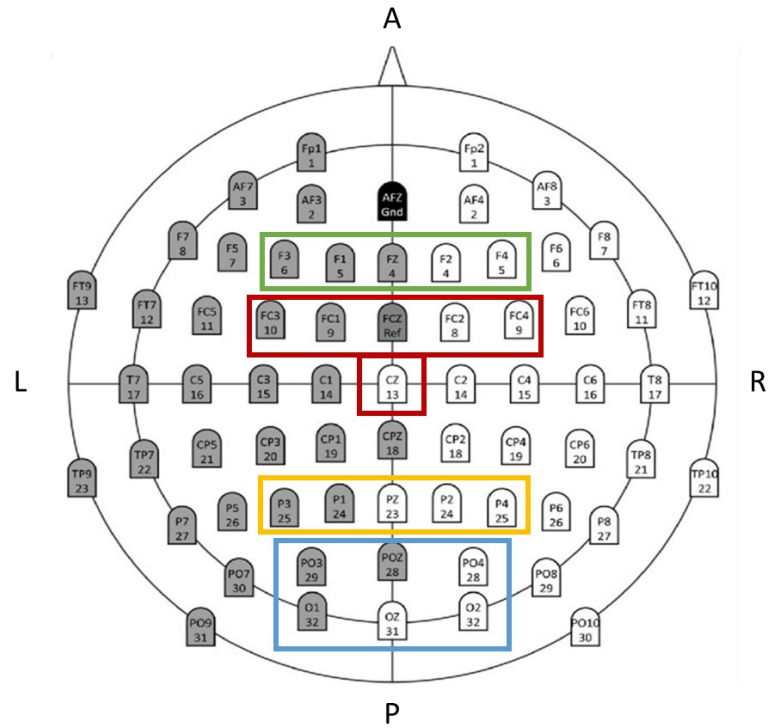


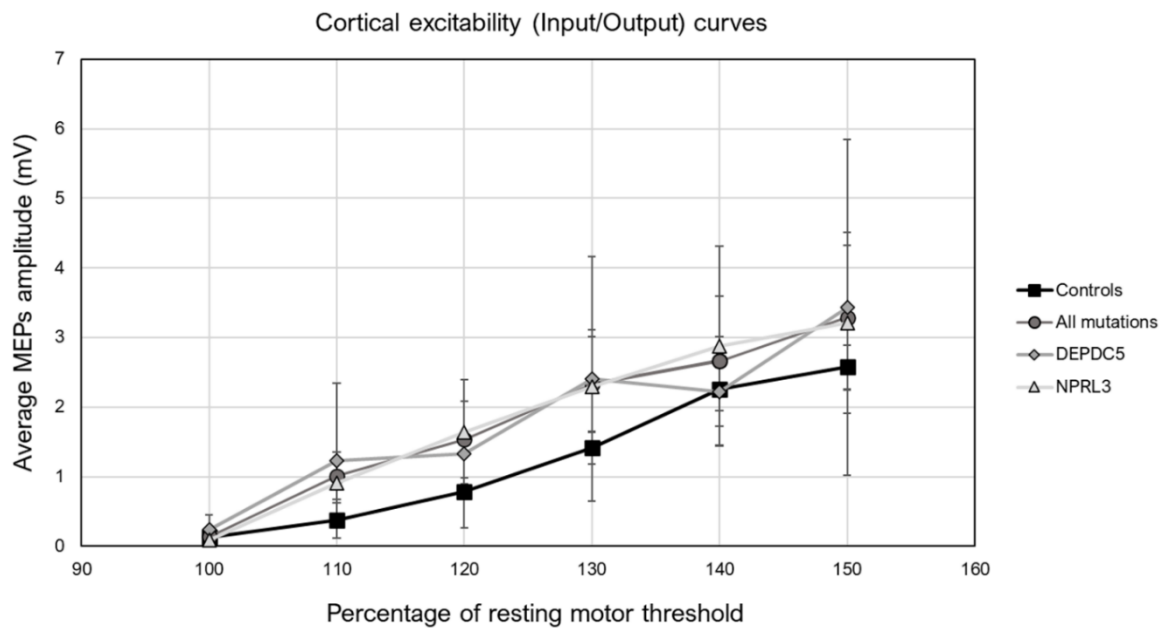
Figure 8. Group-average changes in frequencies' ERSP in response to the chirp sound. Average amplitude increases are indicated as mean \pm standard error.

$$c_{\text{fullcorr}} = \frac{MMI_G}{\kappa I_w} \left(\frac{\sum_i^{GM, WM, CSF} c_{w,i} \exp\left(-\frac{TE}{T_{2w,i}}\right) \left(1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_{1w,i}}\right)\right) f_i}{\exp\left(-\frac{TE}{T_{2G}}\right) \left(1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_{1G}}\right)\right)} \right) \left(\frac{\mu_{GM} + \alpha \mu_{WM}}{(f_{GM} + \alpha f_{WM})(\mu_{GM} + \mu_{WM})} \right)$$

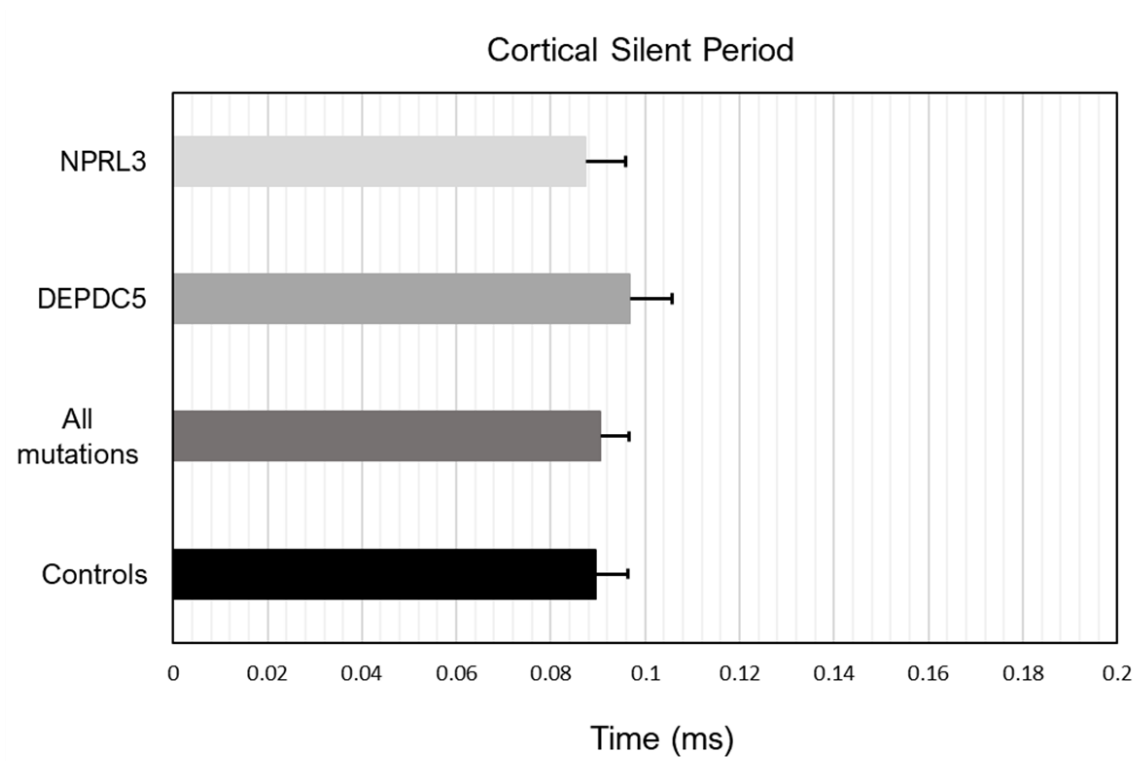
Supplementary figure 1. Tissue-content normalization formula for GABA and glutamate quantification. I_G = GABA area. I_w = water area. GM = grey matter. WM = white matter. CSF = cerebrospinal fluid. κ = editing efficiency of GABA (0.5). $c_{w,i}$ = visible water concentration in each tissue type (43.3 mol/dm³ in GM; 36.1 mol/dm³ in WM; 53.8 mol/dm³ in CSF). MM = co-edited macromolecules signal correction factor. TE = echo time (68ms). TR = repletion time (2000ms). T_{1G} , T_{2G} = T1 and T2 relaxation time constant for GABA (88ms for T1 and 800ms for T2). $T_{1w,i}$ = T1 relaxation time constant for GM (1331ms), WM (832ms), and CSF (3817ms). $T_{2w,i}$ = T2 relaxation time constant for GM (110ms), WM (79.2) and CSF (503). f_i = volume fraction of GW, WM, and CSF within the voxel. f_i = voxel total tissue fraction. α = theoretical uncorrected GABA concentration in GW (1), WM (0.5) and CSF (0). μ_i = group-average voxel fractions of GM, WM, and CSF.



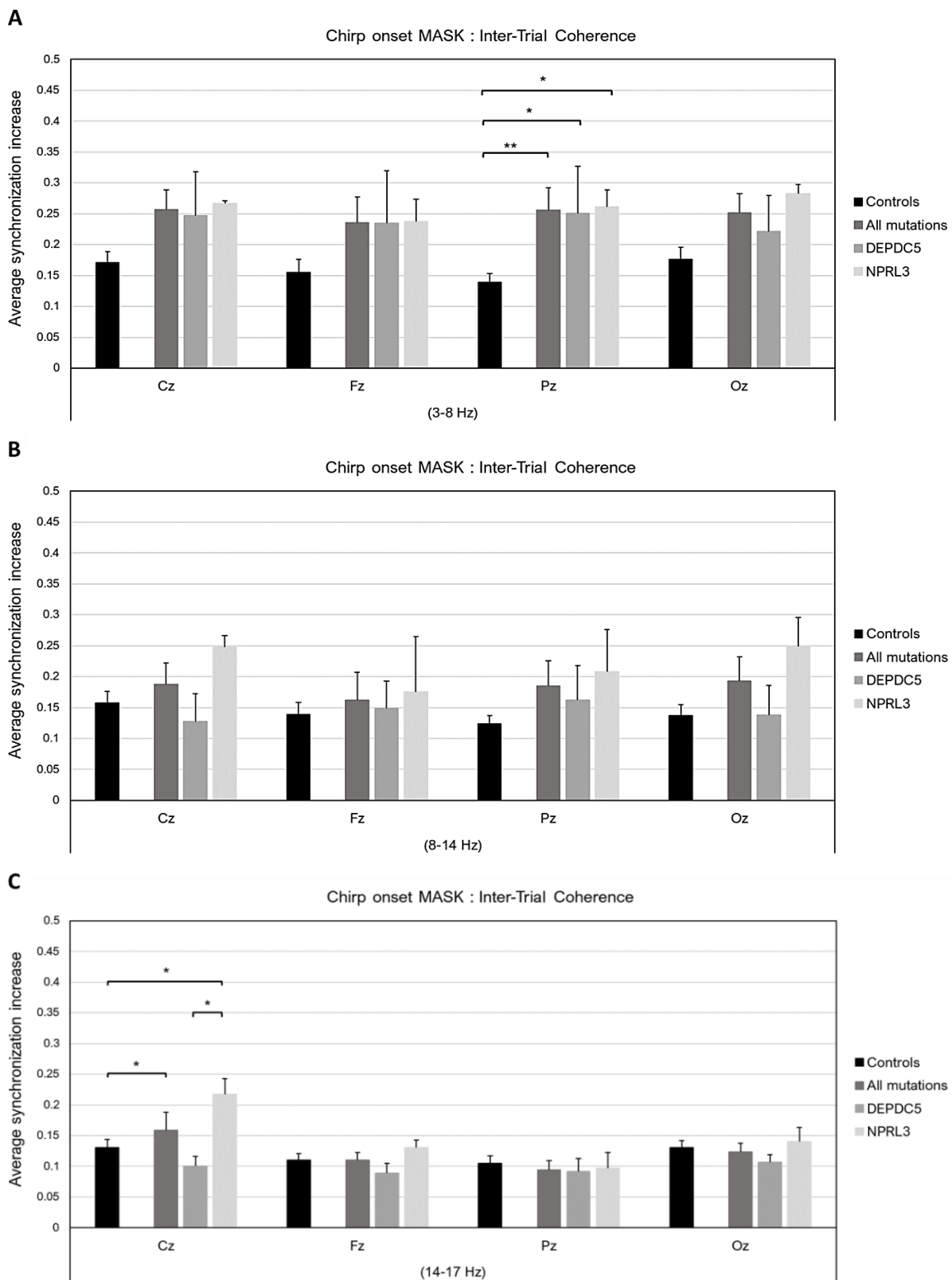
Supplementary figure 2. Defined regions of interest for EEG data analyses. Frontal region (Fz) in green, central region (Cz) in red, parietal region (Pz) in yellow and occipital region (Oz) in blue.



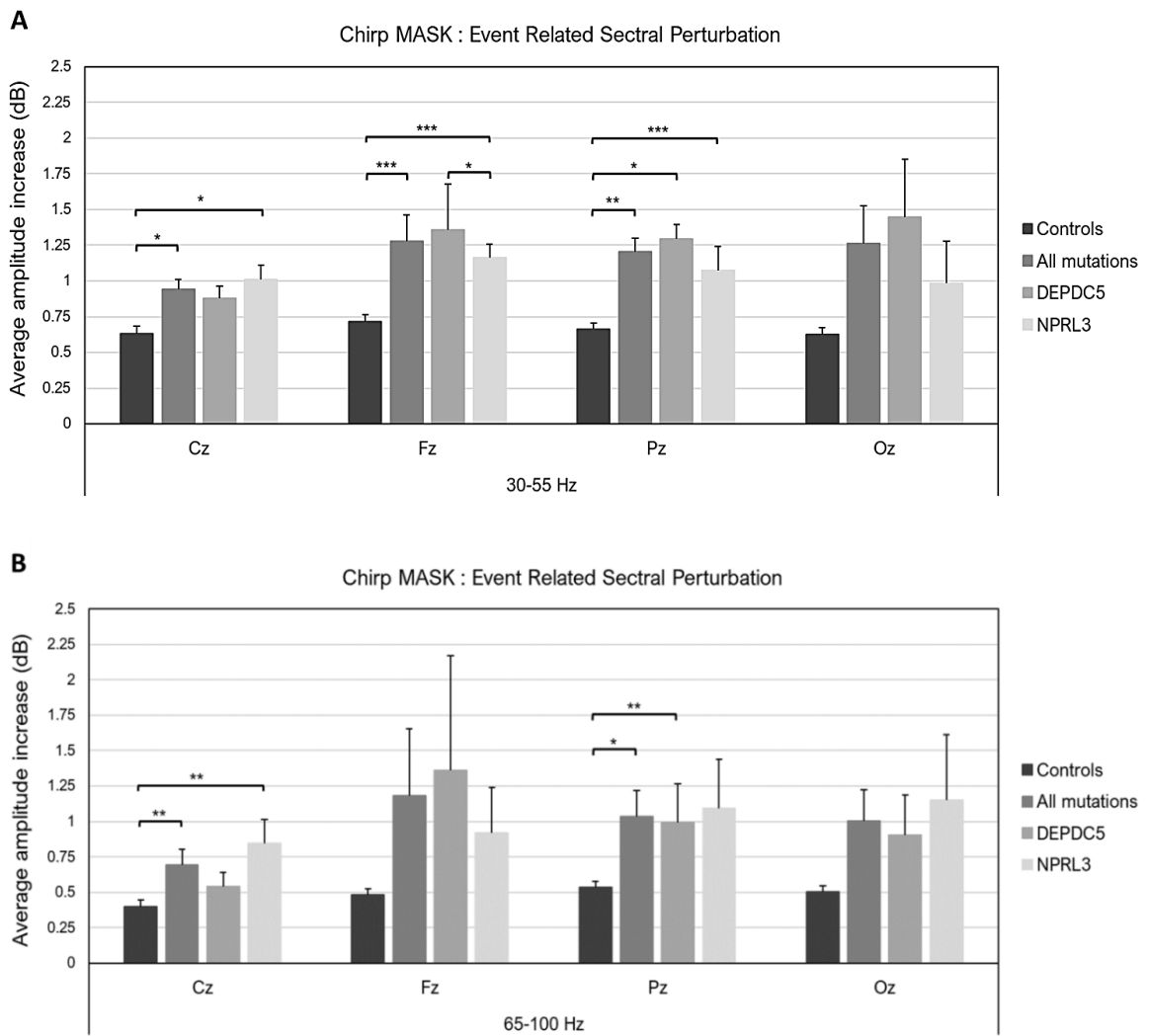
Supplementary figure 3. Curves of cortical excitability. For each percentage of resting motor threshold point, the average MEPs' amplitude is represented as mean \pm standard error.



Supplementary figure 4. Average cortical silent period in each group. Values are indicated as mean \pm standard error.

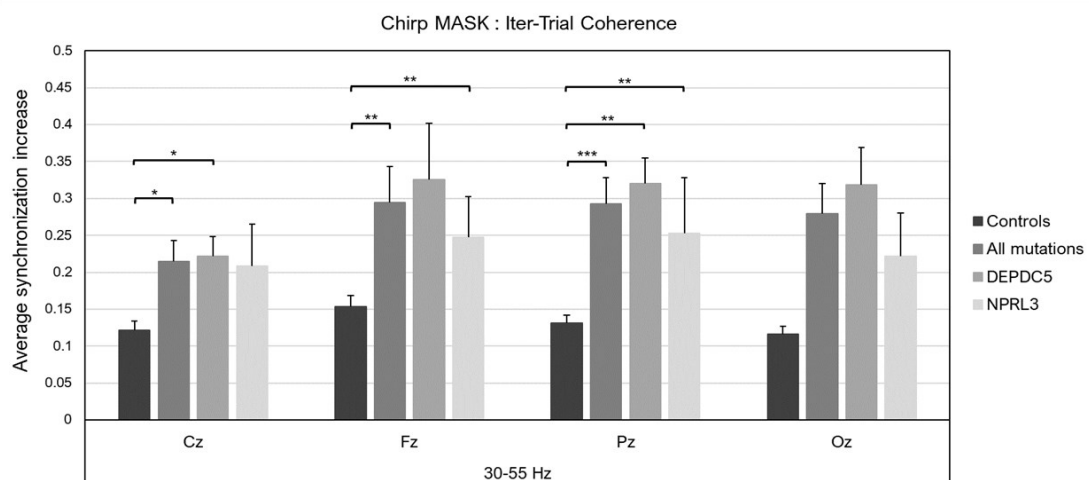


Supplementary figure 5. Group-average changes in frequencies' ITC during the Chirp onset. Average synchronization increases are indicated as mean \pm standard error.

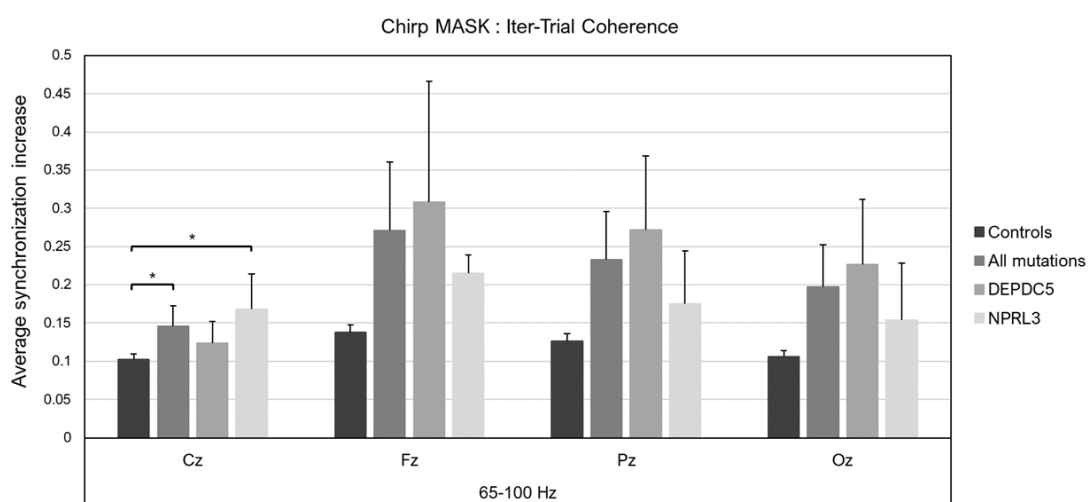


Supplementary figure 6. Group-average changes in frequencies' ERSP in response to the chirp sound. Average amplitude increases are indicated as mean \pm standard error.

A



B



Supplementary figure 7. Group-average changes in frequencies' ITC in response to the chirp sound. Average synchronization increases are indicated as mean \pm standard error.

DISCUSSION

De manière générale l'épilepsie représente une condition neurologique complexe dont la définition et la classification repose sur le progrès de notre compréhension du large spectre étiologique et des mécanismes qui y sont associés. Une condition qui affecte environ cinquante millions d'individus à travers le monde et qui est aujourd'hui considérée par l'organisation mondiale de la santé comme l'une des maladies chroniques les plus communes (World Health Organization, 2019). Selon, la dernière classification de la ligue internationale contre l'épilepsie, le concept d'encéphalopathie épileptique qui renvoie à la dualité, voire la causalité entre l'activité épileptique et les atteintes neurodéveloppementales, pourrait s'étendre à un plus grand nombre de syndromes dont l'étiologie peut être de nature innée (génétique) ou acquise – par exemple à la suite d'un accident vasculaire cérébrale ou à des malformations du développement cortical (Scheffer et al., 2017). Par l'ubiquité de son expression, ainsi que les fonctions physiologiques qu'elle gouverne via diverses cascades signalétiques, la protéine mTOR est sujette à des processus physiopathologiques qui concourent au développement de différentes encéphalopathies épileptiques. Ainsi, on peut associer à cette terminologie les syndromes épileptiques liés à la perte de fonction des gènes du complexe GATOR1 (DEPDC5, NPRL2 et NPRL3) – hautement impliqué dans le rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation mTOR – qui sont aujourd'hui étroitement liés à différentes comorbidités telles que des déficits intellectuels, troubles du langage et de l'attention, ainsi que des troubles du spectre autistique (Iffland et al., 2019).

Les progrès en génomique, notamment via le séquençage de l'exome ont ouvert une nouvelle fenêtre sur notre connaissance des syndromes épileptiques focaux, qui représentent à ce jour 60% des cas d'épilepsie. Il y a à peine plus d'une décennie que de plus en plus d'études, notamment animales, se sont intéressées aux conséquences de la perte de fonction des gènes du complexe GATOR1, mettant systématiquement en évidence le rôle central de l'hyperactivation de la voie mTOR dans l'hyperexcitabilité corticale vraisemblablement sous-jacente au développement de l'épilepsie (Lim & Crino, 2013 ; Yuksaitis et al., 2018); tout comme cela a été démontré dans des résections post-chirurgicales de tissu cérébral humain (Iffland et al., 2018; Iffland et al., 2020). Bien que les variants du complexe GATOR1 contribuent majoritairement à l'étendue du spectre étiologique de ces syndromes, de nombreuses lacunes dans nos connaissances restent à combler notamment quant aux effets physiologiques de ces variants, afin d'utiliser ces connaissances à des fins diagnostiques puis thérapeutiques (Krenn et al., 2020). Au niveau cortical, l'équilibre physiologique entre excitation et inhibition repose sur un ensemble de facteurs (l'environnement ionique extracellulaire, la disponibilité en neurotransmetteurs, l'activité des récepteurs pré- et post synaptiques au sein des réseaux neuronaux, etc...) dont les modifications sont susceptibles de favoriser l'épileptogénèse. Cependant, il reste difficile à ce jour de déterminer dans quelle(s) mesure(s) les mutations des gènes du complexe GATOR1 entraînent une perturbation de cet équilibre. À l'instar des modèles archétypaux d'encéphalopathies épileptiques (par exemple le syndrome de Dravet), certains syndromes neurogénétiques tels que le syndrome du X fragile, présentant des similitudes sur le plan clinique et ayant fait l'objet de recherches approfondies, ont quasi unanimement pu être caractérisés par un dysfonctionnement des mécanismes inhibiteurs.

Ainsi, dans le cadre de ce projet, nous avons tenté de déterminer si les mutations des gènes DEPDC5 et NPRL3 entraînent un déséquilibre cortical au détriment du système inhibiteur GABAergique, ou en faveur des mécanismes corticaux excitateurs. Dans le but d'évaluer l'intégrité de différents facteurs contribuant à cet équilibre et ainsi d'établir un profil holistique de la pathogénèse dans ces syndromes nous avons combiné trois approches distinctes, chez huit patients et porteurs sains des mutations DEPDC5 et NPRL3. Nous suspectons que ce déséquilibre puisse entre autres être le résultat d'une défaillance des

récepteurs GABAergiques, une diminution de la concentration de GABA ou encore une perturbation de l'excitabilité corticale. Dans cette optique, nous avons procédé à la stimulation magnétique transcrânienne du cortex moteur primaire pour quantifier les mécanismes d'inhibition mais également de facilitation intra-corticaux. À l'aide de protocoles de stimulation simples et appariés à intervalles longs et courts, nous avons pu tester l'activité des récepteurs GABAergiques et glutamatergiques pré- et post-synaptiques ainsi que des canaux ioniques nécessaires à l'excitabilité neuronale. Au vu des résultats relatifs à la stimulation magnétique transcrânienne, rien n'indique que les mutations des gènes DEPDC5 et NPRL3 altèrent l'intégrité de récepteurs GABAergiques. De même, rien n'indique que les mécanismes d'excitation intra-corticaux médiés notamment par les récepteurs NMDA et les canaux sodiques voltage dépendants ne soient exacerbés chez les porteurs des mutations DEPDC5 et NPRL3, en comparaison aux individus sains. Grâce à la spectroscopie par résonance magnétique nous avons tenté d'évaluer les effets des mutations DEPDC5 et NPRL3 sur les concentrations de GABA au niveau du cortex visuel primaire et du globus pallidus des ganglions de la base, connues dans la littérature, pour être des régions riches en neurones GABAergiques. Cette seconde approche n'a révélé aucun déséquilibre neurochimique en faveur au détriment du GABA, ou en faveur du glutamate susceptible de contribuer au développement de l'épilepsie dans le cas des mutations DEPDC5 et NPRL3. Enfin, pour une investigation sécuritaire et non-invasive de l'excitabilité corticale, nous avons utilisé l'électroencéphalographie (EEG). En effet, le signal oscillatoire enregistrée à la surface de la tête, reflet de la somme des potentiels électriques générés au sein de larges ensembles neuronaux, nous donne en temps réel un aperçu de l'activité cérébrale globale dans un contexte passif ou actif. Par soucis de pragmatisme et du fait de la fiabilité de ce protocole, nous avons choisi ici d'évaluer l'excitabilité corticale dans le contexte de la stimulation auditive à l'aide du son chirp modulé de 1 à 120 Hz. La décomposition du signal résultant de cette stimulation nous a permis d'évaluer les changements relatifs à certaines oscillations dont les corrélats cognitifs sont en jeu aussi bien dans un contexte physiologique que pathologique. Nous avons observé des différences significatives quant aux oscillations se trouvant dans les intervalles 3 à 8 Hz (thêta) et 30 à 100 Hz (gamma), en termes d'amplitude (grâce aux mesures de perturbation spectrale liée à l'évènement) et de synchronisation du signal (grâces aux

mesures de cohérence inter-essais). Par rapport aux individus sains, le stimulus a d'une part évoquée des réponses oscillatoires de plus haute amplitude dans l'intervalle thêta chez les patients et porteurs sains DEPDC5 et NPRL3 ; ce qui suggère une sollicitation plus intense des réseaux neuronaux impliqués dans la perception et l'intégration de données sensorielle. Une hyperexcitabilité que l'on peut soupçonner d'être médiée par l'hyperactivation de la voie mTOR. D'autre part, la stimulation a révélé chez les patients et porteurs sains DEPDC5 et NPRL3 une activité cérébrale marquée par des phases oscillatoires significativement plus cohérentes et de plus haute amplitude dans l'intervalle gamma, reflet de l'activité des interneurons GABAergiques. L'hyper-synchronisation de leur activité semble indiquer ici une défaillance dans leur rôle de pacemaker sur les neurones pyramidaux, probablement due au manque de régulation de la voie mTOR, et qui contribue vraisemblablement au développement d'une activité cérébrale épileptiforme ainsi qu'au déclenchement de crises focales dans le cas des mutations DEPDC5 et NPRL3.

En ce qui concerne à nos objectifs de recherche, la stimulation magnétique transcrânienne et la spectroscopie par résonance magnétique n'ont pas fourni de données concluantes quant aux mécanismes d'inhibition et de facilitations intra-corticaux et aux concentrations de neurotransmetteurs dans le cadre de cette étude. En revanche, l'approche par électroencéphalographie nous a permis d'obtenir des résultats pertinents en tant que signes électrophysiologiques d'hyperexcitabilité corticale impliquée dans l'épileptogénèse, favorisée par une augmentation de l'activité de la voie mTOR.

Pour finir, on peut aborder les principales forces et faiblesses de cette étude afin d'en dresser un bilan global et d'établir des avenues de recherche futures. Entre autres défis, la taille de l'échantillon constitue indubitablement la principale limite de cette étude. Les difficultés rencontrées lors du recrutement des participants s'expliquent avant tout par la rareté des cas diagnostiqués de syndromes épileptiques liés au gènes DEPDC5 et NPRL3 au Québec et furent exacerbées par les mesures de restrictions mises en place pendant la pandémie de la COVID19. Par ailleurs, malgré le caractère exhaustif de notre approche, la mise en place et la réalisation de ce protocole peut s'avérer long et fastidieux pour les participants. D'autres limites, inhérentes aux techniques d'investigations doivent également

être prises en compte dans l'interprétation de nos résultats. Par exemple, bien que nos observations semblent consistantes avec celles d'études récentes, les données enregistrées par électroencéphalographie ne disposent pas de la même résolution spatiale que celles obtenues au niveau intra-cortical grâce aux enregistrements de potentiels de champs locaux ; ce qui limite les liens que l'on pourrait établir entre nos résultats et ce que l'on trouve dans la littérature. Toutefois, on peut souligner comme principale force l'aspect novateur d'une méthodologie combinant trois approches dont la validité pour l'étude du système GABAergique a été préalablement confirmée (Sanchez-Carpintero et al., 2016 ; Violante et al., 2016 ; Stern et al., 2017 ; Ehtridge et al., 2019 ; Morin-Parent et al., 2019). On rappelle que les mutations des gènes du complexe GATOR1 contribuent majoritairement à la diversité du spectre des syndromes épileptiques focaux ce implique une plus grande variabilité dans la réponse aux traitements médicamenteux et/ou chirurgicaux (Baulac 2016 ; Korenke et al., 2016). Considérant le peu de données dont on dispose chez des patients et porteurs sains DEPDC5 et NPRL3, cette étude pourrait ouvrir la voie vers des investigations plus approfondies des caractéristiques électrophysiologiques et biochimiques dans ces encéphalopathies épileptiques afin d'identifier les cibles thérapeutiques de manière plus efficace et plus exhaustive.

Les perspectives à envisager devraient avant tout adresser les défis rencontrés au cours de ce cette étude. La poursuite de ce projet dans un cadre multicentrique permettrait certainement de pallier le manque de puissance statistique dû à la taille de l'échantillon. En outre, il serait intéressant et pertinent de reproduire ce protocole en identifiant exactement les variants ainsi que les phénotypes associés pour chaque participant, dans le but d'établir des corrélations génotype-phénotype plus robustes pour une meilleur compréhension des caractéristiques de ces encéphalopathies épileptiques.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abhang, P. A., Gawali, B. W., & Mehrotra, S. C. (2016). *Introduction to EEG- and speech-based emotion recognition*. Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Amassian VE, Maccabee PJ. Transcranial magnetic stimulation. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2006;2006:1620-3.
- Andrew, B. L., & Part, N. J. (1972). PROPERTIES OF FAST AND SLOW MOTOR UNITS IN HIND LIMB AND TAIL MUSCLES OF THE RAT. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*, 57(2), 213–225.
- Bagnall, R. D., Crompton, D. E., & Semsarian, C. (2017). Genetic Basis of Sudden Unexpected Death in Epilepsy. *Frontiers in Neurology*, 8, 348.
- Baldassari, S., Picard, F., Verbeek, N. E., van Kempen, M., Brilstra, E. H., Lesca, G., Conti, V., Guerrini, R., Bisulli, F., Licchetta, L., Pippucci, T., Tinuper, P., Hirsch, E., de Saint Martin, A., Chelly, J., Rudolf, G., Chipaux, M., Ferrand-Sorbets, S., Dorfmueller, G., ... Baulac, S. (2019). The landscape of epilepsy-related GATOR1 variants. *Genetics in Medicine*, 21(2), 398–408.
- Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Cherniack, A. D., Chen, W. W., Ottina, K. A., Grabiner, B. C., Spear, E. D., Carter, S. L., Meyerson, M., & Sabatini, D. M. (2013). A Tumor Suppressor Complex with GAP Activity for the Rag GTPases That Signal Amino Acid Sufficiency to mTORC1. *Science*, 340(6136), 1100–1106.
- Bateup, H. S., Johnson, C. A., Denefrio, C. L., Saulnier, J. L., Kornacker, K., & Sabatini, B. L. (2013). Excitatory/Inhibitory Synaptic Imbalance Leads to Hippocampal Hyperexcitability in Mouse Models of Tuberous Sclerosis. *Neuron*, 78(3), 510–522.
- Baulac, S. (2016). MTOR signaling pathway genes in focal epilepsies. In *Progress in Brain Research* (Vol. 226, pp. 61–79). Elsevier.
- Baulac, S., Ishida, S., Marsan, E., Miquel, C., Biraben, A., Nguyen, D. K., Nordli, D., Cossette, P., Nguyen, S., Lambrecq, V., Vlaicu, M., Daniau, M., Bielle, F., Andermann, E., Andermann, F., Leguern, E., Chassoux, F., & Picard, F. (2015). Familial focal epilepsy with focal cortical dysplasia due to *DEPDC 5* mutations: FCD and *DEPDC5* Mutations. *Annals of Neurology*, 77(4), 675–683.
- Baumeister, J., Barthel, T., Geiss, K. R., & Weiss, M. (2008). Influence of phosphatidylserine on cognitive performance and cortical activity after induced stress. *Nutritional Neuroscience*, 11(3), 103–110.

- Bayly, J., Carino, J., Petrovski, S., Smit, M., Fernando, D. A., Vinton, A., Yan, B., Gubbi, J. R., Palaniswami, M. S., & O'Brien, T. J. (2013). Time-frequency mapping of the rhythmic limb movements distinguishes convulsive epileptic from psychogenic nonepileptic seizures. *Epilepsia*, *54*(8), 1402–1408.
- Ben-Sahra, I., Hoxhaj, G., Ricoult, S. J. H., Asara, J. M., & Manning, B. D. (2016). mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*, *351*(6274), 728–733.
- Berger, H. (1929). Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, *87*(1), 527–570.
- Bersagliere, A., Pascual-Marqui, R. D., Tarokh, L., & Achermann, P. (2018). Mapping Slow Waves by EEG Topography and Source Localization: Effects of Sleep Deprivation. *Brain Topography*, *31*(2), 257–269.
- Biasiucci, A., Franceschiello, B., & Murray, M. M. (2019). Electroencephalography. *Current Biology*, *29*(3), R80–R85.
- Blumcke, I., Spreafico, R., Haaker, G., Coras, R., Kobow, K., Bien, C. G., Pfäfflin, M., Elger, C., Widman, G., Schramm, J., Becker, A., Braun, K. P., Leijten, F., Baayen, J. C., Aronica, E., Chassoux, F., Hamer, H., Stefan, H., Rössler, K., ... Avanzini, G. (2017). Histopathological Findings in Brain Tissue Obtained during Epilepsy Surgery. *New England Journal of Medicine*, *377*(17), 1648–1656.
- Bogner, W., Hangel, G., Esmaceli, M., & Andronesi, O. C. (2017). 1D-spectral editing and 2D multispectral in vivo 1 H-MRS and 1 H-MRSI - Methods and applications. *Analytical Biochemistry*, *529*, 48–64.
- Britton J.W., Frey L.C., Hopp J.L. et al., authors; St. Louis EK, Frey LC, editors. Electroencephalography (EEG): An Introductory Text and Atlas of Normal and Abnormal Findings in Adults, Children, and Infants (2016) [Internet]. Chicago: American Epilepsy Society. Introduction.
- Brown, E. J., Albers, M. W., Bum Shin, T., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, *369*(6483), 756–758.
- Buzsáki, G., & Draguhn, A. (2004). Neuronal Oscillations in Cortical Networks. *Science*, *304*(5679), 1926–1929.
- Buzsáki, G., Anastassiou, C. A., & Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(6), 407–420.
- Cammarota, M., Losi, G., Chiavegato, A., Zonta, M., & Carmignoto, G. (2013). Fast spiking interneuron control of seizure propagation in a cortical slice model of focal epilepsy: Fast-spiking interneurons in focal seizure propagation. *The Journal of Physiology*, *591*(4), 807–822.
- Campos, M. S. de A., Ayres, L. R., Morelo, M. R. S., Marques, F. A., & Pereira, L. R. L. (2016). Efficacy and Tolerability of Antiepileptic Drugs in Patients with Focal Epilepsy: Systematic Review and Network Meta-analyses. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, *36*(12), 1255–1271.
- Cardin, J. A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.-H., & Moore, C. I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*, *459*(7247), 663–667.

- Chauvette, S., Seigneur, J., & Timofeev, I. (2012). Sleep Oscillations in the Thalamocortical System Induce Long-Term Neuronal Plasticity. *Neuron*, *75*(6), 1105–1113.
- Cowey, A. (2005). The Ferrier Lecture 2004: What Can Transcranial Magnetic Stimulation Tell Us about How the Brain Works? *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, *360*(1458), 1185–1205.
- Crino, P. B. (2015). mTOR Signaling in Epilepsy: Insights from Malformations of Cortical Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *5*(4), a022442–a022442.
- Crochet, S., Chauvette, S., Boucetta, S., & Timofeev, I. (2005). Modulation of synaptic transmission in neocortex by network activities: Properties of single-axon EPSPs in vivo. *European Journal of Neuroscience*, *21*(4), 1030–1044.
- Crunelli, V., Lőrincz, M. L., Connelly, W. M., David, F., Hughes, S. W., Lambert, R. C., Leresche, N., & Errington, A. C. (2018). Dual function of thalamic low-vigilance state oscillations: Rhythm-regulation and plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(2), 107–118.
- Dawson, R. E., Nieto Guil, A. F., Robertson, L. J., Piltz, S. G., Hughes, J. N., & Thomas, P. Q. (2020). Functional screening of GATOR1 complex variants reveals a role for mTORC1 deregulation in FCD and focal epilepsy. *Neurobiology of Disease*, *134*, 104640.
- De Calbiac, H., Dabacan, A., Marsan, E., Tostivint, H., Devienne, G., Ishida, S., Leguern, E., Baulac, S., Muresan, R. C., Kabashi, E., & Ciura, S. (2018). Depdc5 knockdown causes mTOR-dependent motor hyperactivity in zebrafish. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *5*(5), 510–523.
- De Fusco, A., Cerullo, M. S., Marte, A., Michetti, C., Romei, A., Castroflorio, E., Baulac, S., & Benfenati, F. (2020). Acute knockdown of Depdc5 leads to synaptic defects in mTOR-related epileptogenesis. *Neurobiology of Disease*, *139*, 104822.
- Destexhe, A., Hughes, S. W., Rudolph, M., & Crunelli, V. (2007). Are corticothalamic ‘up’ states fragments of wakefulness? *Trends in Neurosciences*, *30*(7), 334–342.
- De Tisi, J., Bell, G. S., Peacock, J. L., McEvoy, A. W., Harkness, W. F., Sander, J. W., & Duncan, J. S. (2011). The long-term outcome of adult epilepsy surgery, patterns of seizure remission, and relapse: A cohort study. *The Lancet*, *378*(9800), 1388–1395.
- Dibbens, L. M., de Vries, B., Donatello, S., Heron, S. E., Hodgson, B. L., Chintawar, S., Crompton, D. E., Hughes, J. N., Bellows, S. T., Klein, K. M., Callenbach, P. M. C., Corbett, M. A., Gardner, A. E., Kivity, S., Iona, X., Regan, B. M., Weller, C. M., Crimmins, D., O’Brien, T. J., ... Scheffer, I. E. (2013). Mutations in DEPDC5 cause familial focal epilepsy with variable foci. *Nature Genetics*, *45*(5), 546–551.
- Di Lazzaro, V., & Ziemann, U. (2013). The contribution of transcranial magnetic stimulation in the functional evaluation of microcircuits in human motor cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, *7*.
- Dutton, S. B., Makinson, C. D., Papale, L. A., Shankar, A., Balakrishnan, B., Nakazawa, K., & Escayg, A. (2013). Preferential inactivation of Scn1a in parvalbumin interneurons increases seizure susceptibility. *Neurobiology of Disease*, *49*, 211–220.
- Düvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., Vander Heiden, M. G., MacKeigan, J. P., Finan, P. M., Clish, C. B., Murphy, L. O., & Manning, B. D. (2010). Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1. *Molecular Cell*, *39*(2), 171–183.

- Edelman, G. M., & Mountcastle, V. B. (1978). *The mindful brain: Cortical organization and the group-selective theory of higher brain function*. MIT Press.
- Ethridge, L. E., De Stefano, L. A., Schmitt, L. M., Woodruff, N. E., Brown, K. L., Tran, M., Wang, J., Pedapati, E. V., Erickson, C. A., & Sweeney, J. A. (2019). Auditory EEG Biomarkers in Fragile X Syndrome: Clinical Relevance. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, *13*, 60.
- Fisher, J. L. (2011). The effects of stiripentol on GABAA receptors: Stiripentol and GABAA Receptors. *Epilepsia*, *52*, 76–78.
- Foster, J. J., Sutterer, D. W., Serences, J. T., Vogel, E. K., & Awh, E. (2017). Alpha-Band Oscillations Enable Spatially and Temporally Resolved Tracking of Covert Spatial Attention. *Psychological Science*, *28*(7), 929–941.
- Fu, C., Cawthon, B., Clinkscales, W., Bruce, A., Winzenburger, P., & Ess, K. C. (2012). GABAergic Interneuron Development and Function Is Modulated by the Tsc1 Gene. *Cerebral Cortex*, *22*(9), 2111–2119.
- Ganley, I. G., Lam, D. H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., & Jiang, X. (2009). ULK1·ATG13·FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(18), 12297–12305.
- Haas, L. F. (2003). Hans Berger (1873-1941), Richard Caton (1842-1926), and electroencephalography. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *74*(1), 9–9.
- Hallett, M. (2000). Transcranial magnetic stimulation and the human brain. *Nature*, *406*(6792), 147–150.
- Hallett, M. (2007). Transcranial Magnetic Stimulation: A Primer. *Neuron*, *55*(2), 187–199.
- Harris, A. D., Puts, N. A. J., & Edden, R. A. E. (2015). Tissue correction for GABA-edited MRS: Considerations of voxel composition, tissue segmentation, and tissue relaxations: Tissue Correction for GABA-Edited MRS. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, *42*(5), 1431–1440.
- Headley, D. B., & Weinberger, N. M. (2011). Gamma-Band Activation Predicts Both Associative Memory and Cortical Plasticity. *Journal of Neuroscience*, *31*(36), 12748–12758.
- Herrmann, C. S., Munk, M. H. J., & Engel, A. K. (2004). Cognitive functions of gamma-band activity: Memory match and utilization. *Trends in Cognitive Sciences*, *8*(8), 347–355.
- Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P., & Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 Mediate Assembly of the Translation Preinitiation Complex through Dynamic Protein Interchange and Ordered Phosphorylation Events. *Cell*, *123*(4), 569–580.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J.-L., Oshiro, N., & Mizushima, N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(7), 1981–1991.
- Hu, S., Knowlton, R. C., Watson, B. O., Glanowska, K. M., Murphy, G. G., Parent, J. M., & Wang, Y. (2018). Somatic *Depdc5* deletion recapitulates electroclinical features of human focal cortical dysplasia type IIA: Somatic *Depdc5* deletion. *Annals of Neurology*, *84*(1), 140–146.
- Huerta, P. T., & Volpe, B. T. (2009). Transcranial magnetic stimulation, synaptic plasticity and network oscillations. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*, *6*(1), 7.

- Huffman, T. A., Mothe-Satney, I., & Lawrence, J. C. (2002). Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(2), 1047–1052.
- Iffland, P. H., Baybis, M., Barnes, A. E., Leventer, R. J., Lockhart, P. J., & Crino, P. B. (2018). DEPDC5 and NPRL3 modulate cell size, filopodial outgrowth, and localization of mTOR in neural progenitor cells and neurons. *Neurobiology of Disease*, *114*, 184–193.
- Iffland, P. H., Carson, V., Bordey, A., & Crino, P. B. (2019). GATORopathies: The role of amino acid regulatory gene mutations in epilepsy and cortical malformations. *Epilepsia*, *60*(11), 2163–2173.
- Iffland, P. H., Everett, M. E., Cobb-Pitstick, K. M., Bowser, L. E., Barnes, A. E., Babus, J. K., Romanowski, A., Baybis, M., Puffenberger, E. G., Gonzaga-Jauregui, C., Pouloupoulos, A., Carson, V. J., & Crino, P. B. (2020). NPRL3: *Direct Effects on Human Phenotypic Variability, mTOR Signaling, Subcellular mTOR Localization, Cortical Lamination, and Seizure Susceptibility* [Preprint]. Neuroscience.
- Ishida, S., Picard, F., Rudolf, G., Noé, E., Achaz, G., Thomas, P., Genton, P., Mundwiler, E., Wolff, M., Marescaux, C., Miles, R., Baulac, M., Hirsch, E., Leguern, E., & Baulac, S. (2013). Mutations of DEPDC5 cause autosomal dominant focal epilepsies. *Nature Genetics*, *45*(5), 552–555.
- Javed, K., Reddy, V., & Lui, F. (2021). Neuroanatomy, Lateral Corticospinal Tract. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., & Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(7), 1992–2003.
- Kahana, M. J. (2006). The Cognitive Correlates of Human Brain Oscillations. *The Journal of Neuroscience*, *26*(6), 1669–1672.
- Kaiser, D. A. (2005). Basic Principles of Quantitative EEG. *Journal of Adult Development*, *12*(2–3), 99–104.
- Kang, J.-Q. (2017). Defects at the crossroads of GABAergic signaling in generalized genetic epilepsies. *Epilepsy Research*, *137*, 9–18.
- Karbowski, K. (2002). Hans Berger (1873-1941). *Journal of Neurology*, *249*(8), 1130–1131.
- Kato, M., Das, S., Petras, K., Sawaishi, Y., & Dobyns, W. B. (2003). Polyalanine expansion of ARX associated with cryptogenic West syndrome. *Neurology*, *61*(2), 267–276.
- Kilavik, B. E., Zaepffel, M., Brovelli, A., MacKay, W. A., & Riehle, A. (2013). The ups and downs of beta oscillations in sensorimotor cortex. *Experimental Neurology*, *245*, 15–26.
- Kim, J. E., & Chen, J. (2004). Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Activity by Mammalian Target of Rapamycin and Amino Acids in Adipogenesis. *Diabetes*, *53*(11), 2748–2756.
- Klimesch, W. (1996). Memory processes, brain oscillations and EEG synchronization. *International Journal of Psychophysiology*, *24*(1–2), 61–100.
- Klomjai, W., Katz, R., & Lackmy-Vallée, A. (2015). Basic principles of transcranial magnetic stimulation (TMS) and repetitive TMS (rTMS). *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, *58*(4), 208–213.

- Kobayashi, M., & Pascual-Leone, A. (2003). Transcranial magnetic stimulation in neurology. *The Lancet Neurology*, 2(3), 145–156.
- Korenke, G.-C., Eggert, M., Thiele, H., Nürnberg, P., Sander, T., & Steinlein, O. K. (2016). Nocturnal frontal lobe epilepsy caused by a mutation in the GATOR1 complex gene *NPRL3*. *Epilepsia*, 57(3), e60–e63.
- Krenn, M., Wagner, M., Hotzy, C., Graf, E., Weber, S., Brunet, T., Lorenz-Depiereux, B., Kasprian, G., Aull-Watschinger, S., Patarraia, E., Stogmann, E., Zimprich, A., Strom, T. M., Meitinger, T., & Zimprich, F. (2020). Diagnostic exome sequencing in non-acquired focal epilepsies highlights a major role of GATOR1 complex genes. *Journal of Medical Genetics*, 57(9), 624–633.
- Kropotov, J. (2016). *Functional neuromarkers for psychiatry*. Elsevier.
- Landheer, K., Schulte, R. F., Treacy, M. S., Swanberg, K. M., & Juchem, C. (2020). Theoretical description of modern ¹H in Vivo magnetic resonance spectroscopic pulse sequences. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 51(4), 1008–1029.
- Laplanche, M., & Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(20), 3589–3594.
- Lee, J. H., Huynh, M., Silhavy, J. L., Kim, S., Dixon-Salazar, T., Heiberg, A., Scott, E., Bafna, V., Hill, K. J., Collazo, A., Funari, V., Russ, C., Gabriel, S. B., Mathern, G. W., & Gleeson, J. G. (2012). De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nature Genetics*, 44(8), 941–945.
- Leicht, G., Björklund, J., Vauth, S., Mußmann, M., Haaf, M., Steinmann, S., Rauh, J., & Mulert, C. (2021). Gamma-band synchronisation in a frontotemporal auditory information processing network. *NeuroImage*, 239, 118307.
- Leniger, T., Kananura, C., Hufnagel, A., Bertrand, S., Bertrand, D., & Steinlein, O. K. (2003). A New Chrna4 Mutation with Low Penetrance in Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy: ADNFLE MUTATION WITH REDUCED PENETRANCE. *Epilepsia*, 44(7), 981–985.
- Luck, S. J. (2005). *An introduction to the event-related potential technique*. MIT Press.
- Ma, X. M., & Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(5), 307–318.
- Mandal, P. K. (2007). Magnetic resonance spectroscopy (MRS) and its application in Alzheimer's disease. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 30A(1), 40–64.
- Marsh, E., Fulp, C., Gomez, E., Nasrallah, I., Minarcik, J., Sudi, J., Christian, S. L., Mancini, G., Labosky, P., Dobyms, W., Brooks-Kayal, A., & Golden, J. A. (2009). Targeted loss of Arx results in a developmental epilepsy mouse model and recapitulates the human phenotype in heterozygous females. *Brain*, 132(6), 1563–1576.
- Marshall, L., Helgadóttir, H., Mölle, M., & Born, J. (2006). Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature*, 444(7119), 610–613.
- Menon, S., & Manning, B. D. (2008). Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene*, 27(S2), S43–S51.
- Menon, S., Dibble, C. C., Talbott, G., Hoxhaj, G., Valvezan, A. J., Takahashi, H., Cantley, L. C., & Manning, B. D. (2014). Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome. *Cell*, 156(4), 771–785.
- Mescher, M., Merkle, H., Kirsch, J., Garwood, M., & Gruetter, R. (1998). Simultaneous in vivo spectral editing and water suppression. *NMR in Biomedicine*, 11(6), 266–272.

- Mountcastle, V. (1997). The columnar organization of the neocortex. *Brain*, *120*(4), 701–722.
- Mullins, P. G., McGonigle, D. J., O’Gorman, R. L., Puts, N. A. J., Vidyasagar, R., Evans, C. J., & Edden, R. A. E. (2014). Current practice in the use of MEGA-PRESS spectroscopy for the detection of GABA. *NeuroImage*, *86*, 43–52.
- Nascimento, F. A., Borlot, F., Cossette, P., Minassian, B. A., & Andrade, D. M. (2015). Two definite cases of sudden unexpected death in epilepsy in a family with a *DEPDC5* mutation. *Neurology Genetics*, *1*(4), e28.
- Niedermeyer, E. (1997). Alpha rhythms as physiological and abnormal phenomena. *International Journal of Psychophysiology*, *26*(1–3), 31–49.
- O’Keefe, J., & Burgess, N. (1999). Theta activity, virtual navigation and the human hippocampus. *Trends in Cognitive Sciences*, *3*(11), 403–406.
- Oostenveld, R., & Praamstra, P. (2001). The five percent electrode system for high-resolution EEG and ERP measurements. *Clinical Neurophysiology*, *112*(4), 713–719.
- Paquereau, J. (2007). [Physiology of normal sleep]. *La Revue Du Praticien*, *57*(14), 1529–1541.
- Penfield, W., & Boldrey, E. (1937). SOMATIC MOTOR AND SENSORY REPRESENTATION IN THE CEREBRAL CORTEX OF MAN AS STUDIED BY ELECTRICAL STIMULATION. *Brain*, *60*(4), 389–443.
- Perucca, E. (2005). An Introduction to Antiepileptic Drugs: INTRODUCTION TO ANTIEPILEPTIC DRUGS. *Epilepsia*, *46*, 31–37.
- Picard, F., Makrythanasis, P., Navarro, V., Ishida, S., de Bellescize, J., Ville, D., Weckhuysen, S., Fosselle, E., Suls, A., De Jonghe, P., Vasselon Raina, M., Lesca, G., Depienne, C., An-Gourfinkel, I., Vlaicu, M., Baulac, M., Mundwiler, E., Couarch, P., Combi, R., ... Baulac, S. (2014). *DEPDC5* mutations in families presenting as autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Neurology*, *82*(23), 2101–2106.
- Picard, F., Makrythanasis, P., Navarro, V., Ishida, S., de Bellescize, J., Ville, D., Weckhuysen, S., Fosselle, E., Suls, A., De Jonghe, P., Vasselon Raina, M., Lesca, G., Depienne, C., An-Gourfinkel, I., Vlaicu, M., Baulac, M., Mundwiler, E., Couarch, P., Combi, R., ... Baulac, S. (2014). *DEPDC5* mutations in families presenting as autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Neurology*, *82*(23), 2101–2106.
- Poirier, K., Eisermann, M., Caubel, I., Kaminska, A., Peudonnier, S., Boddaert, N., Saillour, Y., Dulac, O., Souville, I., Beldjord, C., Lascelles, K., Plouin, P., Chelly, J., & Bahi-Buisson, N. (2008). Combination of infantile spasms, non-epileptic seizures and complex movement disorder: A new case of ARX-related epilepsy. *Epilepsy Research*, *80*(2–3), 224–228.
- Porstmann, T., Santos, C. R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., Griffiths, J. R., Chung, Y.-L., & Schulze, A. (2008). SREBP Activity Is Regulated by mTORC1 and Contributes to Akt-Dependent Cell Growth. *Cell Metabolism*, *8*(3), 224–236.
- Ragona, F., Granata, T., Bernardina, B. D., Offredi, F., Darra, F., Battaglia, D., Morbi, M., Brazzo, D., Cappelletti, S., Chieffo, D., De Giorgi, I., Fontana, E., Freri, E., Marini, C., Toraldo, A., Specchio, N., Veggiotti, P., Vigeveno, F., Guerrini, R., ... Dravet, C. (2011). Cognitive development in Dravet syndrome: A retrospective, multicenter study of 26 patients: Cognitive Development in Dravet Syndrome. *Epilepsia*, no-no.
- Ramos, R., Arturo Olvera, J., & Olmos, I. (2017). Analysis of EEG Signal Processing Techniques based on Spectrograms. *Research in Computing Science*, *145*(1), 151–162.

- Ray, S., & Maunsell, J. H. R. (2015). Do gamma oscillations play a role in cerebral cortex? *Trends in Cognitive Sciences*, 19(2), 78–85.
- Ribierre, T., Deleuze, C., Bacq, A., Baldassari, S., Marsan, E., Chipaux, M., Muraca, G., Roussel, D., Navarro, V., Leguern, E., Miles, R., & Baulac, S. (2018). Second-hit mosaic mutation in mTORC1 repressor DEPDC5 causes focal cortical dysplasia-associated epilepsy. *Journal of Clinical Investigation*, 128(6), 2452–2458.
- Ricos, M. G., Hodgson, B. L., Pippucci, T., Saidin, A., Ong, Y. S., Heron, S. E., Licchetta, L., Bisulli, F., Bayly, M. A., Hughes, J., Baldassari, S., Palombo, F., Epilepsy Electroclinical Study Group, Santucci, M., Meletti, S., Berkovic, S. F., Rubboli, G., Thomas, P. Q., Scheffer, I. E., ... Dibbens, L. M. (2016). Mutations in the mammalian target of rapamycin pathway regulators *NPRL2* and *NPRL3* cause focal epilepsy: Mutations in *NPRL2* and *NPRL3* Cause Focal Epilepsy. *Annals of Neurology*, 79(1), 120–131.
- Rossini, P. M., Burke, D., Chen, R., Cohen, L. G., Daskalakis, Z., Di Iorio, R., Di Lazzaro, V., Ferreri, F., Fitzgerald, P. B., George, M. S., Hallett, M., Lefaucheur, J. P., Langguth, B., Matsumoto, H., Miniussi, C., Nitsche, M. A., Pascual-Leone, A., Paulus, W., Rossi, S., ... Ziemann, U. (2015). Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord, roots and peripheral nerves: Basic principles and procedures for routine clinical and research application. An updated report from an I.F.C.N. Committee. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 126(6), 1071–1107.
- Russell, N. J. (1980). Axonal conduction velocity changes following muscle tenotomy or deafferentation during development in the rat. *The Journal of Physiology*, 298(1), 347–360.
- Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., & Snyder, S. H. (1994). RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 78(1), 35–43.
- Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., Wiederrecht, G., & Abraham, R. T. (1995). Isolation of a Protein Target of the FKBP12-Rapamycin Complex in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270(2), 815–822.
- Saladin, K. S., Gan, C. A., & Cushman, H. N. (2021). *Anatomy & physiology: The unity of form and function*.
- Sanaei Nezhad, F., Anton, A., Michou, E., Jung, J., Parkes, L. M., & Williams, S. R. (2018). Quantification of GABA, glutamate and glutamine in a single measurement at 3 T using GABA-edited MEGA-PRESS. *NMR in Biomedicine*, 31(1), e3847.
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). MTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6), 960–976.
- Scerri, T., Riseley, J. R., Gillies, G., Pope, K., Burgess, R., Mandelstam, S. A., Dibbens, L., Chow, C. W., Maixner, W., Harvey, A. S., Jackson, G. D., Amor, D. J., Delatycki, M. B., Crino, P. B., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E., Bahlo, M., Lockhart, P. J., & Leventer, R. J. (2015). Familial cortical dysplasia type IIA caused by a germline mutation in *DEPDC 5*. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2(5), 575–580.
- Schack, B., Klimesch, W., & Sauseng, P. (2005). Phase synchronization between theta and upper alpha oscillations in a working memory task. *International Journal of Psychophysiology*, 57(2), 105–114.

- Scheffer, I. E., Heron, S. E., Regan, B. M., Mandelstam, S., Crompton, D. E., Hodgson, B. L., Licchetta, L., Provini, F., Bisulli, F., Vadlamudi, L., Gecz, J., Connelly, A., Tinuper, P., Ricos, M. G., Berkovic, S. F., & Dibbens, L. M. (2014). Mutations in mammalian target of rapamycin regulator *DEPDC5* cause focal epilepsy with brain malformations: *DEPDC5* Focal Epilepsy. *Annals of Neurology*, *75*(5), 782–787.
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, *58*(4), 512–521.
- Schomer, D. L., & Niedermeyer, E. (Eds.). (2011). *Niedermeyer's electroencephalography: Basic principles, clinical applications, and related fields* (6. ed). Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins.
- Schott, G. D. (1993). Penfield's homunculus: A note on cerebral cartography. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *56*(4), 329–333.
- Stout, E. E., & Beloozerova, I. N. (2013). Differential responses of fast- and slow-conducting pyramidal tract neurons to changes in accuracy demands during locomotion: Fast and slow PTN activity during accurate stepping. *The Journal of Physiology*, *591*(10), 2647–2666.
- Sohn, Y. H., & Hallett, M. (2004). Motor evoked potentials. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, *15*(1), 117–131.
- Sörnmo, L., & Laguna, P. (2005). The Electroencephalogram—A Brief Background. In *Bioelectrical Signal Processing in Cardiac and Neurological Applications* (pp. 25–53). Elsevier.
- Sugiyama, S., Taniguchi, T., Kinukawa, T., Takeuchi, N., Ohi, K., Shioiri, T., Nishihara, M., & Inui, K. (2021). Suppression of Low-Frequency Gamma Oscillations by Activation of 40-Hz Oscillation. *Cerebral Cortex*, bhab381.
- Swaminathan, A., Hassan-Abdi, R., Renault, S., Siekierska, A., Riché, R., Liao, M., de Witte, P. A. M., Yanicostas, C., Soussi-Yanicostas, N., Drapeau, P., & Samarut, É. (2018). Non-canonical mTOR-Independent Role of DEPDC5 in Regulating GABAergic Network Development. *Current Biology*, *28*(12), 1924–1937.e5.
- Swartz, B. E. (1998). *The advantages of digital over analog recording techniques. Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *106*(2), 113–117.
- Tinguely, G., Finelli, L. A., Landolt, H.-P., Borbély, A. A., & Achermann, P. (2006). Functional EEG topography in sleep and waking: State-dependent and state-independent features. *NeuroImage*, *32*(1), 283–292.
- Tiitinen, H. T., Sinkkonen, J., Reinikainen, K., Alho, K., Lavikainen, J., & Näätänen, R. (1993). Selective attention enhances the auditory 40-Hz transient response in humans. *Nature*, *364*(6432), 59–60.
- Tononi, G., & Cirelli, C. (2014). Sleep and the Price of Plasticity: From Synaptic and Cellular Homeostasis to Memory Consolidation and Integration. *Neuron*, *81*(1), 12–34.
- Tootell, R., Silverman, M., Switkes, E., & De Valois, R. (1982). Deoxyglucose analysis of retinotopic organization in primate striate cortex. *Science*, *218*(4575), 902–904.
- Tsai, V., Parker, W. E., Orlova, K. A., Baybis, M., Chi, A. W. S., Berg, B. D., Birnbaum, J. F., Estevez, J., Okochi, K., Sarnat, H. B., Flores-Sarnat, L., Aronica, E., & Crino, P. B.

- (2014). Fetal Brain mTOR Signaling Activation in Tuberous Sclerosis Complex. *Cerebral Cortex*, 24(2), 315–327.
- Valero-Cabré, A., Pascual-Leone, A., & Coubard, O. A. (2011). La stimulation magnétique transcrânienne (TMS) dans la recherche fondamentale et clinique en neuroscience. *Revue Neurologique*, 167(4), 291–316.
- Verrier, R. L., Pang, T. D., Nearing, B. D., & Schachter, S. C. (2020). The Epileptic Heart: Concept and clinical evidence. *Epilepsy & Behavior*, 105, 106946.
- Vyazovskiy, V. V., & Tobler, I. (2005). Theta activity in the waking EEG is a marker of sleep propensity in the rat. *Brain Research*, 1050(1–2), 64–71.
- Vyazovskiy, V. V., Cirelli, C., Pfister-Genskow, M., Faraguna, U., & Tononi, G. (2008). Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep. *Nature Neuroscience*, 11(2), 200–208.
- Wassermann E, Epstein CM, Ziemann U, Walsh V, Paus T, Lisanby SH. 2008. The Oxford handbook of transcranial stimulation. Oxford: Oxford University Press.
- Wagner, T., Fregni, F., Eden, U., Ramos-Estebanez, C., Grodzinsky, A., Zahn, M., & Pascual-Leone, A. (2006). Transcranial magnetic stimulation and stroke: A computer-based human model study. *NeuroImage*, 30(3), 857–870.
- Wagner, T., Valero-Cabre, A., & Pascual-Leone, A. (2007). Noninvasive Human Brain Stimulation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9(1), 527–565.
- Wagner, T., Rushmore, J., Eden, U., & Valero-Cabre, A. (2009). Biophysical foundations underlying TMS: Setting the stage for an effective use of neurostimulation in the cognitive neurosciences. *Cortex*, 45(9), 1025–1034.
- Weckhuysen, S., Marsan, E., Lambrecq, V., Marchal, C., Morin-Brureau, M., An-Gourfinkel, I., Baulac, M., Fohlen, M., Kallay Zetchi, C., Seeck, M., de la Grange, P., Dermaut, B., Meurs, A., Thomas, P., Chassoux, F., Leguern, E., Picard, F., & Baulac, S. (2016). Involvement of GATOR complex genes in familial focal epilepsies and focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, 57(6), 994–1003.
- Weckhuysen, S., Marsan, E., Lambrecq, V., Marchal, C., Morin-Brureau, M., An-Gourfinkel, I., Baulac, M., Fohlen, M., Kallay Zetchi, C., Seeck, M., de la Grange, P., Dermaut, B., Meurs, A., Thomas, P., Chassoux, F., Leguern, E., Picard, F., & Baulac, S. (2016). Involvement of GATOR complex genes in familial focal epilepsies and focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, 57(6), 994–1003.
- Welniarz, Q., Dusart, I., & Roze, E. (2017). The corticospinal tract: Evolution, development, and human disorders: Corticospinal Tract Human Disorders. *Developmental Neurobiology*, 77(7), 810–829.
- West, W. J. (1841). ON A PECULIAR FORM OF INFANTILE CONVULSIONS,. *The Lancet*, 35(911), 724–725.
- Weston, M. C., Chen, H., & Swann, J. W. (2014). Loss of mTOR repressors Tsc1 or Pten has divergent effects on excitatory and inhibitory synaptic transmission in single hippocampal neuron cultures. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7.
- World Health Organization. (2019). *Epilepsy: A public health imperative*. World Health Organization.
- Yuskaitis, C. J., Jones, B. M., Wolfson, R. L., Super, C. E., Dhamne, S. C., Rotenberg, A., Sabatini, D. M., Sahin, M., & Poduri, A. (2018). A mouse model of DEPDC5-related epilepsy: Neuronal loss of Depdc5 causes dysplastic and ectopic neurons, increased mTOR signaling, and seizure susceptibility. *Neurobiology of Disease*, 111, 91–101.

- Ziemann, U., Reis, J., Schwenkreis, P., Rosanova, M., Strafella, A., Badawy, R., & Müller-Dahlhaus, F. (2015). TMS and drugs revisited 2014. *Clinical Neurophysiology*, *126*(10), 1847–1868.
- Ziemann, U. (2021). Pharmacology of TMS measures. In E. M. Wassermann, A. V. Peterchev, U. Ziemann, S. H. Lisanby, H. R. Siebner, & V. Walsh (Eds.), *The Oxford Handbook of Transcranial Stimulation, Second Edition*. Oxford University Press.
- Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2011). mTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(1), 21–35.

ANNEXES

Annexe 1. Principes de résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire est un phénomène physique propre aux noyaux atomiques. Ce phénomène dépend essentiellement d'une propriété des noyaux atomiques qu'on appelle le spin ou nombre quantique de spin. Avec la masse et la charge électrique, le spin constitue une propriété fondamentale des particules élémentaires (électrons, protons, neutrons, quarks, etc.), et en représente le moment cinétique intrinsèque (\vec{s}). Ainsi le spin des noyaux atomiques (\vec{S}) reflète donc la somme vectorielle des spins des protons (+1/2) et des neutrons (-1/2) qui les constituent. De ce fait, les noyaux ayant un numéro atomique impair (ex. ^1H , ^{19}F) possèdent un spin non nul (ex. ^1H , ^{19}F), ce qui les rend précisément sujets au phénomène de résonance magnétique. En effet, ces noyaux possèdent non seulement un moment cinétique intrinsèque mais également un moment magnétique ($\vec{\mu}$) qui représente la direction et la force du champ magnétique environnant le noyau. Ce moment magnétique est proportionnellement lié au moment cinétique par une constante (propre à chaque atome) que l'on appelle le rapport gyromagnétique (γ), de sorte que $\vec{\mu} = \gamma^* \vec{S}$. De manière indissociable, les moments cinétique et magnétique existent dans différents états quantiques que l'on dénombre selon la formule $2\vec{S} + 1$. Par exemple, le noyau atomique de l'hydrogène n'étant constitué que d'un proton, son spin ne présente que 2 états quantiques différents. En présence d'un champ magnétique externe (B_0) de l'ordre de quelques teslas, on peut observer la déclinaison de ces différents états quantiques en fonction de leur niveau d'énergie, selon l'effet Zeeman. Si on connaît la différence d'énergie entre deux états quantiques du spin d'un noyau atomique, il devient alors possible d'influencer sa capacité à passer de l'un à l'autre. En effet, via l'application d'un rayonnement électromagnétique, on fournit au noyau une source d'énergie qu'il peut non seulement absorber pour passer à un état quantique supérieur (transition) mais aussi émettre afin de revenir à son état d'équilibre (relaxation). La fréquence de ce rayonnement électromagnétique détermine la quantité d'énergie fournie, et par conséquent détermine le

phénomène de résonance magnétique nucléaire. Le champ magnétique de la Terre n'étant que de 0.00006 tesla, il ne permet pas d'influencer le moment magnétique des noyaux atomiques qui sont d'ordinaire orientés de manière aléatoire. Cependant, sous l'effet d'un champ magnétique externe (au moins 60,000 fois plus fort que celui de la Terre), les moments magnétiques de spins subissent un changement progressif de leur orientation tout autour de l'axe imposé par ce champ, que l'on appelle mouvement de précession (ou précession de Larmor). La fréquence de Larmor (ν_0 ou ω_0) - autrement dit, la fréquence à laquelle on fait résonner le noyau - reflète la vitesse de ce mouvement de précession et varie en fonction du champ magnétique B_0 ainsi que la constante gyromagnétique γ , de sorte que $\omega_0 = \gamma B_0$.

Du fait de son abondance dans le corps, la résonance magnétique de l'atome d'hydrogène, (contenu dans les molécules d'eau, mais également dans les protéines et lipides) est plus communément exploitée. Par ailleurs, la constitution de son noyau fait qu'il est d'autant plus simple d'induire sa résonance via l'utilisation d'ondes de basse fréquence, véhiculant de faibles quantités d'énergie (radiofréquences) sous l'effet d'un champ magnétique de l'ordre de quelques teslas.

Annexe 2. Acquisition des données d'imagerie par résonance magnétique

Le scanner IRM agit comme un aimant qui va permettre de générer un champ (B_0), généralement de 1.5 ou 3T. L'application d'un champ magnétique puissant (B_0), impose aux protons des atomes d'hydrogène un alignement de leur moment magnétique selon un plan longitudinal z, de sorte que leur spins précessent autour de l'axe du champ B_0 .

On note que le champ B_0 influence l'orientation des moments magnétiques des spins, mais pas la phase de leur mouvement de précession. Tandis qu'une petite proportion de protons (protons 'down') s'aligne au champs B_0 de manière antiparallèle (dans la direction opposée), la majorité (protons 'up') s'aligne au champ B_0 de manière parallèle, (dans la même direction). L'impulsion de radiofréquence émise fournit assez d'énergie aux protons 'up' en excès pour entraîner une déviation de 90° des moments magnétiques de leur spins, du plan longitudinal z vers un plan transversal (x,y). C'est dans ce plan transversal notamment que la bobine exerce son rôle d'antenne et parvient à mesure la résonance magnétique totale (ou vecteur de magnétisation nette) des protons dont les spins précessent alors en phase. L'interruption du signal de radiofréquence force les protons à libérer cette même énergie pour revenir à leur état initial (équilibre), au cours de ce qu'on appelle la relaxation longitudinale T1. Cela se traduit par un retour des moments magnétiques de leur spins du plan transversal (x,y) vers le plan longitudinal (z), et qui se produit de façon exponentielle selon un facteur de temps (T1). Parallèlement à ce retour dans le plan longitudinal, l'interruption du signal de radiofréquence entraîne un déphasage du mouvement de précession des spins des protons au cours de ce qu'on appelle la relaxation transverse T2 (ou relation spin-spin). Le signal perçu à l'antenne de réception représente donc ce décalage de phase progressif entre les spins des protons, que l'on appelle FID (Free Induction Decay). Tout comme la relaxation longitudinale, la relaxation transverse se produit de manière exponentielle et selon un facteur de temps T2, en théorie. Dans la pratique, le champ B_0 n'est homogène qu'au niveau macroscopique. Au niveau microscopique il présente des inhomogénéités qui causent l'accélération du déphasage des spins, de sorte que la relaxation transverse se produit selon un facteur de temps T2*. La latence des relaxation longitudinales et transverses est spécifique aux différentes formes de la matière. En effet, à l'état liquide, les molécules disposent d'une plus grande liberté de

mouvement. Ainsi les protons se trouvant dans un environnement fluide ont généralement des temps T1 et T2 long (1500 – 2000 ms). Inversement, l'organisation compacte et fixe de la matière à l'état solide favorise les différentes interactions et transferts d'énergie, de sorte que les protons se trouvant dans un environnement solide ont des temps T1 et T2 plus court. Plus particulièrement, les tissus majoritairement constitués d'eau ont des temps de relaxation plus long que les tissus majoritairement constitués de lipides et lipoprotéines. Ce sont essentiellement ces paramètres qui sont exploités de manière séquentielle afin de produire une image grâce à la résonance magnétique.

La séquence d'écho de spin est l'une des séquences d'impulsion les plus communément utilisées en IRM. Après une première impulsion de radiofréquence de 90° , la cohérence de phase des spins diminue selon le facteur T2*. Afin de palier à ce déphasage accéléré, une seconde impulsion de 180° est émise, et entraîne un nouveau transfert de la magnétisation nette, du plan longitudinal (Mz) vers le plan transversal (Mx,y), où le signal est mesuré par l'antenne au bout d'un certain temps que l'on appelle temps d'écho (TE). Enfin, la magnétisation nette regagne lentement le plan longitudinal selon la constante T1. Au bout d'un temps donné TR (temps de répétition), on répète cette succession d'évènements via une nouvelle impulsion de 90° . On comprend alors que le temps d'écho (TE) est étroitement lié au temps de relaxation T2, tandis que le temps de répétition est étroitement lié au temps de relaxation T1. En modulant les paramètres d'écho et de répétition on peut définir le contraste des images obtenues par résonance magnétique. Un TR long permet à la relaxation longitudinale (T1) de se produire complètement dans différents types de tissus, ne permettant pas leur distinction. En revanche, avec un TR plus court, la relaxation longitudinale ne s'effectue complètement que dans les tissus ayant un T1 court, qui apparaîtront donc en hypersignal. Inversement, un TE court ne permet pas à la relaxation transverse de se produire complètement dans les différents tissus, peu importe la durée de leur T2. Un TE prolongé cependant, permet de distinguer les tissus en fonction de la décroissance de leur signal dans le plan transverse. Ainsi, au temps de mesure (temps d'écho), le signal sera plus élevé pour les tissus ayant un T2 plus lent. Par exemple, dans le cas du cerveau, on distingue la matière grise qui apparaît en hyposignal (sombre), de la matière blanche en hypersignal (clair) sur les images dites pondérées en T1 (TR et TE

courts). Inversement, sur les images dites pondérées en T2 (TR et TE longs), on distingue la matière grise en hypersignal, de la matière blanche qui cette fois apparaît en hyposignal.

On rappelle que la fréquence de l'impulsion émise dépend de la fréquence de Larmor, qui dépend elle-même de la force du champ B_0 . Le champ B_0 étant homogène au niveau macroscopique, on ne pourrait donc pas distinguer la magnétisation des protons d'une région à l'autre. Afin que le signal mesuré ait une résolution spatiale, on peut moduler la force du champ magnétique B_0 via l'ajout de champs magnétiques plus faibles. En fonction de la position des protons dans l'espace on crée ainsi des gradients de B_0 selon les axes x, y et z du plan. L'application de tels gradients implique que la fréquence de Larmor des différents spins ainsi que leur phase varient de façon linéaire le long de ces axes. Par exemple, en appliquant un gradient le long de l'axe x, les spins de protons auront une fréquence de Larmor d'autant plus élevée qu'ils seront éloignés. En modulant la bande passante de l'impulsion RF, on peut sélectionner un contingent de spins au sein d'une tranche donnée, plus ou moins épaisse, de la région d'intérêt. Ce premier gradient que l'on appelle gradient de sélection de tranche est appliqué perpendiculairement au plan de la tranche sélectionnée (par exemple le long de l'axe x), concomitamment à la première impulsion de RF de 90°. Par ailleurs, si l'on se place en un point x donnée (autrement dit si on s'intéresse à une colonne particulière au sein de la tranche sélectionnée), on s'aperçoit que l'ensemble des spins correspondants précèdent à la même fréquence et la même phase. La résolution spatiale s'obtient donc également en appliquant un second gradient que l'on appelle le gradient de codage de phase (le long de l'axe y par exemple). Enfin, puisque chaque tranche est déterminée par une bande passante de fréquences, le signal provenant de chacune de ces tranches est donc un signal complexe qui repose sur la sommation d'un ensemble de fréquences uniques. Par conséquent, lorsque ce signal est reçu au niveau de l'antenne, on applique un dernier gradient, dit gradient de lecture (selon l'axe z par exemple), qui rend compte du codage en fréquence de la tranche sélectionnée.

Au temps d'écho, on mesure donc la relaxation dans le plan transversal (le signal FID). Ce signal reçu au niveau de l'antenne est donc ensuite amplifié, puis numérisé. Au sein du scanner, le signal FID en fonction du temps est soumis à la transformation de Fourier afin

d'obtenir un spectre des différentes fréquences qui contribuent au signal provenant d'une tranche donnée (ainsi que leur intensité) en fonction de leur localisation, pour produire une image. Ce 'balayage' fréquentiel se traduit par les différents pixels qui composent l'image résultante.

Supposons qu'on limite ce procédé à l'émission d'une impulsion RF suivie d'un enregistrement du signal au temps TE. À l'aide de la transformation de Fourier, on obtiendrait simplement un spectre des différentes fréquences que l'on pourrait représenter graphiquement en fonction de leur intensité respective. En principe, l'acquisition de données de spectroscopie consiste à réitérer les étapes d'acquisition d'imagerie sans l'application de gradients au cours de l'échantillonnage.

Annexe 3. Décomposition et analyse du signal EEG

Le signal EEG est un reflet direct et en temps réel de l'activité cérébrale. Cependant, la complexité de sa nature implique qu'on le 'traduise' ou le transforme selon des paramètres que l'on peut interpréter. D'un point de vue analytique le traitement du signal EEG repose sur le principe de la transformation/transformation de Fourier (TF).

$$\begin{aligned} \text{A.} \quad & X(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) e^{-j2\pi ft} dt \\ \text{B.} \quad & X(f, \tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) e^{-j2\pi ft} w^*(t - \tau) dt \\ \text{C.} \quad & M(t, f) = W * S = \int_t W \left(\frac{t - a}{b}, f \right) S(t). dt \end{aligned}$$

Figure annexe 3. Expressions mathématiques de la transformée de Fourier et de ses variantes. (A) La formule A représente la définition mathématique de la transformée de Fourier d'un signal. (B) La formule B représente la définition mathématique de la transformée de Fourier locale ou à fenêtre glissante. (C) La formule C représente une expression simplifiée de la formule utilisée dans le cadre de ce projet pour appliquer la transformée en ondelette complexe de Morlet, à notre signal EEG; où : W représente l'ondelette mère (Ondelette de Morlet), S représente le signal EEG, a et b représentent les paramètres de translation et de dilatation de la fenêtre glissante, respectivement.

D'après le théorème de Fourier, tout signal continu et périodique peut être considéré comme la somme (trigonométrique ou exponentielle) de signaux sinusoïdaux de différentes fréquences. D'un point de vue mathématique, si on envisage un signal comme une fonction intégrale (dont les valeurs peuvent être réelles (R) ou complexes), en appliquant la TF, on obtient un spectre fréquentiel des différentes sous fonctions qui en moyenne produisent ce signal. (Figure annexe 3. A). La TF permet donc un balayage ou 'filtre' du signal en fréquence; de la même manière qu'un prisme optique décompose la lumière blanche pour

en isoler les différentes composantes monochromatiques selon leur longueur d'onde respective.

Cependant le spectre produit grâce à la TF ne renseigne pas sur la dynamique temporelle des composantes d'un signal; autrement dit, à quel moment dans le temps voit-on une composante fréquentielle s'ajouter ou au contraire se soustraire du signal?

Dans le cas de l'EEG on cherche à transformer un signal oscillatoire et non stationnaire. Afin de combler la perte de résolution temporelle d'une part on peut appliquer la TF en y ajoutant un facteur temporel que l'on appelle fenêtre glissante (Transformée de Fourier à fenêtre glissante (TFFG)) (Figure annexe 3. B). Dans ce contexte, le signal est conjugué à une fonction temporelle (la fenêtre) que l'on peut translater tout au long du signal afin d'en sélectionner la/les période(s) d'intérêt. Ainsi la transformation nous permet d'obtenir un spectre des différentes composantes du signal en fonction du temps. La fixité de la taille de la fenêtre engendre cependant une dissociation entre résolution temporelle et résolution fréquentielle. Autrement dit, pour des fenêtres plus étroites, la TFFG offre une meilleure résolution temporelle tandis que la résolution fréquentielle diminue. Inversement, avec des fenêtres plus larges, la résolution temporelle diminue mais le spectre fréquentiel est établi avec plus de précision. En adaptant la fenêtre au champ des fréquences (c'est-à-dire en utilisant différentes tailles de fenêtre pour des fréquences fixes), on génère une nouvelle fonction (ondelette mère) qui peut être non seulement translatée mais également dilatée ou compressés à l'échelle des différentes fréquences. La transformation en ondelettes permet ainsi une décomposition fréquentielle du signal en fonction du temps (Analyse temps-fréquence), pour laquelle la résolution temporelle sera d'autant plus haute que les fréquences sont élevées, et inversement. Dans le cadre de notre projet, l'analyse temps-fréquence du signal EEG s'effectue grâce à la transformée en ondelettes complexe de Morlet (Figure annexe 3. C).