

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

INSERM U930 Imagerie et Cerveau

Équipe 2: Neurogénétique et neurométabolomique

THÈSE

présentée par :

Servane ALIROL

Soutenue le : 31 Mars 2015

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie

**Étude génétique du complexe synaptique lié
au récepteur NMDA et caractérisation de
modèles à complexité variable dans l'autisme**

THÈSE dirigée par :

M. LAUMONNIER Frédéric

CR INSERM, HDR, Université François-Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

Mme DEPIENNE Christel

M. REDON Richard

MCU-PH, HDR, Université Pierre et Marie Curie, Paris

DR INSERM, HDR, Université de Nantes

JURY :

Mme BONNET-BRILHAULT Frédérique

M. CAMPION Dominique

Mme DEPIENNE Christel

M. LAUMONNIER Frédéric

M. REDON Richard

Mme TOUTAIN Annick

PU-PH, Université François-Rabelais de Tours

DR, Docteur d'État, Université de Rouen

MCU-PH, HDR, Université Pierre et Marie Curie, Paris

CR INSERM, HDR, Université François-Rabelais de Tours

DR INSERM, HDR, Université de Nantes

PU-PH, Université François-Rabelais de Tours

Aux gens que j'aime
Merci d'avoir toujours été là pour moi

Remerciements

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Merci au **Docteur Christel Depienne**, de l'université Pierre et Marie Curie, et au **Docteur Richard Redon**, de l'université de Nantes, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

Merci également au **Professeur Frédérique Bonnet-Brilhault**, de l'université de Tours, au **Docteur Dominique Champion**, de l'université de Rouen et au **Professeur Annick Toutain**, de l'université de Tours, pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse.

Merci au **Professeur Denis Guilloteau**, directeur de l'unité INSERM U930, pour m'avoir accueillie dans son Unité.

Merci également au **Professeur Christian Andres**, directeur de l'équipe 2 de l'unité INSERM U930, de m'avoir accueillie au sein de son équipe.

Un grand merci au **Docteur Frédéric Laumonnier** pour avoir été mon directeur de thèse. Merci d'avoir eu confiance en moi pour me prendre en thèse. J'ai passé 3 années très agréables, tu es un SUPER CHEF. Merci d'avoir toujours été là quand j'avais une question et de ta disponibilité. J'espère que tu garderas un bon souvenir de ta 1^{ère} thésarde.

Merci aux Docteurs **Patrick Emond**, **Sylvie Mavel**, **Lydie Nadal** et **Patrick Vourc'h** d'être là pour les bons moments mais aussi les sérieux.

Merci aux membres du service de génétique, **Docteur Martine Raynaud**, **Benoit Dessay**, **Marie-Pierre Moizard**, **Nathalie Ronce**, **Sandrine Vonwill**.

Merci aussi à tous les autres, **Cinzia Bocca**, **Céline Brulard**, **David Lever**, **Frédéric Montigny**, **François Wurmser**, **Nicolas**, aux **stagiaires**, d'être là pour mettre de la bonne humeur dans le laboratoire.

Merci aux filles, au **Docteur Sylviane Marouillat**, à **Rose-Anne Thépault** et à **Cathy Antar**. Si vous n'aviez pas été là, ces 3 années n'auraient pas été aussi bien. Les discussions, les pauses café (même si je n'en bois pas), l'aide que vous m'avez apportée pour les expériences et tous les autres moments vont me manquer. Rose-Anne et Cathy vous êtes les reines du séquençage Sanger et Sylviane tu es la reine de la qPCR. Vous allez beaucoup me manquer ! Restez comme vous êtes et continuez à mettre une bonne ambiance dans le laboratoire.

Merci à mes co-bureaux. Tout d'abord à mes anciennes co-bureaux **Audrey Dangoumau** et **Charlotte Veyrat-Durebex**, qui sont nouvellement docteurs, et au **Docteur Marie Amélie Papon** nous avons passé de bons moments ensemble dans le bâtiment Vialle. Je vous souhaite plein de réussite pour le futur ! Ensuite à mes co-bureaux actuels, **Hélène Cuberos**, **Binta Diémé**, **Blandine Madji Hounoum**, **Dévina Ung**, **Franck Patin**, **Antoine Lefevre**, merci pour tous les bons moments qu'on passe ensemble. Je vous souhaite plein de beaux papiers, de belles thèses.

Je souhaite particulièrement remercier **Hélène Cuberos** pour tous les bons moments passés dedans et en dehors du laboratoire. Nos fous rires au labo le soir me manqueront, je me rappellerai toujours de cette soirée pastafarisme où j'ai "perdu les eaux" ! Que de bons moments qui me manqueront même si je sais qu'on se verra toujours après ma thèse. Et le mot de la fin sera Pikeboo.

Merci un grand merci à mes amis tourangeaux :

- **Pierre**, tu es l'un de mes premiers amis que je me suis fait en arrivant ici, et je pense que j'ai passé la grande majorité des meilleurs moments avec toi. Vive les pizzas !

- **Florent**, tu es quelqu'un de super avec qui j'aime bien parler et passer du temps.

- **Romain**, pour les délires passés avec toi, et pour les jeux vidéo (même si je trouve que tu en parles trop quand tu es avec Patrick) !

- La team pattes de chats, **Pauline**, **Nyco** et **Nathan**. Merci pour ces super soirées whist, cinéma et aussi boire un verre !

- **Sylvain**, pour ta bonne humeur, ta joie de vivre, les soirées jeux, et les Kinders...

• Merci à tous **les autres** que je n'ai pas cité car sinon la liste serait trop longue, mais un grand merci à vous aussi.

Merci à **Audrey** et **Jehanne** pour les bons moments quand je rentre sur Paris. Allez Audrey, c'est la dernière ligne droite !!

Un grand merci à ma famille pour avoir toujours été là. Merci à **mes parents** d'avoir cru en moi et de m'avoir laissée aller jusqu'au bout de mes idées en étant toujours là pour que je ne parte pas trop loin. Merci à **ma sœur** pour les voyages, les discussions, et les magasins, heureusement qu'on ne vit pas dans la même ville. Et merci à **mes frères** d'être toujours là. Merci à **ma mamie** d'avoir toujours aussi cru en moi.

Et pour finir merci à mon amour de m'avoir supportée pendant cette dernière année où je sais très bien que je n'ai pas du toujours être cool avec toi.

Résumé

L'autisme est un trouble du développement du système nerveux central défini par des altérations des interactions sociales et de la communication, et par des comportements restreints et répétitifs. Sa prévalence est actuellement évaluée jusqu'à 1% dans la population générale. L'autisme est caractérisé par une grande hétérogénéité sur les plans phénotypiques et génétiques. À ce jour, plus de 300 gènes candidats ont été caractérisés soit par des variations du nombre de copies (CNV) et/ou des variations nucléotidiques (SNV). Leur identification a permis de mettre en évidence une contribution significative de mutation *de novo*, ainsi que l'implication de voies physiopathologiques cibles, en particulier la densité post-synaptique (PSD).

Le travail de cette thèse a consisté à effectuer une étude génétique globale sur environ 100 sujets autistes représentant 88 familles, afin d'évaluer d'une part la contribution de CNV par l'approche de CGH array à haute résolution, et d'autre part, pour identifier des mutations au sein d'une série de 216 gènes codant les protéines du complexe post-synaptique lié au récepteur NMDA (NRC/MASC) grâce à de la capture ciblée d'exons et du séquençage à haut-débit.

Cette approche complémentaire a permis de définir de nouveaux gènes et nouvelles régions candidat(e)s, ou de répliquer leur implication dans l'autisme. Nos résultats démontrent en outre que la présence de modèles génétiques faisant interagir des variants *de novo* et/ou hérités rares sont retrouvés spécifiquement associés à l'autisme et absents dans la déficience intellectuelle.

Mot clés : Autisme, variations du nombre de copies, protéome synaptique, modèle génétique multi-hit, séquençage à haut-débit

Abstract

Autism is a developmental disorder of the central nervous system defined by impairments in social interaction and communication, and by restricted and repetitive behavior. Its prevalence is currently estimated at around 1% in the general population. Autism is characterized by a wide heterogeneity at both phenotypic and genetic level. To date, more than 300 candidate genes were characterized either by copy number variations (CNV) and/or nucleotide variations (SNV). Their identification has highlighted a significant contribution of *de novo* mutations, as well as the involvement of targeted pathophysiological pathways, particularly post-synaptic density (PSD).

The work of this thesis was to perform a global genetic study of about 100 autistic individuals representing 88 families, in order to assess both the contribution of CNV by high-resolution pangenomic CGH array and secondly to identify mutations among 216 genes coding protein from post-synaptic complex bound to NMDA receptor (NRC/MASC), with high-throughput targeted sequencing.

This complementary approach allowed us to identify new candidate genes and regions, or reproduce their involvement in autism. Our results further demonstrate that the presence of genetic model that involve interactions between *de novo* and/or rarely inherited are found specifically associated with autism and absent in the intellectual disability.

Keywords: Autism, copy number variations, post-synaptic proteome, multi-hit genetic model, high-throughput sequencing

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
RESUME	9
ABSTRACT	11
TABLE DES MATIERES	13
LISTE DES TABLEAUX	17
LISTE DES FIGURES.....	19
LISTE DES ANNEXES.....	21
LISTE DES ABRÉVIATIONS	23
INTRODUCTION	25
Chapitre I : L'autisme et les troubles du spectre autistique	27
I.1 : Historique	27
I.2 : Critères de diagnostic et classification.....	28
I.2.1 : De l'autisme infantile aux troubles du spectre autistique	28
I.2.1.1 : Critères de Kanner et Eisenberg	28
I.2.1.2 : Critères de Rutter	28
I.2.1.3 : Critères de Wing : La triade autistique.....	29
I.2.1.4 : DSM-IV et les Troubles Envahissants du Développement.....	29
I.2.1.5 : DSM-5 et Troubles du Spectre Autistique.....	30
I.2.2 : Instruments de diagnostic et d'évaluation clinique	31
I.3 : Epidémiologie	32
I.3.1 : Prévalence	32
I.3.2 : Sexe-Ratio	33
I.4 : Troubles du Spectre Autistique : continuum et hétérogénéité.....	33
I.5 : Troubles et syndromes associés.....	34
I.5.1 : Troubles associés	34
I.5.1.1 : La déficience intellectuelle	34
I.5.1.2 : L'épilepsie.....	35
I.5.1.3 : Les déficiences sensorielles	35
I.5.2 : Syndromes associés.....	35
I.5.2.1 : Le syndrome de l'X fragile	35

I.5.2.2 : La neurofibromatose de type 1 (NF1).....	36
I.5.2.3 : Le syndrome de Bourneville.....	36
I.5.2.4 : Région 7q11.23 et syndrome de Williams-Beuren.....	36
I.5.2.5 : Syndromes d' Angelman et de Prader-Willi : région 15q11-q13.....	37
I.5.2.6 : Syndromes de Smith-Magenis et Potocki-Lupski : région 17p11.2.....	37
I.5.2.7 : Le syndrome délétion 22q11.....	37
Chapitre II : Autisme et trouble du développement du Système Nerveux Central.	39
II.1 : Croissance cérébrale anormale.....	39
II.2 : Données de neuro-anatomie	40
II.2.1 : Le lobe frontal	41
II.2.2 : Le cervelet.....	42
II.2.3 : Le lobe temporal.....	43
II.3 : Autisme et neuro-inflammation.....	44
Chapitre III : Étiologie de l'autisme	47
III. 1 : Les facteurs environnementaux	47
III.2 : Hétérogénéité génétique des Troubles du Spectre Autistique	48
III.2.1 : Arguments en faveur de l'origine génétique	48
III.2.2 : Stratégies et outils d'identification des causes génétiques.....	49
III.2.2.1: Stratégies d'identification.....	49
III.2.2.2 : Outils d'identification	51
Chapitre IV : Mécanismes génétiques et moléculaires dans l'autisme.....	55
IV.1 : Modèles génétiques : Variant Commun – Maladie Fréquente (CVCD) et Variant Rare – Maladie Fréquente (RVCD)	55
IV.2 : Régions chromosomiques et gènes candidats	58
IV.2.1 : Les variations structurales.....	58
IV.2.2 : Les variations nucléotidiques et les insertions/délétions (indels)	66
IV.2.2.1 : Caractérisation de SNV <i>de novo</i>	70
IV.2.2.2 : SNV rares hérités et modèles récessifs	72
IV.3 : Mécanismes et voies biologiques impliqués dans l'autisme.....	72
IV.3.1 : Rôle des facteurs épigénétiques.....	73
VI.3.2 : La voie de signalisation Wnt et mTOR.....	74
VI.3.3 : La voie synaptique	76
Chapitre V : Complexes protéiques synaptiques et autisme.....	79
V.1 : La jonction et l'organisation synaptique	79

V.2 : La synapse glutamatergique	80
V.2.1 : Les récepteurs métabotropiques	80
V.2.2 : Récepteurs ionotropiques	81
V.2.3 : Le protéome post-synaptique.....	82
V.3 : Le complexe NRC/MASC : Cible privilégiée dans l'autisme ?	83
V.4 : Point sur les essais thérapeutiques	90
OBJECTIFS	93
MATERIELS ET METHODES	97
Chapitre I : La population étudiée	99
Chapitre II : Étude pangénomique	101
II.1 : L'Hybridation Génomique Comparative sur puce (CGH array)	101
II.1.1 : Principe	101
II.1.2 : Protocole.....	102
II.1.3 : Analyse des données	102
II.2 : La PCR quantitative en temps réel	104
II.2.1 : Principe	104
II.2.2 : Protocole de quantification	105
II.2.3 : Analyse des données	105
Chapitre III : Étude génétique ciblée	107
III.1 : La capture d'exon ciblée	108
III.1.1 : Principe.....	108
III.1.2 : Protocole	108
III.1.3 : Analyse des reads.....	111
III.1.3.1 : Alignement des reads	111
III.1.3.2 : Contrôle qualité.....	111
III.1.3.3 : Filtration.....	111
III.1.3.4 : Recherche des variations	112
III.1.4 : Analyse des variations	112
III.2 : Le séquençage Sanger	113
III.2.1 : La PCR.....	113
III.2.2 : Le séquençage Sanger	114
RESULTATS	115
Chapitre I : Caractérisation de CNV et SNV candidats	117

I.1 : Implication des CNV	118
I.2 : Identification et analyse de SNV	127
I.3 : Modèle génétique double-hit CNV + SNV	136
I.4 : Article 1.....	139
Chapitre II : Autisme, DI : modèles génétiques distincts.....	149
II.1 : Résumé de l'étude.....	149
II.2 : Article 2	153
DISCUSSION	187
CONCLUSION.....	201
BIBLIOGRAPHIE	205
ANNEXES	241

Liste des tableaux

Tableau 1 : CNV les plus significatifs impliqués dans l'autisme et retrouvés dans d'autres troubles neurodéveloppementaux.....	64
Tableau 2 : Gènes candidats dans les TSA isolés à partir de séquençage d'exomes et de génomes.....	69
Tableau 3 : Gènes impliqués dans la régulation épigénétique et à expression développementale précoce	74
Tableau 4 : Liste des gènes du complexe NRC/MASC	84
Tableau 5 : Liste des 216 gènes inclus dans l'étude génétique.....	107
Tableau 6 : Liste des CNV candidats identifiés au sein de la cohorte de sujets autistes	119
Tableau 7 : Liste des SNV candidats identifiés au sein de la cohorte de sujets autistes.....	129
Tableau 8 : Concordance des sites de prédiction	196
Tableau 9 : Pourcentage de gènes retrouvés impliqués dans l'autisme et une autre pathologie	198

Liste des figures

Figure 1 : Critères spécifiques et éléments associés à prendre en considération lors de la caractérisation des TSA, d'après le DSM-5.....	31
Figure 2 : Croissance neuronale et autisme.....	39
Figure 3 : Régions cérébrales altérées dans l'autisme.	40
Figure 4 : Représentation schématique d'une vue médiale du lobe frontal.....	41
Figure 5 : Représentation anatomique du cervelet.....	42
Figure 6 : Dysfonction du système immunitaire dans les TSA.....	45
Figure 7: Autisme et interaction entre l'environnement, la génétique et l'épigénétique.	47
Figure 8 : Évolution des outils d'identification de facteurs génétiques.....	51
Figure 9 : Évolution du coût de séquençage d'un génome complet.....	54
Figure 10 : Synthèse des modèles génétiques dans les TSA.....	56
Figure 11: Exemples de modes de transmission.	57
Figure 12 : Exemples d'anomalies chromosomiques.....	59
Figure 13 : Mécanismes sous-jacent d'induction des remaniements génomiques et CNV.....	60
Figure 14 : Idiogramme des anomalies chromosomiques les plus fréquentes associées aux TSA.	62
Figure 15 : Fréquence et taille des CNV <i>de novo</i> dans l'autisme.....	65
Figure 16 : Synthèse des gènes impliqués par des mutations <i>de novo</i> dans les TSA.....	71
Figure 17 : Représentation schématique des voies physiopathologiques impliquées dans les TSA.	73
Figure 18 : Implication de la voie de signalisation Wnt et mTOR dans l'autisme.....	75
Figure 19 : Réseau protéique synaptique impliqué dans les maladies neurodéveloppementales.	77
Figure 20: Structure et organisation d'une cellule neuronale et d'une jonction synaptique.....	79
Figure 21 : Représentation des deux types de récepteurs glutamatergiques.....	81
Figure 22 : Protéome post-synaptique de la synapse glutamatergique.....	82
Figure 23: Hiérarchie moléculaire et synaptopathie.....	89
Figure 24 : Représentation schématique de l'objectif de la thèse.....	96
Figure 25 : Schéma d'organisation du projet Autism-NMDA pour l'établissement de la population des sujets autistes.....	100
Figure 26 : Représentation schématique des différentes étapes de la CGH array.....	101
Figure 27 : Protocole d'analyse pour la CGH array.....	103

Figure 28 : Représentation schématique des étapes de la capture d'exon ciblée.....	110
Figure 29 : Protocole d'analyse pour la capture d'exon ciblée	113
Figure 30 : Synthèse des résultats	117
Figure 31: Récurrence de CNV dans le gène <i>GRM5</i>	123
Figure 32: Récurrence des CNV décrits dans DGV : exemple du gène <i>MACROD2</i>	126
Figure 33 : Modèle génétique double-hit <i>MAGI1-DLGAP2</i> dans la famille BAF09.....	136
Figure 34 : Synthèse des résultats de l'analyse génétique	138
Figure 35 : Schéma d'analyse de l'implication des variants rares	189
Figure 36 : Influence des CNV dans le dosage et l'expression des gènes.....	191
Figure 37 : Représentation schématique de différents modèles qui peuvent expliquer l'impact des CNV	194

Liste des annexes

Annexe 1 : Protocole d'analyse ADM-2	243
Annexe 2 : Liste des amorces utilisées en qPCR	245
Annexe 3 : Liste des amorces utilisées en séquençage	249
Annexe 4 : Article publié dans The American Journal of Human Genetics	253

Liste des abréviations

ADI-R : Autism Diagnostic Interview-Revised
ADM-2 : Aberration Detection Method-2
ADN/DNA : Acide DésoxyriboNucléique
ADOS : Autism Diagnostic Observation Schedule
AEP : Auditory Evoked related Potentials
AGP : Autism Genome Project
AMPA : α -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid
ARN (ARNm) : Acide RiboNucléique (ARN messenger)
ATT : Loss of initiative, reduced spontaneous activity
BAC : Chromosome Artificiel Bactérien
BPD : Trouble bipolaire
BSE-R : Behavioral Summarized Evaluation Revised
CARS : Childhood Autism Rating Scale
CCC : Children Communication Checklist
CDC : Disease Control and Prevention
CGH array : Hybridation Génomique Comparative sur puce
CNP : Polymorphisme du nombre de Copies
CNV : Variation du nombre de Copies
Cp : Crossing point
CV : Variant Commun
CVCD : Variant Commun – Maladie Commune
Cy : Cyanine
dbSNP : Single Nucleotide Polymorphism database
DGV : Database of Genomic Variants
DI/ID : Déficience Intellectuelle
DISCO : Diagnostic Interview for Social and Communication Disorders
DSM : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DZ : Jumeaux Dizygote
E/I : Excitation/Inhibition
EEG : ElectroEncéphaloGramme
ELANDv2e : Efficient Large Scale Alignment of Nucleotides Databases
ENCODE : ENCyclopedia Of DNA Elements
EP : Epilepsie
ESP : Exome Sequencing Project
EVS : Exome Variant Server
FISH : Hybridation *In Situ* en Fluorescence
FoSTeS : Fork Stalling and Template Swithcing
FXS : syndrome de l'X fragile
GABA : Acide γ -aminobutyrique
GES : Gestures and mimic expression difficulties
GI : gastro-intestinal
GlyR : glycinergic receptor
GTS : Gyrus Temporal Supérieur
GWAS : Genome-Wide Association Study
HAS : Haute Autorité de Santé
IL : Interleukine
Indels : Insertions/délétions
IRM/MRI : Imagerie par Résonance Magnétique

LCR : Low Copy Repeats
 LTD : Dépression à Long Terme
 LTP : Potentialisation à Long Terme
 MAF : Minor Allele Frequency
 MAGUK : Membrane-Associated GUanylate Kinase
 mGluR : Metabotropic Glutamate Receptor
 MMBIR : Microhomology Mediated Break Induced Replication
 MMN : MisMatch Negativity
 MZ : Jumeaux MonoZygote
 N/A : Not Available
 N/D : Not Determined
 NAHR : Non Allelic Homologous Recombination
 NCBI : National Center for Biotechnology Information
 NF1 : NeuroFibromatose de type 1
 NHEJ : Non Homologous End Joining
 NMDA : N-Méthyle-D-Aspartate
 NRC/MASC : NMDA Receptor Complex / MAGUK-Associated Signalling Complex
 OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man
 PEA : Potentiels Evoqués Auditifs
 PSP : Protéome Post-Synaptique
 PSD : Densité Post-Synaptique
 PCR (qPCR) : Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR quantitative)
 QI/IQ : Quotient Intellectuel
 RBS : Repetitive Behaviour Scale
 RD/DD : Retard de développement
 RV : Variant Rare
 RVCD : Variant Rare – Maladie Commune
 SCZ : Schizophrénie
 SFARI : Simons Foundation Autism Research Initiative
 SI : Système Immunitaire
 SNC : Système Nerveux Central
 SNP : Single Nucleotide polymorphism
 SNV : Single Nucleotide variants
 SOA : Stimulus Onset Asynchrony
 SOC : Social Interaction difficulties
 SRS : Social Responsiveness Scale
 STS : Sillon Temporal Supérieur
 TARP : Transmembrane AMPA Regulatory Proteins
 TDAH/ADHD : Troubles du Déficit de l'Attention avec ou sans Hyperactivité
 TDT : Transmission Disequilibrium Test
 TDM/MDD : Trouble Dépressif Majeur
 TED : Troubles Envahissants du Développement
 TNF- α : Tumor necrosis factor alpha
 TOC/OCD : Trouble Obsessionnel Compulsif
 TS : Syndrome de Tourette
 TSA/ASD : Trouble du Spectre Autistique
 VOI : Does not try to communicate using voice or speech
 WES : Whole-Exome Sequencing

Introduction

Chapitre I : L'autisme et les troubles du spectre autistique

I.1 : Historique

Le terme "autisme", qui vient du grec αὐτός ("soi-même"), a été employé pour la première fois en 1911, par le psychiatre suisse Eugène Bleuler. Il désigne ainsi le retrait social et la perte de contact avec la réalité observés chez des patients schizophrènes (Bleuler, 1911).

En 1943, le pédopsychiatre américain Leo Kanner, reprend le terme autisme indépendamment de la schizophrénie pour qualifier des troubles infantiles. Dans son article, il décrit le cas de 11 enfants (8 garçons et 3 filles) âgés de 2 à 11 ans, et utilise deux termes principaux :

- **Aloneness** (Isolement) : Il observe que les enfants sont "auto-suffisants", "plus heureux lorsqu'ils sont seuls", "agissant comme si les gens n'étaient pas là". L'enfant est dans l'incapacité d'établir des contacts affectifs avec son entourage.
- **Sameness** (Immuabilité) : Il observe que les enfants sont perturbés par le changement et qu'ils ont besoin de rituels.

Kanner insiste sur le fait que l'isolement observé chez les enfants n'est pas le même que celui décrit par Bleuler chez ses patients schizophrènes. En effet, Kanner indique que l'isolement a toujours été présent chez ces enfants, contrairement à la schizophrénie infantile caractérisée par un développement normal suivi d'un retrait social progressif et d'une modification de comportement (Kanner, 1943).

Dans les années 1950, Bruno Bettelheim, psychologue américain d'origine autrichienne, eut une forte influence sur la description de l'autisme en reprenant une constatation de Kanner. Dans son article de 1943, ce dernier avait remarqué une certaine "froideur" des parents et Bettelheim reprit alors le terme de "mère réfrigérateur" pour expliquer l'autisme chez les enfants. En effet ces derniers recevraient un message de leurs parents, essentiellement provenant de leur mère, selon lequel tout le monde serait mieux sans eux (Bettelheim, 1967; Hochmann, 2009). L'autisme ne serait donc pas "inné" comme le supposait Kanner, mais serait la conséquence d'un déficit d'interactions et d'échanges entre l'enfant et ses parents.

Indépendamment des travaux de Kanner, le psychiatre autrichien Hans Asperger utilisa, en 1944, l'expression "psychopathie autistique" pour décrire le comportement de 4 garçons âgés de 6 à 11 ans. Ces enfants présentaient un manque d'empathie, une forte préoccupation vers des intérêts spéciaux et des mouvements maladroits (Asperger, 1944, traduit de l'allemand dans Frith, 1991). Les travaux d'Asperger étaient assez isolés, et la reprise de ses

descriptions par la psychiatre Lorna Wing en 1981 a permis une meilleure reconnaissance de son travail pionnier. Elle élabore ainsi une définition du "syndrome d'Asperger" à partir des 4 patients du Dr Asperger et de 34 autres cas provenant de ses propres observations cliniques (Wing, 1981).

I.2 : Critères de diagnostic et classification

I.2.1 : De l'autisme infantile aux troubles du spectre autistique

I.2.1.1 : Critères de Kanner et Eisenberg

En 1956, Léo Kanner et Leon Eisenberg publient un nouvel article établissant des critères diagnostiques de l'autisme (Kanner et Eisenberg, 1956). En effet l'article princeps de 1943 présentait seulement une description exhaustive de ses patients sans pour autant donner de "vrais" éléments de diagnostic.

Kanner et Eisenberg proposent alors 3 composantes pour définir l'autisme :

- Un fort isolement sur soi-même.
- Un comportement répétitif et ritualisé.
- Une manifestation dans les deux premières années de vie.

I.2.1.2 : Critères de Rutter

En 1978, Michael Rutter, premier professeur de psychiatrie de l'enfant au Royaume Uni, a publié un article pour proposer des critères de diagnostic de l'autisme mieux définis (Rutter, 1978). Effectivement, depuis la première publication de Kanner en 1943, chaque étude ultérieure utilisait ses propres critères d'intérêt : pour exemple en 1969, Rendle-Short publia une liste de 7 critères différents de ceux de Kanner (Rendle-Short, 1969).

Rutter se posa alors la question suivante "Pour quelle liste de critères allons-nous appliquer le terme autisme?" et non la question "Qu'est-ce que l'autisme ?". De ce postulat, il a alors cherché chez les autistes des comportements qui leur étaient spécifiques.

Son étude lui permit de proposer 4 critères :

- Un défaut profond et général pour développer des relations sociales.
- Un langage retardé, avec écholalie et inversion pronominale.
- Un besoin d'immuabilité, qui se traduit par des comportements stéréotypés et une résistance au changement.
- Une apparition de la maladie avant l'âge de 30 mois.

I.2.1.3 : Critères de Wing : La triade autistique

En 1983, la psychiatre Lorna Wing, proposa qu'il existe une continuité entre les caractéristiques établies par Kanner, en 1943, et celles faites par Asperger, en 1944 et définit aussi 3 critères de référence qui sont utilisés dans le DSM-IV et qui constituent la triade autistique :

- Trouble de la communication.
- Altération des interactions sociales.
- Comportements stéréotypés et répétitifs (Burgoine et Wing, 1983).

I.2.1.4 : DSM-IV et les Troubles Envahissants du Développement

Jusqu'en 2013, la triade autistique de Wing était la référence pour identifier et définir l'autisme et les Troubles Envahissants du Développement (TED). Cette dernière catégorie est apparue en 1994 au passage du DSM-III au DSM-IV. Le DSM, ou *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, est le manuel établi par l'Association Américaine de Psychiatrie qui constitue la référence internationale en matière de diagnostic des troubles mentaux.

Dans le DSM-IV-TR (4th Edition – Text Revised) (American Psychiatric Association, 2000), l'autisme est classé dans la catégorie des TED, qui se "caractérisent par des déficits sévères et une altération envahissante de plusieurs secteurs du développement [...] ou par la présence de comportements, d'intérêts et d'activités stéréotypées".

Les TED comprennent cinq troubles qui sont les suivants:

- Le trouble autistique, qui répond aux critères de Wing préalablement énoncés.
- Le syndrome d'Asperger, qui se différencie de l'autisme par l'absence d'altérations significatives à l'acquisition du langage.
- Le trouble désintégréatif de l'enfance, qui se caractérise par un développement apparemment normal d'au moins 2 années, suivi d'une régression marquée dans plusieurs domaines du fonctionnement. Après cette régression, des symptômes autistiques apparaissent chez les patients.
- Le Syndrome de Rett, qui se caractérise par un développement normal jusqu'à l'âge de 6 à 18 mois, suivi d'une régression sur le plan moteur et cognitif et de l'apparition de stéréotypies. L'étiologie génétique est déjà connue et liée à des anomalies dans le gène *MECP2* (Methyl CpG Binding Protein 2). Le syndrome de Rett touche exclusivement les filles.

- Le TED non spécifié, qui s'applique aux patients caractérisés par une "altération sévère et envahissante du développement de l'interaction sociale réciproque associée à une altération des capacités de communication verbale ou non verbale, ou à la présence de comportements, intérêts et activités stéréotypés, en l'absence des critères complets d'un TED spécifique".

I.2.1.5 : DSM-5 et Troubles du Spectre Autistique

La 5^{ème} édition du DSM, ou DSM-5 a été publiée en Mai 2013 (American Psychiatric Association, 2013). Depuis Kanner et la définition de la triade autistique de Wing, les travaux cliniques sur l'autisme ont permis de mieux décrire et définir cette pathologie, qui n'est plus dorénavant rattachée à la catégorie des TED mais à celle des "Troubles du Spectre Autistique" (TSA) ou "Autism Spectrum Disorders" (ASD).

Le terme TSA a été proposé par Doris Allen en 1988, et été utilisé de plus en plus dans la pratique clinique car il permet de refléter l'hétérogénéité des symptômes (Allen, 1988). Dans le DSM-5, les TSA regroupent en un seul diagnostic les troubles précédemment présentés, excepté le syndrome de Rett.

Au cours des deux dernières décennies, l'augmentation de l'accès des patients par les cliniciens et chercheurs a permis de déterminer que dans de nombreux cas, les symptômes sont mieux représentés dans un modèle à deux domaines. Ces observations ont conduit à n'inclure que deux domaines dans le DSM-5 pour définit les TSA :

- Troubles des interactions sociales et de la communication (Dans le DSM-IV, ces deux éléments étaient évalués séparément et désormais considérés comme un même aspect de la maladie) ;
- Intérêts et comportement restreints et répétitifs.

Le DSM-5 encourage en outre l'évaluation précise des troubles associés (co-morbidité) et leur prise en compte dans l'établissement du diagnostic, permettant une classification plus précise comme le montre le diagramme (Figure 1) proposé par Grzadzinski et collaborateurs (Grzadzinski *et al.*, 2013).

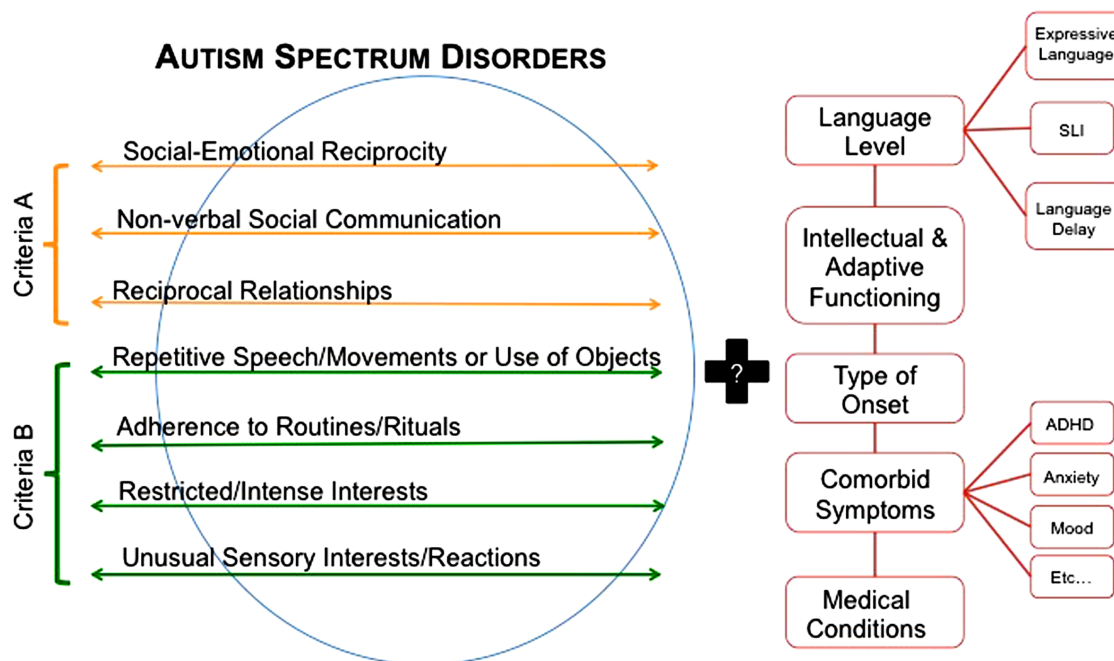


Figure 1 : Critères spécifiques et éléments associés à prendre en considération lors de la caractérisation des TSA, d'après le DSM-5.

Sur la partie à gauche, les 2 critères spécifiques des TSA sont indiqués (Criteria A, B). Sur la partie à droite, les conditions et co-morbidités associées sont décrites. Tiré de Grzadzinski *et al.*, 2013.

1.2.2 : Instruments de diagnostic et d'évaluation clinique

À ce jour il n'existe pas d'examen biologique ou de bio-marqueur spécifique permettant le dépistage précoce de l'autisme. Le diagnostic se fonde principalement sur une double approche basée sur l'utilisation de questionnaires d'évaluation :

- L'Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R), qui est basé sur un entretien avec les parents. Les questions posées permettent de déterminer le niveau de développement, les types de comportements et les degrés d'interactions de l'enfant (Lord *et al.*, 1994).
- L'Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS), qui est un entretien avec l'enfant basé sur une série de tâches structurées ou semi-structurées qui font intervenir des interactions sociales entre l'examineur et le patient. Chaque tâche est adaptée aux capacités et à l'âge du patient. L'entretien permet donc d'évaluer l'aptitude de l'enfant à créer des liens sociaux, mais aussi de voir les différentes manifestations du syndrome autistique (Lord *et al.*, 1989).

Il existe une nouvelle version de l'ADOS, l'ADOS-2, incluant un module supplémentaire qui facilite l'évaluation des enfants âgés de 12 à 30 mois (<http://www.wpspublish.com/store/p/2648/autism-diagnostic-observation-schedule-second-edition-ados-2>).

D'autres instruments permettent d'évaluer tous les critères autistiques dans leur ensemble, ou sont plus focalisés sur un critère autistique donné :

- La Childhood Autism Rating Scale (CARS), qui est une échelle composée de 15 items qui permet de proposer un degré de sévérité pour l'autisme, allant de non-autiste à légèrement autiste, autiste modéré ou sévèrement autiste. (Schopler *et al.*, 1980)
- La Diagnostic Interview for Social and Communication Disorders (DISCO), est une échelle dimensionnelle qui a pour but de faciliter la compréhension du développement et du comportement du patient (Wing *et al.*, 2002).
- La Children Communication Checklist (CCC), qui évalue les aspects de la communication (Bishop, 1998).
- La Social Responsiveness Scale (SRS), qui évalue les comportements sociaux (Constantino *et al.*, 2000).
- La Behavioral Summarized Evaluation Revised (BSE-R), développée à Tours dans notre unité de recherche, qui évalue les comportements autistiques et qui est particulièrement adaptée pour les enfants présentant un comportement atypique (Barthélémy *et al.*, 1997).
- La Repetitive Behaviour Scale (RBS), qui évalue les comportements répétitifs (Bodfish *et al.*, 2000).

I.3 : Epidémiologie

I.3.1 : Prévalence

La première étude d'épidémiologie sur l'autisme infantile a été réalisée par Victor Lotter, en 1966 sur toute la population âgée de 8 à 10 ans (78 000) dans le comté de Middlesex au Royaume-Uni. Il observa alors une prévalence de 4,5 pour 10 000 (Lotter, 1966).

Depuis cette première étude, celle-ci n'a cessé d'augmenter. Par exemple en 2009, le Pr Baron-Cohen a décrit une prévalence de 1/66 au Royaume-Uni (Baron-Cohen *et al.*, 2009), en 2010, une étude coréenne alla même jusqu'à 1/38 de personnes atteintes de TSA sur la population de la Corée du Sud (Kim *et al.*, 2010) et de 1/68 par l'organisation Centers for Disease Control and Prevention (CDC) aux États Unis (Centers for Disease Control and Prevention, 2014).

En 2012 la Haute Autorité de Santé (HAS) a déterminé une prévalence de 1/150 en France (Prado, 2012).

En 2009, Eric Fombonne, estime que la prévalence de l'autisme est de 22 pour 10 000 (Fombonne, 2009). Cinq ans plus tard le National Institute of Mental Health, estime que la prévalence s'élève à 1 naissance sur 100.

En conclusion, une augmentation constante de la prévalence de l'autisme dans la population générale est observée, et pourrait être expliquée par l'évolution des critères de diagnostic, ou bien par une analyse plus fine de la variabilité phénotypique et une meilleure connaissance des troubles.

I.3.2 : Sexe-Ratio

Contrairement à la prévalence, le sexe-ratio a peu changé depuis les premières études, avec une moyenne de 3 à 4 garçons pour une fille. Celui-ci varie néanmoins en fonction de l'association d'une déficience intellectuelle (DI), avec une proportion de 6 garçons pour 1 fille en l'absence de DI, et de 2 garçons pour 1 fille ayant une DI modérée à sévère (Fombonne, 2003A).

Une récurrence est également observée dans les familles ayant déjà un enfant autiste, de l'ordre de 3 à 10%. De plus, il a été noté un biais de sexe dans le risque de récurrence, de 7% ou 4% si le premier enfant atteint est respectivement une fille ou un garçon. En revanche, ce biais n'est plus présent dans les familles multiplexes (au moins 2 sujets autistes d'une même fratrie), et le risque de récurrence est de l'ordre de 33 à 50% pour les futures grossesses (Schaefer *et al.*, 2013).

I.4 : Troubles du Spectre Autistique : continuum et hétérogénéité

La notion de spectre autistique désormais intégrée dans le DSM-5 repose sur la présence d'un continuum dans le degré de sévérité des atteintes ou symptômes présents dans chacun des 2 domaines définissant les TSA, et qui est retrouvé depuis la population générale jusqu'aux sujets autistes. En effet, des traits autistiques sont régulièrement observés chez des individus considérés sains (légères difficultés dans les interactions sociales, rigidités comportementales), en particulier davantage chez les parents d'enfants autistes que chez les parents d'enfants non autistes (neurotypiques) (Kanner, 1943; Wheelwright *et al.*, 2010). Le Couteur et collaborateurs ont employé le terme de phénotype élargi, ou "Broad Autism Phenotype", pour spécifier ces particularités (Le Couteur *et al.*, 1996).

Les TSA constituent un ensemble de pathologies très hétérogènes sur le plan clinique et sont retrouvés fréquemment associés à différents troubles, ou co-morbidités. Ils regroupent des situations cliniques variables, associées à des handicaps hétérogènes, allant du profil clinique classique à une expression partielle des troubles : Le degré de sévérité et l'âge d'apparition des symptômes, et le niveau de fonctionnement intellectuel varient d'un sujet autiste à l'autre. Ainsi, chaque sujet autiste peut présenter une combinaison unique de signes et de symptômes (autant de formes d'autisme que de personnes autistes).

Ces variations dans les manifestations cliniques des TSA indiquent ainsi une forte hétérogénéité soulignant la présence d'un vaste spectre (ou continuum) phénotypique. En outre, les capacités cognitives sont particulièrement variables chez les sujets autistes, pouvant varier d'une intelligence supérieure à une déficience profonde, et avec la présence de co-morbidités psychiatriques.

I.5 : Troubles et syndromes associés

I.5.1 : Troubles associés

I.5.1.1 : La déficience intellectuelle

La déficience intellectuelle (DI) est définie par un score de Quotient Intellectuel (QI) inférieur à 70. Elle se caractérise par l'existence de déficits ou d'altérations du fonctionnement adaptatif.

Selon le DSM-5, il existe 4 catégories de DI selon la sévérité :

- La DI légère ($50-55 \leq \text{QI} < 70$). Les patients présentent des difficultés d'apprentissage scolaire mais peuvent avoir un travail à l'âge adulte.
- La DI modérée ($35-40 \leq \text{QI} < 50-55$). Les patients vont avoir des retards de développement. Cependant, ils pourront quand même acquérir une certaine autonomie, et pourront avoir un travail avec un soutien adapté.
- La DI sévère ($20-25 \leq \text{QI} < 35-40$). Les patients n'acquièrent presque pas d'autonomie.
- La DI profonde ($\text{QI} < 20-25$). Les patients présentent de grandes difficultés de mobilité et de communication.

La DI est le trouble le plus souvent associé à l'autisme. Certaines études indiquent qu'environ 30% des autistes ne présentent pas de DI, 30% ont une DI légère à modéré, et 40% ont une DI sévère à profonde (Fombonne, 2003B; Chakrabarti et Fombonne, 2005).

I.5.1.2 : L'épilepsie

L'épilepsie est un groupe de troubles neurologiques à long terme caractérisés par des crises épileptiques. Ces crises sont des épisodes qui peuvent varier de bref et presque indétectable à une longue période de vigoureuse agitation. Elles se caractérisent par une altération fonctionnelle transitoire au sein d'une population de neurones due à une décharge épileptique.

La prévalence de l'épilepsie dans la population générale serait de 0,5 à 1%, alors qu'elle serait de 20 à 25% dans les TED, et de 5 à 40% dans l'autisme (Hauser *et al.*, 1991; Canitano, 2007; Fombonne, 2003B).

I.5.1.3 : Les déficiences sensorielles

Il est observé que des individus avec TSA présentent des déficiences sensorielles. Effectivement, il a été évalué une prévalence de déficience visuelle jusqu'à 11,1% des sujets autistes (Fombonne, 2003B). Au niveau de la déficience auditive, la prévalence est évaluée à 9,5% (Rosenhal *et al.*, 1991).

I.5.2 : Syndromes associés

I.5.2.1 : Le syndrome de l'X fragile

Le syndrome de l'X fragile (FXS) est la cause la plus fréquente de DI héritée. Les sujets atteints peuvent présenter des TSA, une hyperactivité, des troubles de la coordination motrice, des anomalies de croissance, des dysmorphies cranio-faciales (Bernardet et Crusio, 2006).

Le syndrome, lié au chromosome X, est causé par l'expansion d'un triplet nucléotidique CGG affectant le gène *FRM1* (Fragile X mental retardation 1) en position Xq27.3. Cette expansion empêche l'expression de la protéine FMRP (Fragile X mental retardation protein), dont la fonction principale est de se lier aux ARNm porteurs de séquences spécifiques (structures G-quadruplex) pour les transporter vers les terminaisons post-synaptiques et d'agir comme régulateur négatif de la traduction en réponse à un stimuli par les récepteurs métabotropiques au glutamate 1 et 5 (mGluR1 et mGluR5) (Bassell et Gross, 2008; Bhakar *et al.*, 2012).

Le syndrome FXS touche un garçon sur 5 000 et une fille sur 8 000, et constitue la cause monogénique la plus fréquente dans l'autisme. En outre, il serait impliqué chez 2 à 6% de la population autistique (Hagerman *et al.*, 2010).

I.5.2.2 : La neurofibromatose de type 1 (NF1)

La neurofibromatose de type 1 est une neuro-ectodermose autosomique dominante, caractérisée par des anomalies dermatologiques, des tumeurs du système nerveux central et des difficultés d'apprentissage. La maladie est due à des mutations dans le gène suppresseur de tumeur *NF1*, en position 17q11.2, qui code la neurofibromine.

La prévalence de la maladie est évaluée entre 1/3 000 et 1/4 000. Sa prévalence au sein de la population autistique varie entre 0 et 1,4% (Fombonne, 2003B), mais les patients ont entre 100 et 190 fois plus de risque que la population générale d'exprimer la maladie (Zafeiriou *et al.*, 2007).

I.5.2.3 : Le syndrome de Bourneville

La Sclérose tubéreuse de Bourneville est une maladie autosomique dominante, qui concerne une naissance sur 6 000. Elle se manifeste par le développement de tumeurs bénignes, ou hamartomes, dans de nombreux organes.

Environ 85% des enfants et adolescents atteints ont des complications du système nerveux central, incluant l'épilepsie, des troubles cognitifs, des problèmes de comportement et de l'autisme.

La maladie est due à des mutations dans un des deux gènes suivants, *TSC1* en position 9q34 et *TSC2* en position 16p13 qui codent respectivement l'hamatine et la tubérine (Curatolo *et al.*, 2008).

I.5.2.4 : Région 7q11.23 et syndrome de Williams-Beuren

Le syndrome de Williams Beuren dont le phénotype est caractérisé par une dysmorphie faciale typique, des défauts cardiaques fréquents, une petite taille, une hypercalcémie infantile et un profil cognitif spécifique (hypersociabilité et communication exacerbées), est lié à la présence chez les sujets atteints, d'une délétion localisée dans la région 7q11.23.

En revanche la duplication de cette même région est associée à un autre phénotype un désordre développemental multi-systémique avec des manifestations variables, le plus souvent un retard sévère de langage, des anomalies crano-faciales, et une incidence accrue d'anomalie congénitale telles que des malformation cardiaques, des hernies diaphragmatiques et une cryptorchidie. De nombreux patients présentent des défauts cognitifs allant de la DI aux TSA, bien que certains ont des capacités cognitives normales (Van der Aa *et al.*, 2009). Une

étude génétique assez récente a par ailleurs indiqué que les duplications *de novo* de cette région semblent fortement associées à l'autisme (Sanders *et al.*, 2011).

I.5.2.5 : Syndromes d' Angelman et de Prader-Willi : région 15q11-q13

Ces 2 syndromes sont dus à des modifications du même locus, 15q11-q13, qui est une région soumise à empreinte parentale.

Le syndrome d'Angelman, dont la prévalence est de 1/12 000, est un trouble sévère du développement caractérisé par un retard du développement, une DI, des troubles du langage, des problèmes d'équilibre et de motricité et des TSA chez la plupart des patients (Peters *et al.*, 2004).

Ce syndrome est associé à des délétions de la région 15q11-q13 d'origine maternelle, ou lorsqu'il y a des altérations dans la copie maternelle du gène *UBE3A* codant l'ubiquitine ligase E3A.

Le syndrome de Prader-Willi est caractérisé par des altérations au niveau du chromosome paternel. Avec une prévalence à 1/29 500, ce syndrome est caractérisé par une hypotonie infantile, un retard de développement et de la DI, et un TSA chez certains sujets (Veltman *et al.*, 2005).

I.5.2.6 : Syndromes de Smith-Magenis et Potocki-Lupski : région 17p11.2

Il s'agit de deux syndromes réciproques, respectivement dus à une délétion et une duplication de la région 17p11.2

La délétion est associée au syndrome de Smith-Magenis, caractérisé par une DI variable, des troubles du sommeil, des anomalies crano-faciales et squelettiques, des troubles du comportement, un retard moteur et de langage sans trait autistique (De Leersnyder, 2013).

La duplication de cette région est associée au syndrome de Potocki-Lupski caractérisé par une hypotonie, un retard de croissance, de la DI, des TED et des anomalies congénitales (Shchelochkov *et al.* 2010). Certains patients présentent un diagnostic de TSA (Potocki *et al.*, 2000) ou des traits autistiques (Potocki *et al.*, 2007).

I.5.2.7 : Le syndrome délétion 22q11

Ce syndrome dont la prévalence est de 1/4 000 est une association de deux maladies que l'on considérait différentes auparavant, le syndrome de DiGeorge et le syndrome

Chapitre I : L'autisme et les troubles du spectre autistique

vélocardiofacial. Aujourd'hui, il est admis que ces deux syndromes représentent deux formes d'expression clinique d'une même entité à différents âges.

Les patients présentent des difficultés d'apprentissage, des anomalies cardiaques, des dysmorphies faciales, une hypocalcémie, des troubles immunitaires dus à une absence ou une hypoplasie du thymus. Dans une étude sur 41 enfants présentant ce syndrome, il a été observé que 17 d'entre eux (41%) répondaient aux critères de l'autisme selon le DSM-IV (Antshel *et al.*, 2007).

La région 22q11 contient plusieurs gènes. En 2003, Yagi et collaborateurs ont identifié des mutations dans le gène *TBX1* chez 3 patients ayant un phénotype de délétion 22q11 sans pour autant avoir la délétion. L'haplo-insuffisance du gène *TBX1*, qui code un facteur de transcription, semble ainsi déterminant dans la majorité des symptômes (Yagi *et al.*, 2003).

Chapitre II : Autisme et trouble du développement du Système Nerveux Central

II.1 : Croissance cérébrale anormale

Il a été observé que la macrocéphalie, définie par un périmètre crânien supérieur au périmètre moyen plus deux déviations standard, est un des traits physiques le plus retrouvé dans l'autisme. Kanner avait décrit une macrocéphalie chez 5 de ses 11 patients. Par la suite plusieurs études ont mis en évidence qu'entre 14 et 34% d'enfants autistes présentent une macrocéphalie. Inversement, certaines de ces études ont également noté une microcéphalie chez 3% des sujets autistes, et généralement associée à la DI (Dementieva *et al.*, 2005; Courchesne *et al.*, 2003; Stevenson *et al.*, 1997).

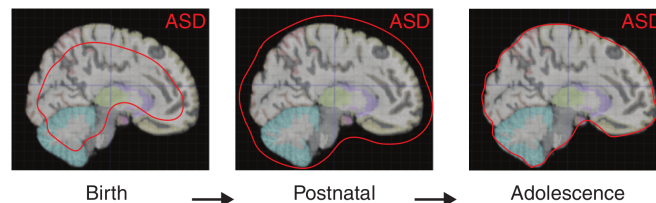


Figure 2 : Croissance neuronale et autisme

Représentation schématique de la croissance anormale du cerveau chez les patients avec TSA (en rouge) par rapport à un cerveau de morphologie normale (Tiré de Berg & Geschwind, 2012)

En 2003, Courchesne propose un modèle de dynamique neurodéveloppementale dans l'autisme comportant quatre phases de croissance du cerveau (Figure 2) :

- La première phase consiste en un léger sous-développement du cerveau à la naissance. En effet, il observe un périmètre crânien plus petit chez les enfants autistes.
- La deuxième phase est une phase de croissance, qui implique une prolifération rapide et importante entre 1-2 mois et 6-14 mois.
- La troisième phase est longue et semble durer entre 2 et 4 ans. Lors de cette phase, on observe un ralentissement global de la croissance du cerveau, qui atteint quasiment son volume maximum chez les patients autistes entre 4 et 5 ans
- La quatrième phase consiste en un déclin progressif de la taille du cerveau à la fin de l'enfance et jusqu'à l'âge adulte (Courchesne *et al.*, 2003).

Ces augmentations pourraient résulter d'une anomalie dans l'un des trois processus suivants : une augmentation de la neurogenèse, une diminution de la mort neuronale, et/ou une augmentation des tissus non neuronaux du cerveau tels que les vaisseaux sanguins ou la glie (Verhoeven *et al.* 2010).

II.2 : Données de neuro-anatomie

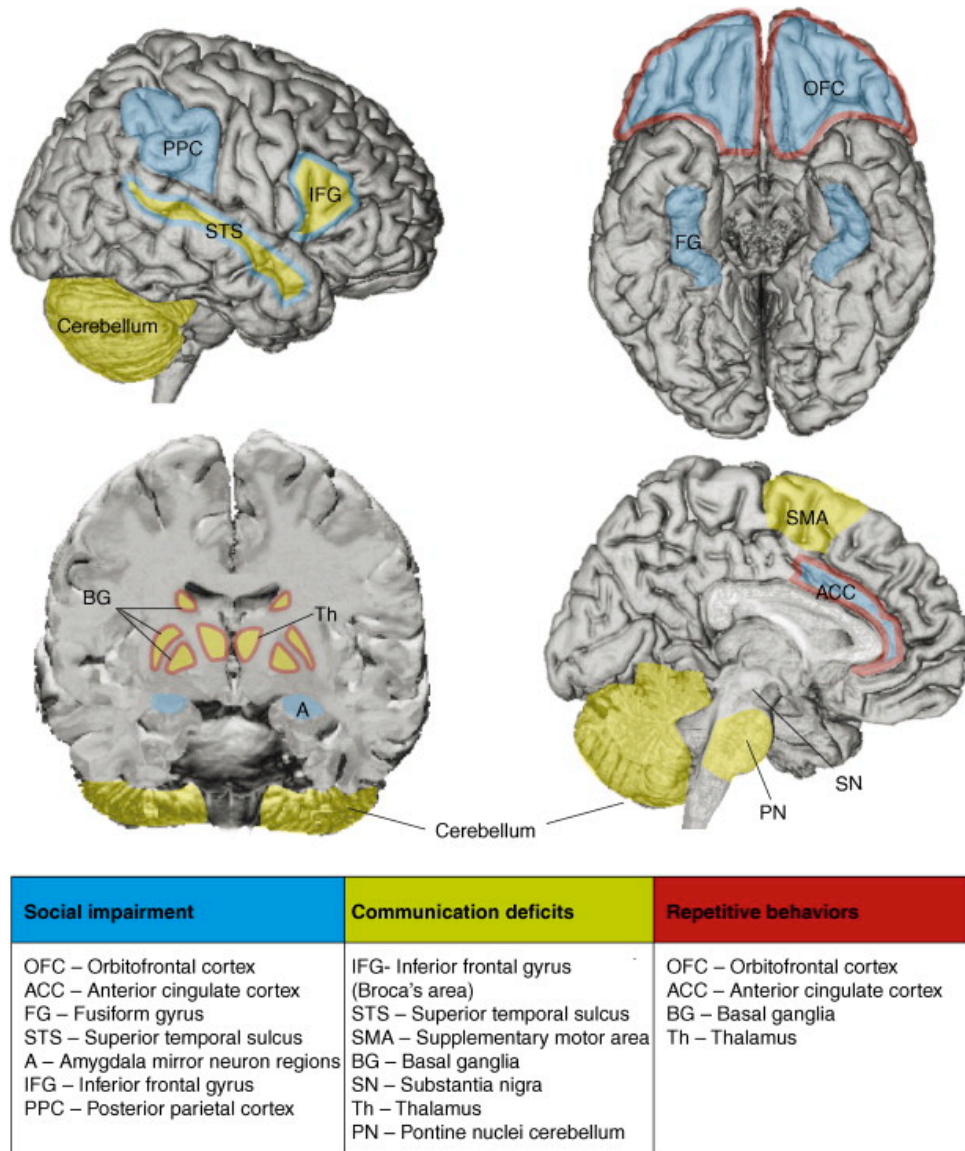


Figure 3 : Régions cérébrales altérées dans l'autisme.

Représentation des différentes régions du cerveau impliquées dans les trois principaux critères de sélection de l'autisme selon le DSM-IV-TR (Amaral *et al.*, 2008).

Des études *post-mortem* et d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), ont mis en évidence la présence d'anomalies localisées dans le lobe frontal, l'amygdale et le cervelet .

Il est intéressant de constater qu'au sein de ces trois zones, des régions forment des systèmes neuronaux présumés impliqués dans les fonctions les plus touchées dans l'autisme (Figure 3). Certaines régions intégrées dans les lobes frontaux sont impliquées dans les trois critères, contrairement à l'amygdale et au cervelet qui sont impliqués respectivement dans les altérations du fonctionnement sociale et dans les troubles de la communication (Amaral *et al.*, 2008).

II.2.1 : Le lobe frontal

Le lobe frontal, un des quatre lobes du cortex cérébral, est subdivisé en trois grandes structures :

- Le cortex moteur, qui désigne l'ensemble des aires du cortex cérébral qui participent à la planification, au contrôle et à l'exécution des mouvements volontaires des muscles.
- Le cortex pré-moteur, qui a pour rôle de planifier et d'organiser le mouvement.
- Le cortex préfrontal, qui est le siège des différentes fonctions cognitives dites supérieures, comme le langage, les fonctions exécutives (Figure 4).

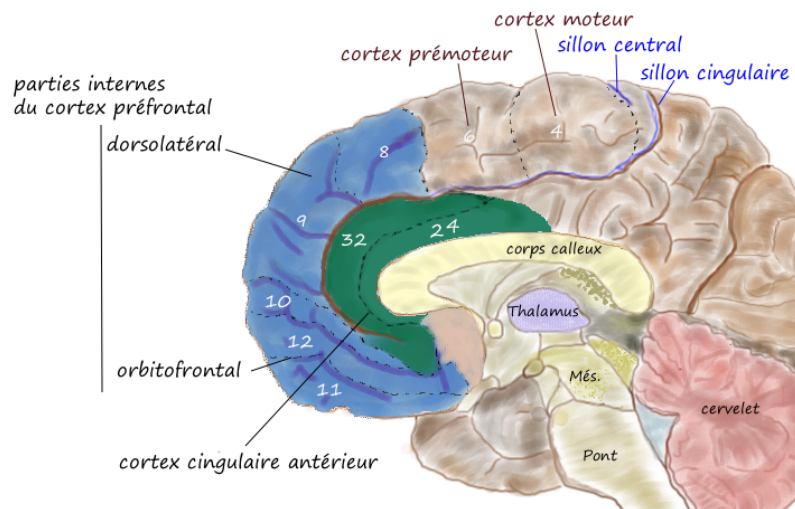


Figure 4 : Représentation schématique d'une vue médiale du lobe frontal

Représentation des trois structures du lobe frontal. Le cortex préfrontal présente trois parties internes, qui sont la partie dorsolatérale (8-9-10), la partie orbitofrontale (11-12-32) et la partie mésiale ou cingulaire antérieure (24-32) (Roger, 2003).

Source : http://fr.wikipedia.org/wiki/Cortex_pr%C3%A9frontal#Subdivisions

En 2011, Courchesne a montré dans une étude *post-mortem* effectuée à partir de tissu cérébral préfrontal de 7 autistes et 6 contrôles âgés entre 2 et 16 ans, qu'il y avait une augmentation du nombre de neurones dans le cortex préfrontal. Cette augmentation n'est pas uniforme, et paraît plus importante au niveau dorsolatéral, par rapport à la partie mésiale.

Sachant que les neurones corticaux ne sont pas générés après la naissance, cette augmentation pathologique du nombre de neurones chez les enfants autistes suggère une origine prénatale. Cela pourrait être dû à un problème de prolifération incontrôlée, et/ou une apoptose réduite (Courchesne, 2011).

En 2014, Stoner a examiné l'architecture néocorticale du cortex préfrontal et de deux autres régions, à partir de tissus *post-mortem* de 11 autistes et 11 contrôles âgés entre 2 et 15 ans. L'analyse de la structure néocorticale par l'hybridation d'ARN *in situ* d'un panel de marqueurs spécifiques des couches et de type cellulaire a révélé des anomalies discrètes de

l'architecture laminaire corticale chez 10 patients et chez 1 contrôle. En revanche, il n'y avait pas de modification concernant les cellules gliales par rapport au groupe contrôle.

Cette observation suggère un nouveau mécanisme pathologique dans l'autisme, mais dont l'origine conduisant à ces défauts d'architecture n'est pas encore déterminée. Ces altérations pourraient être dues à un défaut de migration survenu suite à l'échec des cellules à atteindre leur destination finale et de l'accumulation de ces cellules dans les régions voisines (Stoner *et al.*, 2014).

II.2.2 : Le cervelet

Appelé "le petit cerveau" le cervelet représente 10% du volume total du cerveau et contient le plus grand nombre de neurones. Le cervelet est à la croisée des chemins entre les systèmes sensoriels et moteurs et est essentiel pour la coordination des communications entre les deux systèmes ; il a longtemps été impliqué dans l'apprentissage de la motricité et plus récemment dans la cognition et l'émotion. Morphologiquement, le cervelet est subdivisé en un vermis central flanqué de deux hémisphères. Le cervelet est fortement plié en une série de folia parallèles et subdivisé en trois lobes et dix lobules (I-X). Chez l'homme, le lobule VII est subdivisé en trois avec le Crus I, le Crus II et VIIB, et le lobule VIII est divisé en deux avec VIIIA et VIIIB (Figure 5; Becker et Stoodley, 2013).

Lors d'étude *post mortem* de cerveaux de patients autistes, il est observé que la plupart des individus présentent des anomalies du cervelet. L'anomalie la plus retrouvée est une perte des cellules de Purkinje (Palmen *et al.*, 2004), une perte de densité (Palmen *et al.*, 2004) et une réduction de la taille de ses cellules (Fatemi *et al.*, 2002).

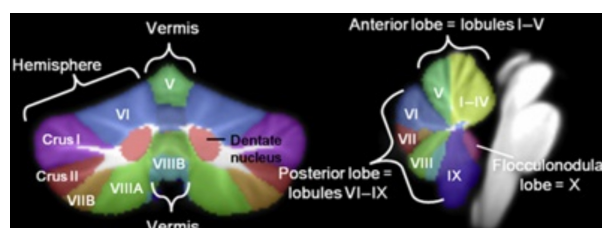


Figure 5 : Représentation anatomique du cervelet

Illustration des différents lobes et lobules du cervelet (Becker et Stoodley, 2013).

Diverses études d'imagerie ont rapporté une hypoplasie cérébelleuse chez les autistes. En 2014, Stoodley, observe une diminution significative de la substance grise dans la ligne médiane IX, le Crus I droit, et le lobule VIIIB gauche et une augmentation de substance grise

dans les lobules VIIB et dans le noyau dentelé droit. D'autres études rapportent une augmentation de la substance grise dans le lobule VI (Stoodley, 2014).

Ces différences structurelles semblent en corrélation avec le diagnostic d'autisme. L'augmentation de la substance grise dans le lobule VI est corrélée avec le plus mauvais score au niveau de la communication sociale. La réduction de la matière grise dans le Crus I est associée à une augmentation des comportements répétitifs et stéréotypés (Rojas *et al.*, 2006).

II.2.3 : Le lobe temporal

Le lobe temporal est une zone importante pour de nombreuses fonctions cognitives, comme le langage, la mémoire et la vision des formes complexes. Le lobe temporal inclut deux structures profondes : l'hippocampe et l'amygdale.

Des anomalies des lobes temporaux ont été liées à l'autisme, en particulier dans l'organisation des mini-colonnes, accompagnées par une altération de la densité neuronale au niveau de la couche III du gyrus fusiforme, qui est une région impliquée dans la reconnaissance faciale et des mots (Chance, 2014).

Deux études ont mis en évidence une diminution bilatérale du débit sanguin cérébral au niveau des lobes temporaux et plus particulièrement au niveau du gyrus temporal supérieur (GTS) et du sillon temporal supérieur (STS) (Zilbovicius *et al.*, 2000; Ohnishi *et al.*, 2000). Chez les patients autistes, il a été aussi observé un défaut d'activation du STS (Gervais *et al.*, 2004).

L'amygdale est un complexe de 13 noyaux en forme d'amande situé dans la région antéro-médiale du lobe temporal. C'est une région importante pour le traitement de la peur et pour l'orchestration d'un ensemble complexe de réactions émotionnelles et physiologiques.

Kemper et Bauman ont été les premiers à observer des anomalies dans l'organisation microscopique de l'amygdale (Kemper et Bauman, 1993). L'observation de 6 cas *post mortem* de patients autistes âgés de 9 à 29 ans, a permis de montrer que des neurones, dans certains noyaux de l'amygdale, étaient anormalement petits et plus denses que chez les contrôles.

Différentes études ont montré que, chez les garçons autistes, l'amygdale semble subir un développement anormal qui comprend une période d'élargissement précoce persistant jusqu'à la fin de l'enfance (Amaral *et al.*, 2008).

L'amygdale joue un rôle essentiel dans de multiples aspects de la mentalisation, incluant la détermination des états émotionnels d'autrui à partir de leurs expressions faciales. De nombreuses études ont rapporté une activation aberrante de l'amygdale chez les sujets avec

autisme lors de tâches requérant une déduction des états mentaux à partir d'yeux et un jugement des expressions du visage. Cela suggère que l'amygdale pourrait échouer à déterminer la pertinence des émotions vis-à-vis des stimuli sociaux dans l'autisme (Dichter, 2012).

II.3 : Autisme et neuro-inflammation

La neuro-inflammation représente une inflammation des tissus nerveux, qui peut être induite en réponse à une variété de signaux, y compris des infections, une lésion cérébrale ou de l'auto-immunité.

Il est supposé que le système immunitaire (SI) joue un rôle dans l'autisme. L'examen détaillé des données des 11 enfants étudiés par Kanner a permis de montrer que quelques-uns présentaient des problèmes immunitaires (McDougle et Carlezon, 2013). En outre les première et deuxième générations de parenté de sujets autistes auraient davantage de maladies auto-immunes que les membres de familles contrôles (Money *et al.*, 1971).

Atladdottir et collaborateurs ont étudié tous les enfants nés au Danemark entre 1980 et 2005 et ont trouvé une augmentation du risque de TSA lorsque les mères sont hospitalisées pour une infection virale lors du premier trimestre ou pour infection bactérienne lors du second trimestre de grossesse (Atladdottir *et al.*, 2010). Cela suggère qu'une exposition prénatale aux anticorps maternels ou d'un agent infectieux peut affecter le développement fœtal et être associée à l'apparition de l'autisme.

Une récente analyse *in silico* chez des patients avec TSA a montré que des gènes candidats participent aux voies de signalisation immunitaire. Ainsi des mutations dans ces gènes peuvent altérer la régulation des cellules immunitaires au cours du développement du SNC (Ziats et Rennert, 2011).

L'activation du SI maternel lors de la grossesse n'affecte pas que le niveau des cytokines dans le sérum maternel, mais aussi dans le placenta et dans le cerveau fœtal. Durant le développement, les cytokines et les chimiokines sont exprimées à un niveau très faible dans le cerveau, et jouent un rôle dans la migration des cellules neuronales et gliales. Leur augmentation lors de la grossesse, due à une activation du SI maternel, pourrait donc avoir une influence sur le développement du cerveau fœtal (Depino, 2013). Par exemple une augmentation de la production de certaines cytokines, comme le TNF- α et l'IL-1 β , va inhiber la neurogenèse et favoriser la mort des neurones. En revanche, une augmentation de la

cytokine IL-6 va promouvoir la croissance et la prolifération des neurones et des oligodendrocytes (Figure 6; Onore *et al.*, 2012).

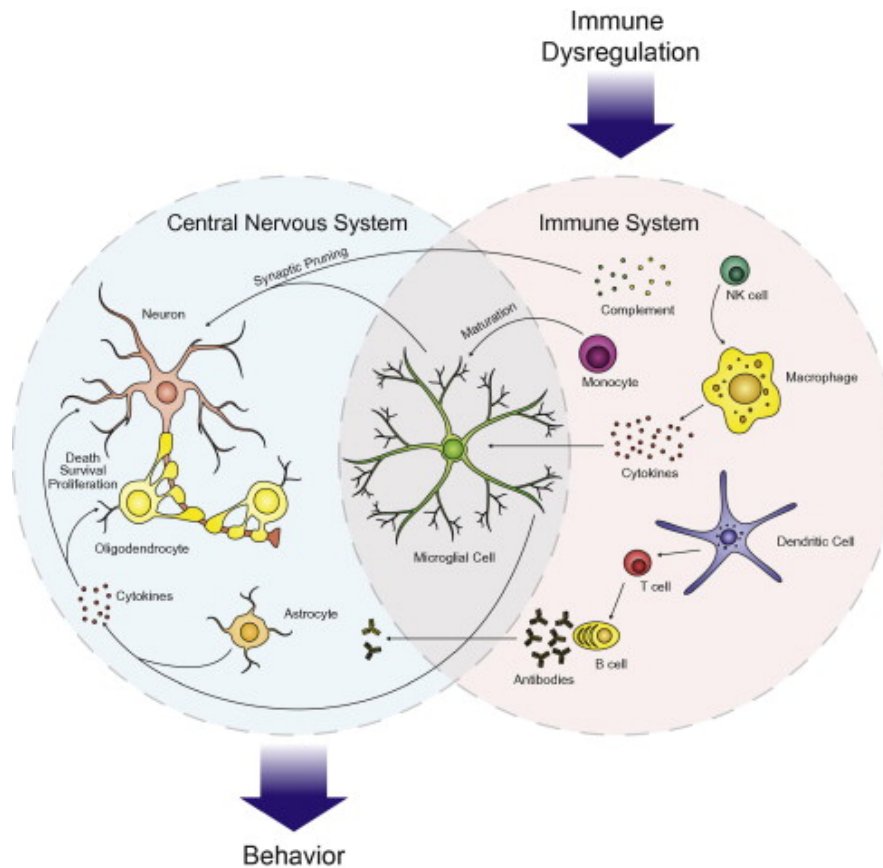


Figure 6 : Dysfonction du système immunitaire dans les TSA.

Le dysfonctionnement du SI dans les TSA implique un réseau d'interactions entre plusieurs types cellulaires. Le SNC est sélectif mais plusieurs facteurs immunitaires servent d'intermédiaires pour des effets essentiels de sa fonction physiologique. Des cytokines, des chimiokines, des protéines du complément et la microglie pourront réguler l'activité et l'homéostasie des neurones. Ce dysfonctionnement immunitaire dans les TSA va exercer plusieurs effets négatifs sur le comportement, y compris sur la fonction cognitive et les altérations sociales (Onore *et al.*, 2012)

Chapitre III : Étologie de l'autisme

Depuis sa description en 1943 par Kanner, les causes de l'autisme restent en grande partie inconnues. Toutefois, une forte composante biologique et notamment génétique semble se dégager dans les hypothèses physiopathologiques de l'autisme. En outre, plusieurs études proposent que le(s) mécanisme(s) sous-jacent(s) dans l'étiologie soient probablement polygéniques, et qu'une interaction entre facteurs environnementaux et génétiques pourrait augmenter le risque d'autisme (Figure 7; Tordjman *et al.*, 2014).

Ainsi, l'hétérogénéité des symptômes des patients supposerait la co-implication de facteurs génétiques (G), de facteurs environnementaux (E) et de l'interaction entre les gènes et l'environnement (GxE). La formule obtenue est : Phénotype=G+E+(GxE) (Huguet *et al.*, 2013).

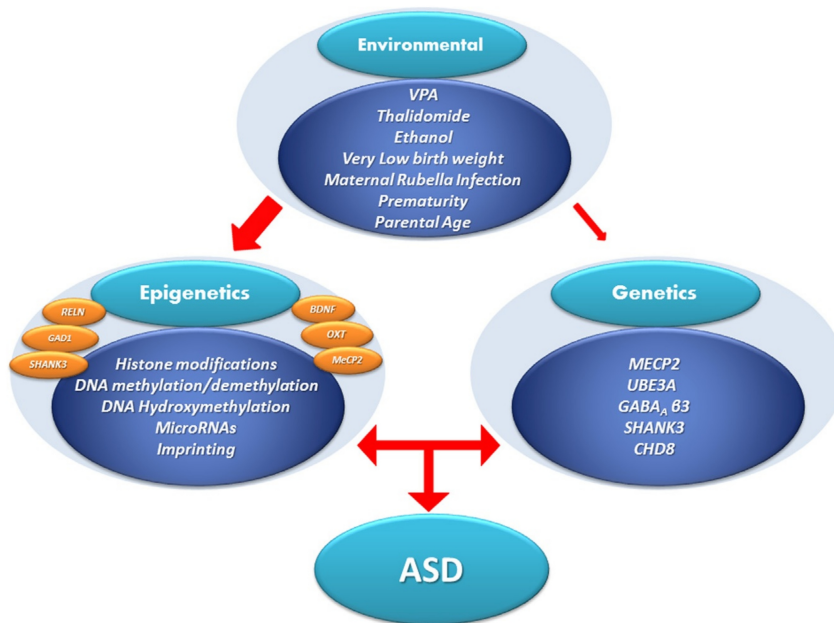


Figure 7: Autisme et interaction entre l'environnement, la génétique et l'épigénétique. Ces 3 composants interagissent les uns avec les autres et permettent d'expliquer en partie la complexité des TSA (Zhubi *et al.*, 2014)

III. 1 : Les facteurs environnementaux

De nombreuses études ont été effectuées afin de déterminer l'impact de facteurs environnementaux qui interviendraient à différents stades du développement du SNC, (pré-, péri- et néonatal).

Le diabète gestationnel, le saignement gestationnel, les infections virales ou bactériennes (Voir section II.3), l'âge des parents et d'autres facteurs, ont été mis en évidence

dans l'autisme au stade prénatal dans deux méta-analyses (Guinchat *et al.*, 2012; Gardener *et al.*, 2009). L'exposition *in utero* avec certains tératogènes, comme la thalidomide (sédatif), le valproate (antiépileptique), l'éthanol ou encore le misoprostol (antiulcéreux), est retrouvée dans les TSA (Dufour-Rainfray *et al.*, 2011). En effet, les enfants exposés au valproate pendant la grossesse présentent un risque 7 fois plus important de développer l'autisme par rapport aux enfants non exposés (Evatt *et al.*, 2009; Bromley *et al.*, 2013).

Guinchat et collaborateurs pointent trois facteurs associés à l'autisme en période périnatale : la prématurité, qui augmente le risque de développer des troubles autistiques, une mauvaise présentation du fœtus lors de l'accouchement et surtout une présentation par voie basse, ainsi que la césarienne programmée. Cependant l'implication des césariennes est à réévaluer, car elle est souvent pratiquée lors d'une mauvaise présentation du fœtus (Guinchat *et al.*, 2012).

Différents facteurs ont été associés à l'autisme lors du stade néonatal, à savoir une hypoxie, une blessure ou un traumatisme lors de la naissance, des difficultés d'alimentation, une anémie ou encore une hyper-bilirubinémie (Guinchat *et al.*, 2012; Gardener *et al.*, 2011).

Chez les patients autistes, des anomalies gastro-intestinales, tels que des problèmes de motilité ou une augmentation de la perméabilité intestinale, sont souvent observées et il a récemment été montré un lien physiopathologique entre le microbiote intestinal et le cerveau (Hsiao *et al.*, 2013). Cela implique que des anomalies de la flore intestinale lors de la croissance du du nourrisson pourraient avoir une influence sur son développement neuronal.

III.2 : Hétérogénéité génétique des Troubles du Spectre Autistique

III.2.1 : Arguments en faveur de l'origine génétique

À ce jour, à côté de l'implication de facteurs environnementaux dans les TSA, il est établi depuis plusieurs décennies la contribution majeure d'une composante génétique, soutenue par les éléments suivants :

Le premier argument est le constat selon lequel les TSA sont souvent associés à des syndromes génétiques connus, comme le FXS (Voir section II.4). La notion d'autisme syndromique est alors spécifiée.

Le deuxième argument provient des études réalisées sur les jumeaux. Depuis la première étude réalisée en 1977, sur 11 paires de jumeaux monozygotes (MZ) et 10 paires de jumeaux dizygotes (DZ; Folstein et Rutter, 1977), trois résultats majeurs ont pu être tirés (Tordjman *et al.*, 2014) :

- Dans chaque étude, le taux de concordance, qui est défini par le fait que le statut vis-à-vis de la maladie soit identique dans les paires de jumeaux MZ vs jumeaux DZ, est plus élevé chez les jumeaux MZ que chez les jumeaux DZ. Le taux de concordance entre jumeaux MZ varie en moyenne de 60 à 90% et de 0 à 20% chez les jumeaux DZ.
- Le taux de concordance chez les jumeaux MZ est incomplet, ce qui suggère une contribution des facteurs environnementaux dans l'autisme.
- Trois études (Folstein et Rutter, 1977; Bailey *et al.*, 1995; Hallmayer *et al.*, 2011) ont pu observer que le taux de concordance était modifié en fonction de la définition de l'autisme.

III.2.2 : Stratégies et outils d'identification des causes génétiques

III.2.2.1: Stratégies d'identification

Les méthodologies génétiques utilisées pour rechercher les *loci* ou les gènes responsables d'un phénotype sont principalement de deux types : les études de liaison et les études d'association. Ces méthodologies sont basées sur l'existence de marqueurs polymorphes (Microsatellite et SNP) dont le génotype est connu chez les individus étudiés.

III.2.2.1.1 : Les études de liaison

Les études de liaison ont pour but de rechercher des marqueurs co-ségrégant avec le phénotype en se basant sur l'analyse des données familiales. La fréquence de co-transmission d'un marqueur permet d'estimer le taux de recombinaison et donc la distance entre les marqueurs et le locus responsable du phénotype.

Il existe différents types de marqueurs :

- Les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) qui est un polymorphisme nucléotidique très fréquent dans le génome. Il s'agit d'un marqueur bi-allélique massivement utilisé.
- Le microsatellite qui est une répétition de motifs composés de 2 à 10 nucléotides. Il s'agit d'un marqueur multi-allélique très utilisé dans les années 2000.

Les études de liaison paramétriques (test du Lod Score), développées par Newton E. Morton (Morton, 1955), nécessitent de spécifier les paramètres qui régissent les relations entre génotype et phénotype, comme par exemple la pénétrance, qui est la probabilité qu'un

individu ayant le génotype d'intérêt présente le phénotype étudié. Cette méthode est particulièrement appropriée pour les maladies monogéniques. Par exemple, Laumonnier et collaborateurs ont utilisé le test de Lod Score pour étudier une famille avec 13 garçons atteints de DI avec ou sans autisme, ou de TED. Cette analyse a permis d'isoler une région sur le chromosome X (Xp21.2-pter) contenant, entre autres, le gène *NLGN4X*. Son séquençage a permis l'identification d'une délétion de 2 bases présente chez les sujets atteints et causant la formation d'un codon stop prématuré (Laumonnier *et al.*, 2004).

Les études de liaison non paramétriques (méthode des paires de germains atteints) ne nécessitent pas de définir le modèle génétique sous-jacent et de comparer les proportions d'allèles partagés par des malades à celles attendues d'après les liens génétiques. Cependant cette méthode, bien que plus pertinente que le test du Lod Score, n'est pas obligatoirement plus efficace. Les études de liaison sur les génomes entier de patients ont permis la mise en évidence de différentes régions candidates : 2q, 3q25-27, 6q14-21, 7q31-36 et 17p12-q21 (Autism Genome Project Consortium *et al.*, 2007; Freitag *et al.*, 2007).

En conclusion, les études de liaison sont robustes, permettent un criblage du génome avec un petit nombre de marqueurs et permettent de mesurer la contribution des gènes et de l'environnement, mais ce type d'étude a ses limites pour détecter des allèles fréquents et à pénétrance faible. De plus elles identifient des régions de grande taille.

Les études d'association sont plus efficaces pour les études des maladies multifactorielles (Risch et Merikangas, 1996).

III.2.2.1.2 : Les études d'association

Les études d'association comparent les fréquences alléliques de marqueurs polymorphes chez les patients et chez les témoins. Deux types de marqueurs sont utilisés :

- Les SNP
- Les Variations du Nombre de Copies (CNV) qui sont des marqueurs bi-alléliques, (absence ou présence du CNV), ou multi-alléliques (nombre de copies).

Il est possible de faire des études d'association sur génome complet, appelées GWAS (Genome-Wide Association Study).

Les études cas-témoins vont comparer les fréquences alléliques dans des cohortes de patients et de témoins non apparentés. Ces cohortes doivent être homogènes au sein de chaque groupe et avoir la même origine ethnique, sinon un biais de stratification et une interprétation erronée

indiqueraient une association fautive entre la maladie et le marqueur comme une indication du rôle du gène candidat. Sanders et collaborateurs ont mis en évidence à l'aide d'une étude GWAS portant sur 1124 familles une association significative des TSA avec des duplications *de novo* de la région 7q11.23 (Sanders *et al.*, 2011).

Le Transmission Disequilibrium Test (TDT) a été proposé en 1993 par Spielman et collaborateurs (Spielman *et al.*, 1993). Ce test permet de faire une analyse d'association qui s'appuie sur les données familiales, permettant d'éviter le biais de stratification obtenu avec l'étude cas-témoins. Néanmoins, cette méthode nécessite d'avoir les données génétiques des parents, et elle a une grande sensibilité aux erreurs de génotypage. Par exemple une étude de Jamain et collaborateurs a pu montrer une association entre le gène *GRIK2* et l'autisme à l'aide du test du TDT sur 107 trios (Jamain *et al.*, 2002)

III.2.2.2 : Outils d'identification

De nos jours, différents outils d'identification mis en place pour déterminer les causes génétiques des maladies sont utilisés. Ces méthodes ont gagné en résolution depuis le caryotype jusqu'au séquençage (Figure 8).

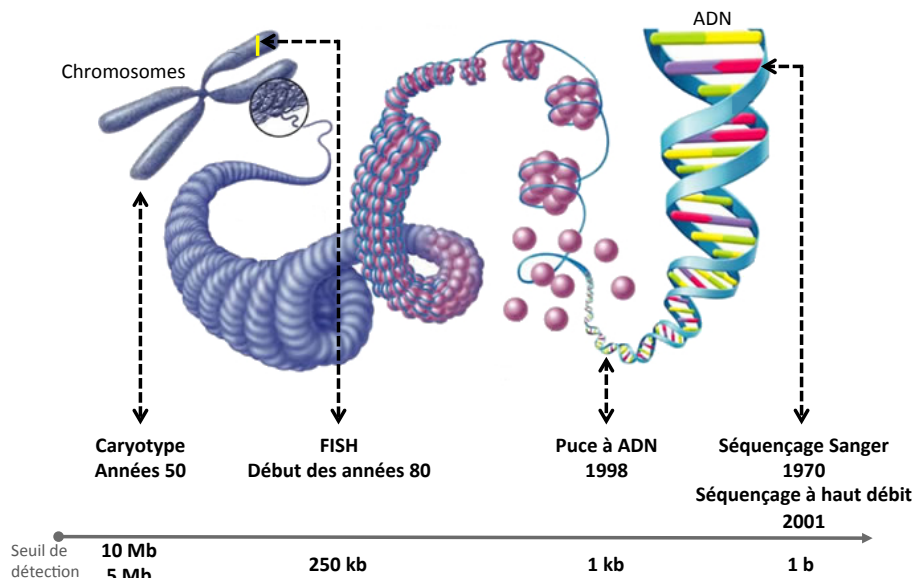


Figure 8 : Évolution des outils d'identification de facteurs génétiques

Représentation des différentes formes de condensation de l'ADN avec les techniques d'analyse et leurs résolutions associées.

III.2.2.2.1 : Les techniques de cytogénétique moléculaire

La technique de cytogénétique la moins résolutive (entre 5 et 10 Mb) est le caryotype et consiste entre autre à ordonner sur lames les chromosomes métaphasiques par paires et de les

classer par taille et selon la position du centromère, pour pouvoir déceler des anomalies de nombre et de structure chromosomique.

Complémentaire du caryotype et permettant d'augmenter la résolution (en moyenne 150 kb), l'Hybridation *In Situ* en Fluorescence (FISH) consiste à hybrider des sondes couvrant une région génomique donnée sur des préparations chromosomiques. La présence de CNV, de remaniements équilibrés initialement observée en caryotype est ainsi confirmée et mieux localisée par cette approche.

La dernière technique développée est la technologie d'Hybridation Génomique Comparative sur puce (CGH array). Les premières plateformes utilisaient des BAC (Chromosome Artificiel Bactérien) comme sondes (qui avaient initialement servi à séquencer le génome humain) sur lesquelles s'hybridait l'ADN génomique. Par la suite des oligonucléotides (60-120 mers) greffés sur une lame de verre ont été utilisés. Ces nouvelles sondes ont permis de rendre cette méthodologie plus résolutive car elle peut détecter des remaniements de l'ordre de 1 kb, bien qu'il soit impossible d'observer des remaniements équilibrés. La technique consiste à co-hybrider une même quantité d'ADN génomique d'un patient et d'un témoin contrôle sur une lame de verre sur laquelle se trouvent des séquences d'ADN génomique connues et parfaitement localisées sur le génome humain. Ces ADN étant marqués par un fluorochrome différent, c'est le rapport des deux signaux de fluorescence qui indique la quantité relative d'ADN hybride pour les deux génomes et qui permet de déduire le nombre de copies de la région considérée. En effet, pour un spot donné, en l'absence de CNV, les deux génomes vont s'hybrider de la même manière; au contraire en présence d'un CNV, on verra un biais d'hybridation préférentiel pour l'un des génomes (Pinkel *et al.*, 1998).

Il existe deux approches de CGH array, l'une ciblée (les sondes vont être localisées dans des régions d'intérêt), l'autre pangénomique. Cette dernière stratégie utilise des sondes réparties de façon homogène dans le génome avec souvent un biais au niveau des régions géniques (il y aura généralement plus de sondes localisées dans les régions géniques par rapport aux régions intergéniques).

En parallèle de la CGH array, le développement de la technologie des puces à SNP (ou SNP array) a permis d'obtenir des informations complémentaires à travers le génotypage de millions de SNP distribués dans tout le génome. Le principe de cette technologie repose sur l'hybridation d'ADN génomique marqué avec des sondes oligonucléotidiques. Comme pour la CGH array, c'est un rapport d'intensité d'hybridation qui est utilisé afin de déterminer la proportion des 2 allèles pour chaque marqueur et d'en déduire le nombre de copies. Cette

méthode va permettre une meilleure détection des CNV de grande taille (meilleur renseignement sur les bornes); cependant, étant donné la plus grande complexité des analyses biostatistique que celui de la CGH array, la détection des CNV de petite taille est moins fiable. En revanche, cette méthode peut détecter les disomies uniparentales (Heil et Schaaf, 2013).

III.2.2.2.2 : Le séquençage

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné, et a été inventé dans la deuxième moitié des années 70. La méthode par synthèse enzymatique développée par l'équipe de Fred Sanger au Royaume-Uni (Sanger *et al.*, 1977) est la plus largement utilisée.

Avant l'apparition du séquençage à haut-débit, l'approche génétique utilisée reposait sur la sélection de gènes candidats sur la base de différentes informations telles que la fonction du gène, son expression ou encore grâce à la découverte de régions riches en gènes par les études de liaison. Ces gènes étaient alors séquencés par la méthode de Sanger dans des cohortes de patients pour identifier des mutations délétères, puis dans des cohortes de témoins pour déterminer la fréquence des mutations chez les patients par rapport aux témoins.

L'apparition, en 2007, de séquenceurs de nouvelle génération dotés d'un débit de lecture beaucoup plus important a permis de résoudre un certain nombre de limites technologiques de la méthode Sanger. Au début trois plateformes de séquençage sont apparues, comprenant le pyroséquençage (Roche, Bâle, Suisse), le séquençage par ligation (SOLiD, Applied Biosystems®) et le séquençage à l'aide de terminateurs réversibles (Illumina®, San Diego, CA). Le séquençage à haut-débit permet d'appréhender une approche par gènes candidats, où l'on peut par exemple cibler tous les gènes d'une voie physiologique ou d'un interactome, ou bien une approche globale par exome ou par génome complet.

L'exome désigne l'ensemble des exons du génome, c'est-à-dire les régions codantes plus les parties 5' et 3' non traduites. Cependant la représentation est variable dans les publications, certaines ne sélectionnant que les parties codantes, alors que d'autres vont prendre aussi les séquences flanquantes des exons (c'est-à-dire les sites d'épissage), et les microARN ou ARN non codants.

Cette approche permet de détecter des variations uniques, SNV (Single Nucleotide Variants) aussi appelé SNP lorsque la fréquence de l'allèle le plus rare est supérieure à 1%,

des indels qui sont des insertions ou délétions de petite taille. Il est aussi possible de détecter des CNV ou CNP (Copy Number Polymorphisms) en comparant le nombre de séquences (reads), mais la technique reste perfectible sur l'exome.

La première application d'analyse d'exomes dans les TSA date de 2011 (O'Roak *et al.*, 2011) et la démocratisation de cette méthodologie a permis d'identifier de nouveaux gènes candidats. Des améliorations semblent encore nécessaires, en particulier pour la couverture de certaines régions riches en bases G et C.

Bien que l'exome ne cible théoriquement que 1,5% du génome, son analyse reste cependant une bonne alternative par rapport au séquençage complet du génome. En effet ce dernier reste encore coûteux (5 000 US\$), bien que son prix ait considérablement diminué depuis 2007 (Figure 9). Il apporte en outre un grand nombre de données nécessitant des capacités importantes de stockage et des protocoles/logiciels d'analyse complexes.

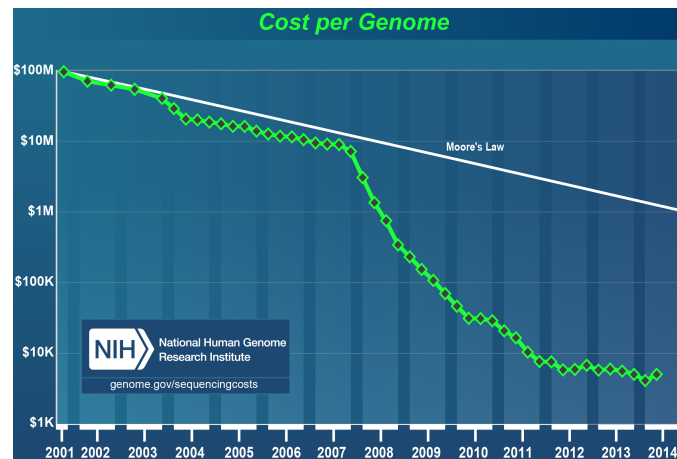


Figure 9 : Évolution du coût de séquençage d'un génome complet

La droite "Moore's Law" représente l'évolution prédite selon l'hypothèse d'un doublement de la puissance informatique tous les deux ans. La diminution du prix est due à l'arrivée des technologies de nouvelle génération. Source : <http://www.genome.gov/sequencingcosts/>

Le séquençage de génome complet va évidemment fournir les mêmes informations que pour l'exome, excepté au niveau des CNV où leur détection est bien plus efficace (Hayes *et al.*, 2013). Les premiers résultats de séquençage de génomes complets ont été publiés en 2012 et portaient sur l'étude de 10 paires de jumeaux autistes monozygotes (Michaelson *et al.* 2012).

Ces nouveaux outils ont permis de mettre en évidence l'implication de nouveaux gènes et loci dans les TSA. A ce jour, les correspondances entre les altérations de certains candidats et le phénotype sont bien établies, particulièrement dans les cas de syndromes associés à l'autisme. En revanche, pour l'autisme idiopathique, ces relations restent hypothétiques puisque peu de gènes sont impliqués de manière récurrente dans l'autisme.

Chapitre IV : Mécanismes génétiques et moléculaires dans l'autisme

IV.1 : Modèles génétiques : Variant Commun – Maladie Fréquente (CVCD) et Variant Rare – Maladie Fréquente (RVCD)

Actuellement, deux théories permettant d'analyser l'architecture génétique des maladies multifactorielles émergent pour l'autisme, à savoir le modèle Variant Commun – Maladie Fréquente (CVCD) et le modèle Variant Rare – Maladie Fréquente (RVCD) (Figure 10).

Le modèle CVCD repose sur l'hypothèse selon laquelle l'association d'un grand nombre de variants retrouvés dans la population générale (fréquence du variant supérieure à 1%) contribue à l'apparition de la maladie. Pris individuellement, ces variants communs n'auraient en revanche pas d'effet significatif.

Le modèle RVCD suggère de son côté que la pathologie peut être causée par quelques variants rares mais ayant un risque significatif. Cette conception pourrait notamment expliquer l'hétérogénéité génétique entre les différents individus atteints de TSA. Selon ce modèle les maladies complexes peuvent être assimilées, dans une famille donnée, à une maladie à transmission de type Mendélienne (Liu et Takumi, 2014).

Ces deux hypothèses sont néanmoins très schématiques et se situent aux extrémités d'un continuum dans lequel s'inscrivent des modèles impliquant l'association de variants fréquents et d'effets intermédiaires (Figure 10A; Manolio *et al.*, 2009). Berg et Geschwind (Figure 10B) proposent plusieurs combinaisons séparant d'un côté le modèle Mendélien dans lequel la variation génétique causant la maladie est majoritairement *de novo* et rare, et de l'autre côté plusieurs modèles polygéniques incluant les approches RVCD et CVCD, ainsi que des modèles intermédiaires dans lesquels la maladie serait induite par une association de variants rares et de variants communs (Berg et Geschwind, 2012).

Le modèle CVCD a longtemps été privilégié (en particulier dans le cadre des études GWAS) et aujourd'hui encore, une partie de la communauté scientifique met en avant un rôle significatif pour les variations communes dans l'autisme. En 2012, Klei et collaborateurs ont montré que l'ensemble de tous les variants communs contribue à la vulnérabilité aux TSA, cela étant même plus important dans les cas familiaux (familles multiplexes), que dans les cas sporadiques (familles simplexes) (Klei *et al.*, 2012). En 2014, Gaugler et collaborateurs

indiquent que les variations communes ont une plus grande part dans l'héritabilité des TSA que les variations rares (Gaugler *et al.*, 2014).

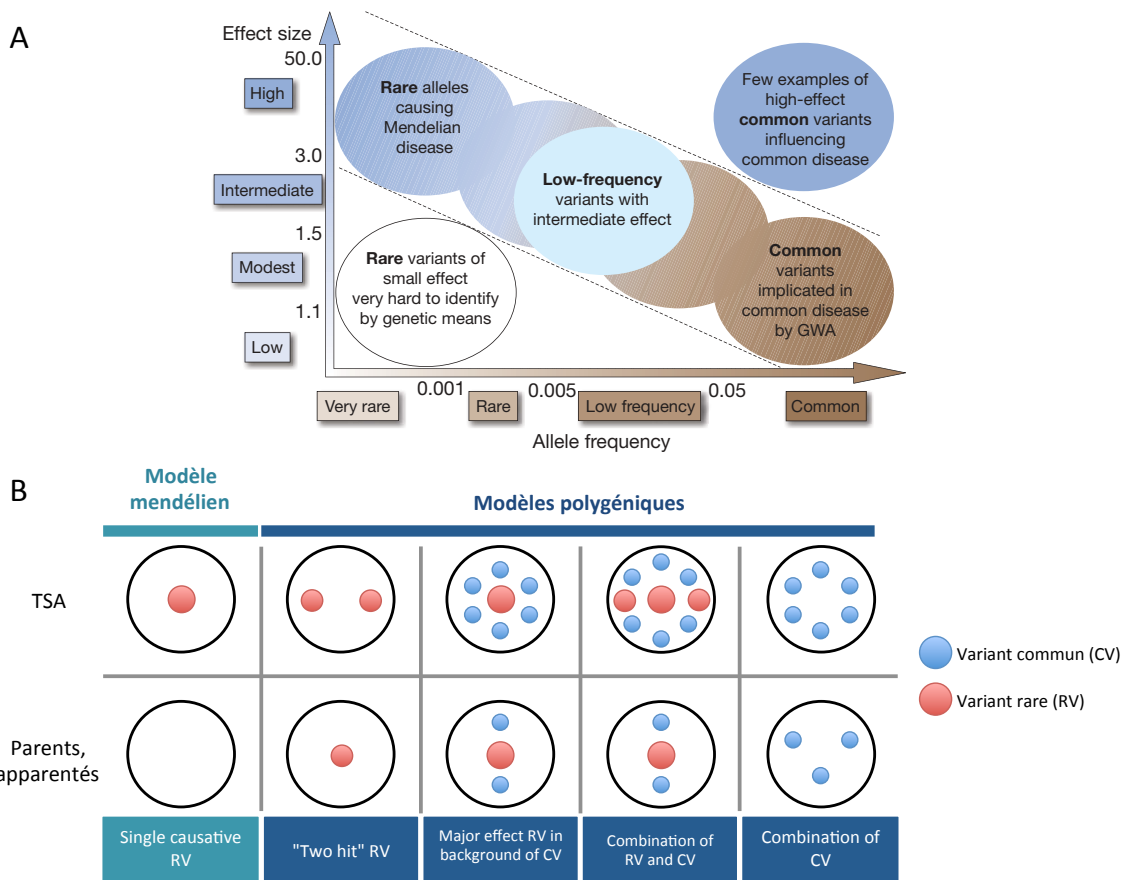


Figure 10 : Synthèse des modèles génétiques dans les TSA

(A) Représentation des différents modèles, CVCD et RVCD aux extrémités et au milieu des modèles intermédiaires qui sont représentés dans la seconde partie de la figure (Manolio *et al.*, 2009). (B) Représentation schématique de modèles Mendélien et polygéniques (colonne). Les cercles noirs représentent les individus atteints de TSA (Haut) ou apparentés sains (Bas). La taille des variations est proportionnelle à leur effet dans la maladie. Pour plus de simplicité, ces modèles sont représentés ici comme des catégories distinctes, alors qu'en réalité les TSA sont plus susceptibles d'être représentés par une distribution plus continue (D'après Berg et Geschwind, 2012)

Cependant, il existe des arguments en défaveur de l'implication du modèle CVCD dans l'autisme. En 2011, Devlin et collaborateurs estiment que l'on ne peut pas conclure à l'implication de variants communs à partir des résultats d'études d'association pangénomique, car les études devraient porter sur des dizaines de milliers d'individus afin d'observer le faible effet de chacune de ces variations (Devlin *et al.*, 2011). De plus, les différentes études d'association (GWAS) réalisées n'ont pas permis de répliquer les résultats. Par exemple, le consortium Autism Genome Project (AGP) a trouvé dans la phase 1 de son projet l'association du SNP rs4141463 au niveau du gène *MACROD2* (Anney *et al.*, 2010), mais lors de la phase 2 le consortium n'a pas répliqué cette association, mais a identifié une légère association avec

un gène déjà impliqué dans l'autisme, *CNTNAP2* (Anney *et al.*, 2012). Les études d'association ne semblent donc pas pouvoir ressortir des variants fréquents associés à l'autisme. L'association de ces variants communs à des variants rares permettrait de mieux estimer leur impact chez les sujets autistes (Figure 10B, colonne 4 et 5). Ces problèmes de reproductibilité dans les études d'associations peuvent s'expliquer par la grande hétérogénéité des TSA.

À ce jour, les différentes études ne trouvant que peu de variants communs associés aux TSA et identifiant de nombreux variants rares suscitent un intérêt particulier pour le modèle RVCD. Depuis quelques années, les scientifiques ont fait l'hypothèse du modèle oligogénique, double-hit (Figure 10B) ou multi-hit. Ces concepts associent quelques variants rares pour expliquer la maladie, avec en général un des variants hérité d'un parent sain et l'autre variant hérité de l'autre parent sain ou *de novo*.

En 2010, Girirajan et collaborateurs ont établi, chez des patients porteurs d'une microdélétion en 16p12.1, un risque plus important de trouver un second CNV par rapport à la population générale (Girirajan *et al.*, 2010). C'est l'association de ces variations rares, mutations ou CNV, qui entraînerait la maladie, en induisant un effet de seuil (Figure 11). En effet une variation seule n'aurait pas d'impact suffisant ou serait liée à un phénotype intermédiaire (Figure 11A), alors que l'association de différentes variations rares dans des voies fonctionnelles indépendantes (Figure 11B) ou dans la même voie fonctionnelle (Figure 11C) entraînerait la maladie.

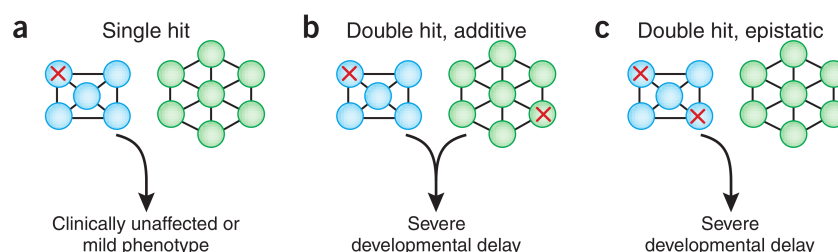


Figure 11: Exemples de modes de transmission.

(A) Lorsqu'une variation rare est isolée, elle n'entraîne généralement pas de phénotype ou un phénotype intermédiaire; (B) et (C) En revanche quand une autre variation est co-exprimée, les deux mutations agissent de concert et induisent un phénotype plus sévère. Les variations vont pouvoir intervenir dans des voies fonctionnelles différentes (B) ou dans la même voie (C) (Veltman et Brunner, 2010).

Le modèle du double-hit pourrait aussi permettre d'expliquer pourquoi la grande majorité des gènes impliqués dans l'autisme sont aussi retrouvés dans d'autres troubles neurodéveloppementaux, tels que la schizophrénie, la DI, les troubles cognitifs, les troubles

du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH). On peut alors supposer que les différentes combinaisons possibles de ces gènes pourraient moduler la variabilité phénotypique couramment observée (Girirajan *et al.*, 2010).

En conclusion, il est possible que les différents modèles, CVCD, RVCD et les formes intermédiaires, expliquent les différentes composantes des TSA. Dans le cadre de nos travaux, nous nous intéressons plus particulièrement au modèle RVCD et multi-hit.

IV.2 : Régions chromosomiques et gènes candidats

L'autisme est un ensemble de maladies neurodéveloppementales très complexes et hétérogènes sur le plan génétique (Betancur, 2011). Toutes les variations génétiques identifiées sont regroupées dans différentes bases de données telles que l'Autism Chromosome Rearrangement Database, qui regroupe les anomalies structurales (<http://projects.tcag.ca/autism/>; Marshall *et al.*, 2008), l'AutismKB, qui regroupe à la fois les variations structurales et nucléotidiques (<http://autismkb.cbi.pku.edu.cn/>; Xu *et al.*, 2012) et la base de données SFARI Gene qui regroupe les différentes études génétiques sur l'autisme (Basu *et al.*, 2009; https://gene.sfari.org/autdb/HG_Home.do). Cependant, très peu d'analyses fonctionnelles sont réalisées sur les différentes anomalies structurales ou ponctuelles retrouvées. Il est donc très utile de disposer des bases de données regroupant les variations génétiques au sein de la population générale (Voir Chapitre III). Ces dernières permettent de connaître la fréquence de CNV et SNV chez les sujets contrôles ainsi que le degré d'enrichissement dans la population autistique par rapport à la population générale.

IV.2.1 : Les variations structurales

Les différents types de variations structurales peuvent être subdivisées en formes constitutionnelles (c'est-à-dire présentes dès la naissance) ou acquises (anomalies somatiques qui apparaissent plus tard dans la vie). Les anomalies peuvent être équilibrées (Figure 12A), et observées en caryotype ou en FISH, la CGH array n'étant pas utilisable. Les anomalies déséquilibrées (Figure 12B), dans lesquelles une perte (délétion) ou un gain (duplication) de matériel sont constatés, peuvent être analysées par CGH array.

Le CNV est la variation du nombre de copies de régions chromosomiques, délétions ou gains de matériel génétique. Ces variations sont de différentes tailles, allant de quelques bases (observables en séquençage) à la perte (monosomies) ou gain (trisomies) d'un chromosome.

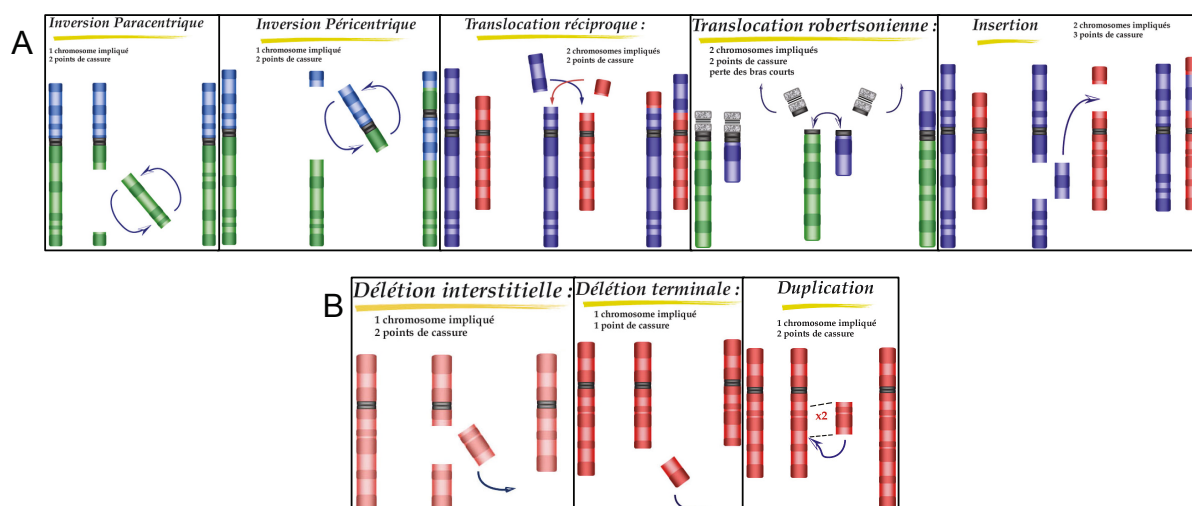


Figure 12 : Exemples d'anomalies chromosomiques

Représentation des différents types d'anomalies que l'on peut classer dans deux catégories, (A) les anomalies équilibrées, et (B) les anomalies déséquilibrées

Sources : <http://cvirtuel.cochin.univ-paris5.fr/cytogen/iconcyto.htm>

On observe que les CNV ne sont pas répartis de manière uniforme dans le génome humain, ils sont plus nombreux au voisinage des duplications segmentaires, essentiellement près des télomères et des centromères, qui constituent des points chauds de recombinaison (Sharp *et al.*, 2005). Les CNV vont alors pouvoir être formés par différents mécanismes dont un qui va faire intervenir les duplications segmentaires :

- Non allelic homologous recombination (NAHR), qui se produit lors d'un crossing-over inégal entre duplications segmentaires. En raison de leur haut degré d'identité de séquences, les duplications segmentaires peuvent parfois être alignées en méiose ou en mitose. Ce mésappariement peut alors entraîner des remaniements chromosomiques lorsque les deux duplications segmentaires sont sur le même chromosome. Une recombinaison homologue entre ces dernières entraîne une duplication et/ou une délétion (Figure 13A).

- Non homologous end joining (NHEJ), qui est un mécanisme de réparation de l'ADN qui permet de réparer les cassures double brin (Figure 13B).

- Fork stalling and template switching (FoSTeS) ou micro-homology mediated break induced replication (MMBIR), qui est un mécanisme de réparation lorsqu'il y a une cassure au niveau d'un des doubles brins près de la fourche de réplication. Le brin retardé se dégage de la matrice d'origine et s'hybride sur une autre fourche de réplication proche physiquement et ayant une micro-homologie. En fonction de la position de la nouvelle fourche de réplication (en amont ou en aval) il y aura une délétion ou une duplication respectivement (Figure 13C ; Stankiewicz et Lupski, 2010; Malhorta et Sebat, 2012).

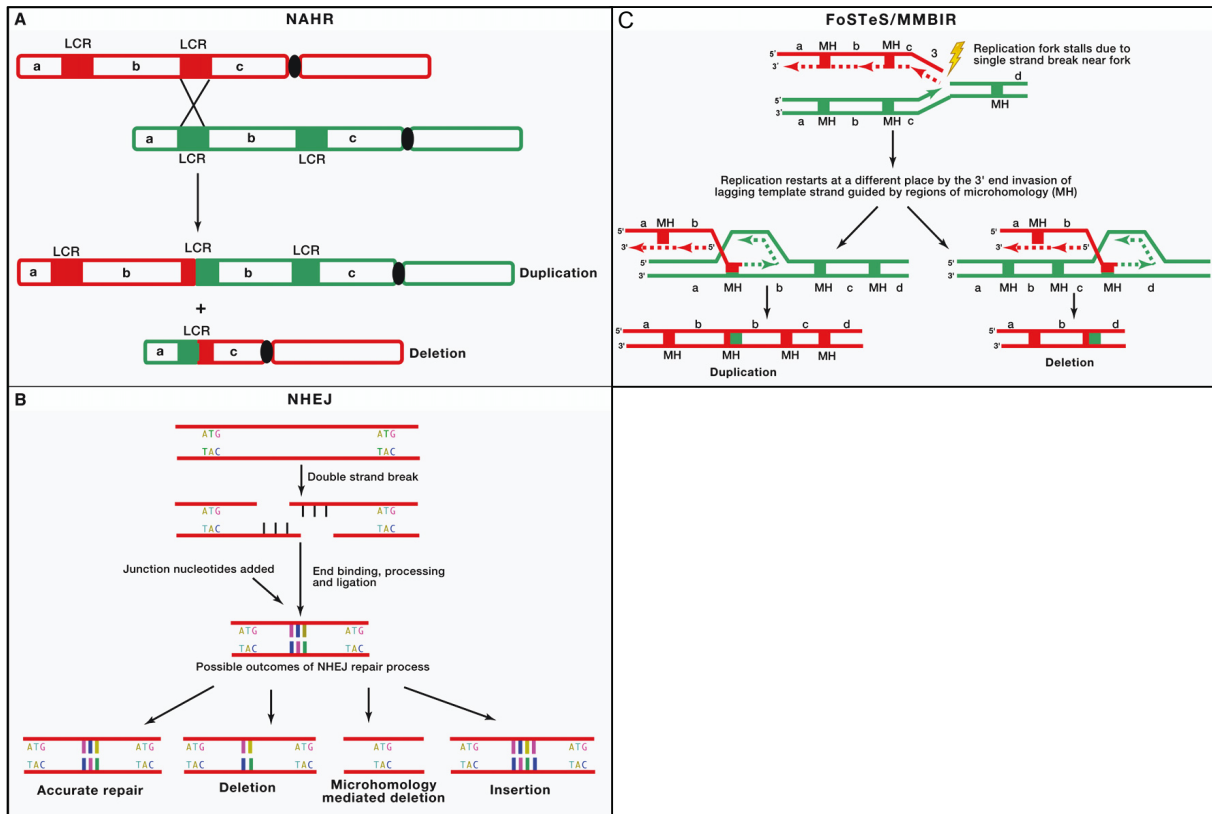


Figure 13 : Mécanismes sous-jacent d'induction des remaniements génomiques et CNV

A: Le non allelic homologous recombination (NAHR) produit par une recombinaison inégale entre deux duplications segmentaires (représenté par les LCR), se traduit par la perte et le gain réciproque d'un fragment d'ADN (b). Lors de la division cellulaire, il y aura séparation des deux chromosomes ce qui conduira à un changement du nombre de copies dans les deux cellules filles. B: Le non homologous end joining (NHEJ) se produit lors d'une cassure double brin de l'ADN. Lors de cette cassure les extrémités sont réparées par de nombreux cycles d'enzymes. Les différents types de cassures de l'ADN double brin réparées par le NHEJ combiné avec d'autres mécanismes de réparation alternative, y compris la microhomology mediated end-joining (MMEJ), conduit à différents résultats, qui seront le plus souvent des délétions et dans une moindre mesure des insertions. C: Le Fork stalling and template switching (FoSTeS/MMBIR) se produit lors d'une cassure de l'ADN au niveau de la fourche de réplication. Lorsqu'il y a une cassure de l'ADN dans la fourche de réplication (Eclair), l'extrémité 5' du brin tardif (ligne en tirets rouges) est reséquée, ce qui permet de créer un avancement au niveau de l'extrémité 3'. L'extrémité 3' du brin tardif (ligne continue en rouge) va alors pouvoir se fixer sur le brin sœur (ligne verte) grâce à des micro-homologies (MH). En fonction de l'endroit où se fixe le brin retardé sur le brin sœur, il y aura alors une duplication ou une délétion (D'après, Malhorta et Sebat, 2012)

Les anomalies chromosomiques visibles sont présentes chez environ 5% des personnes atteintes d'autisme et les CNV rares, *de novo* ou hérités, sont observés chez 5 à 10% des patients avec TSA (Devlin et Scherer, 2012). Les anomalies les plus fréquentes sont localisées en 2q37, 7q11, 15q11-13, 16p11, 22q11.2 et 22q13.3 (Tableau 1; Figure 14; Huguet *et al.*, 2013).

Cependant, des variations structurales sont également retrouvées dans la population générale (Sebat *et al.*, 2004; Iafrate *et al.*, 2004). Selon ces 2 études, chaque sujet présenterait en moyenne 11 ou 12 CNV, que l'on appelle Copy Number Polymorphism (CNP) quand ils sont retrouvés dans la population générale à une fréquence supérieure à 1%. Le nombre est néanmoins sous-estimé étant donné le petit nombre d'échantillons testés, et la faible résolution des techniques utilisées. Plus de la moitié des CNP identifiés affectait des gènes, dont certains présentent une expression neuronale, comme *NCAM2* (Sebat *et al.*, 2004). Iafrate et collaborateurs ont observé que 56% des CNV chevauchent des régions codantes connues et que 26% englobent un ou plusieurs gènes, indiquant que les variations structurales ne se limitent pas qu'aux régions intergéniques ou introniques (Iafrate *et al.*, 2004).

Plus récemment Conrad et collaborateurs ont montré, avec la technologie de SNP array, qu'un individu sain présenterait en fait en moyenne entre 1 000 et 1 500 CNV localisés dans des régions géniques et intergéniques. Cette étude a permis d'observer qu'en moyenne 45 gènes retrouvés dans la base de donnée OMIM, étaient affectés par un CNV chez chaque individu de leur cohorte (Conrad *et al.*, 2010).

Des bases de données regroupant les CNP retrouvés dans la population générale sont disponibles sur internet et servent de support pour évaluer la présence de variants, candidats dans les TSA, au sein de cohortes d'individus considérés « contrôles » et qui ne présentent *a priori* aucune pathologie neurodéveloppementale. Ainsi, le site "Database of Genomic Variants" (DGV) regroupe les variations structurales retrouvées dans les génomes des 18 294 individus contrôles appartenant à des populations à travers le monde (<http://dgv.tcag.ca>; MacDonald *et al.*, 2014).

Une des premières études utilisant la technique de CGH array dans l'autisme et réalisée sur un échantillon de 29 sujets a indiqué que 8 d'entre eux (28%) portaient un CNV considéré pertinent cliniquement. Ce ratio est probablement surévalué car l'étude présentait un biais de recrutement, la majorité des patients ayant un autisme syndromique (Jacquemont *et al.*, 2006). En 2007, Sebat et collaborateurs ont publié l'analyse en CGH array de l'ADN de 118 patients avec autisme sporadique, 77 individus provenant de familles multiplexes et 196 contrôles. Des CNV candidats ont été identifiés dans 10% des cas sporadiques, dans 3% des familles multiplexes et dans 1% des contrôles (Sebat *et al.*, 2007).

De nombreux travaux réalisés sur différentes plateformes CGH ont permis d'identifier de nouveaux CNV impliqués dans l'autisme (Tableau 1; Figure 14; Sebat *et al.*, 2007 ;Autism Genome Project Consortium, 2007; Christian *et al.*, 2008; Glessner *et al.*, 2009; Itsara *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2010; Gilman *et al.*, 2011; Levy *et al.*, 2011; Prasad *et al.*, 2012; Girirajan *et al.* 2013A; Pinto *et al.*, 2014). Les remaniements sont répartis sur tous les chromosomes et plus fréquemment dans les régions télomériques et centromériques. Ils sont de tailles variables, incluant un seul gène comme pour le cas des CNV dans *NRXN1* (Neurexin 1) en position 2p16.3 (Béna *et al.*, 2013), jusqu'à l'implication de plusieurs gènes, comme les CNV en 7q11.23 (Sanders *et al.*, 2011).

Les CNV peuvent également aboutir à des conséquences phénotypiques variables au sein d'un même locus selon qu'il s'agisse d'une amplification ou d'une délétion. En effet, il existe des CNV dits "miroir", notamment en 16p11.2, dont la délétion va entraîner une macrocéphalie et de l'obésité, alors que la duplication de la même région est associée à une microcéphalie et une maigreur marquée (Jacquemont *et al.*, 2011).

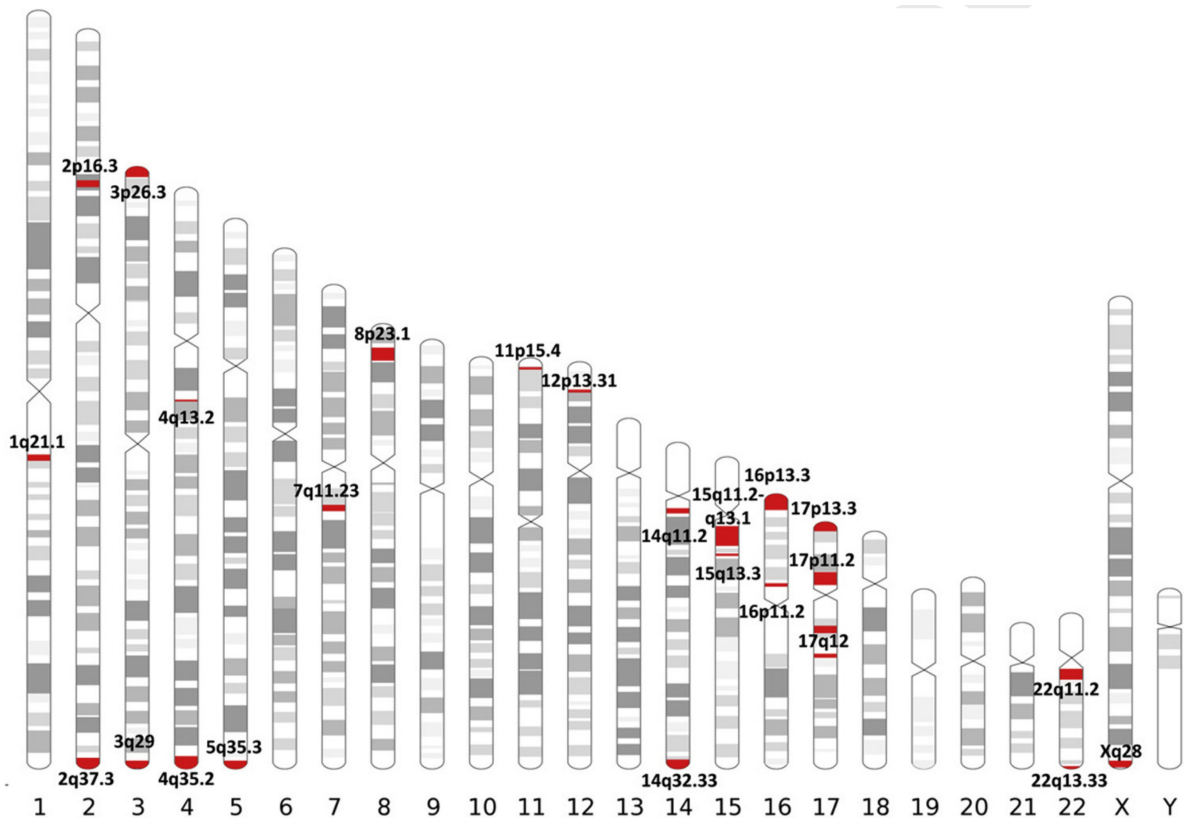


Figure 14 : Idiogramme des anomalies chromosomiques les plus fréquentes associées aux TSA.

Représentation de 25 loci (en rouge) qui sont connus comme étant impliqués dans les TSA. On remarque que la majorité des anomalies se retrouvent au niveau des régions télomériques et centromériques (Liu et Takumi, 2014).

En outre, les différents CNV candidats dans l'autisme, dont une partie est présentée dans le Tableau 1, ne sont pas uniquement impliqués dans l'autisme, mais aussi dans d'autres troubles neurodéveloppementaux et neuropsychiatriques. Par exemple, la délétion de la région 2q37 est impliquée dans l'autisme, le retard de développement (RD)/DI et l'épilepsie, et la duplication est retrouvée chez des patients avec RD/DI (Guilmatre *et al.*, 2009).

Les CNV ne semblent donc pas spécifiques d'une pathologie (Sebat *et al.*, 2009; Girirajan *et al.*, 2012). Cette observation suggère l'action de certains mécanismes physiopathologiques communs à toutes ces maladies.

Tableau 1 : CNV les plus significatifs impliqués dans l'autisme et retrouvés dans d'autres troubles neurodéveloppementaux

Locus	Chr	Start (hg19)	Stop (hg19)	Gènes candidats	Autisme	RD/DI	Epilepsie	TDAH
1p36	1	10,001	12,840,259	<i>SKI, KCNAB2, MMP23, GABRD</i>	+	+++	++	+
1q21.1	1	146,533,376	147,883,376	<i>GJA5, GJA8, CHD1L</i>	+	+++	+	+
1q21.1	1	146,533,376	147,883,376	<i>GJA5, GJA8, CHD1L</i>	++	+++	+	+
2q37	2	239,954,693	242,930,600	<i>HDAC4</i>	+	+++	++	
2q37	2	239,954,693	242,930,600	<i>HDAC4</i>		+++		
3q29	3	195,756,054	197,344,665	<i>PAK2, DLG1</i>	+	+++	+	
3q29	3	195,756,054	197,344,665	<i>PAK2, DLG1</i>	+	+++		
Williams Syndrome	7	72,744,454	74,142,513	<i>ELN, GTF2I, FKBP6, LIMK1</i>	+	+++	+	+
Dup 7q11.23	7	72,744,454	74,142,513	<i>ELN, GTF2I, FKBP6, LIMK1</i>	++	+++	++	+
9q34	9	140,403,363	141,153,431	<i>EHMT1</i>	++	+++	++	
9q34	9	140,403,363	141,153,431	<i>EHMT1</i>		+++		
10q23	10	81,960,000	88,800,000	<i>NRG3, PCDH21, LRIT1, GRID1, BMPR1A</i>	++	++	++	
10q23	10	81,960,000	88,800,000	<i>NRG3, PCDH21, LRIT1, GRID1, BMPR1A</i>	+++	++		
15q11-13 (PWS/AS)	15	22,876,632	28,557,186	<i>GABRB3, UBE3A, SNRPN</i>	+	++	+	
15q11-13 (PWS/AS)	15	22,876,632	28,557,186	<i>GABRB3, UBE3A, SNRPN</i>	++	+++	++	
15q13.3	15	31,137,104	32,445,408	<i>CHRNA7</i>	++	+++	++	+
15q13.3	15	31,137,104	32,445,408	<i>CHRNA7</i>	++	+++	+	+
15q24	15	74,377,174	76,162,277	<i>EDC3, CYP1A1, ULK3, PTPN9</i>	++	+++	++	
15q24	15	74,377,174	76,162,277	<i>EDC3, CYP1A1, ULK3, PTPN9</i>		+++		
16p13.11	16	15,504,454	16,292,268	<i>NDE1, MYH11, ABCC1</i>		+++	++	+
16p13.11	16	15,504,454	16,292,268	<i>NDE1, MYH11, ABCC1</i>	++	+++	+	+
16p11.2 distal	16	28,820,000	29,050,000	<i>SH2B1</i>	+	+++	++	+
16p11.2 distal	16	28,820,000	29,050,000	<i>SH2B1</i>	+	++	+	
16p11.2	16	29,606,852	30,199,855	<i>SEZ6L2, ALDOA, TBX6</i>	++	+++	+	+
16p11.2	16	29,606,852	30,199,855	<i>SEZ6L2, ALDOA, TBX6</i>	+	+++	++	+
17p13.3 (YWHAE)	17	1,247,834	1,303,556	<i>YWHAE</i>	++	++	++	
17p13.3 (YWHAE)	17	1,247,834	1,303,556	<i>YWHAE</i>		+++	+	
17p13.3 (PAFAH1B1)	17	2,496,923	2,588,909	<i>PAFAH1B1</i>		++	++	
17p13.3 (PAFAH1B1)	17	2,496,923	2,588,909	<i>PAFAH1B1</i>	++	+++		
Smith-Magenis	17	16,757,111	20,219,651	<i>RAI1, TOM1L2, DRG2</i>	+	+++	+	+
Potocki-Lupski	17	16,757,111	20,219,651	<i>RAI1, TOM1L2, DRG2</i>	++	+++	+	
22q11.2 (VCF)	22	19,009,792	21,452,445	<i>TBX1, COMT, PRODH</i>	+	++	+	+
22q11.2	22	19,009,792	21,452,445	<i>TBX1, COMT, PRODH</i>	+	++	+	+
22q11.2 distal	22	21917117	23722445	<i>TOP3B, MAPK1, UBE2L3, BCR</i>		++	+	
22q11.2 distal	22	21917117	23722445	<i>TOP3B, MAPK1, UBE2L3, BCR</i>	++	++	++	
Phelan-McDermid	22	51,045,516	51,178,945	<i>SHANK3</i>	++	+++	++	
22q13	22	51,045,516	51,178,945	<i>SHANK3</i>		+++		

Les délétions sont représentées en rouge et les duplications en bleu. RD : Retard de développement, DI : Déficience Intellectuelle, TDAH : Trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité. Le symbole + indique le degré d'association entre le CNV et le trouble (D'après Girirajan *et al.*, 2012).

Toutes les études réalisées jusqu'à aujourd'hui ont aussi permis de tirer certaines généralités sur les CNV dans l'autisme (Chung *et al.*, 2014; Huguet *et al.*, 2013).

De nombreux CNV rares *de novo* ou hérités contribuent aux TSA. Effectivement 6,6% des individus avec TSA sporadique ont au moins un CNV *de novo*, alors que cette valeur atteint 4,1% pour les individus provenant de familles multiplexes, 1,4% pour les frères et les sœurs sains, et 1,9% pour les contrôles (Figure 15). On constate que ces valeurs n'ont pas beaucoup varié par rapport à celles rapportées par Sebat et collaborateurs en 2007 (Sebat *et al.*, 2007). La proportion de CNV semble plus importante dans les cas sporadiques que dans les cas de familles multiplexes. Cette différence est aussi retrouvée dans d'autres maladies complexes héréditaires, ce qui peut indiquer un mécanisme différent entre les cas sporadiques et les cas familiaux (Abrahams et Geshwind, 2008).

Les CNV sont généralement plus grands et touchent plus de gènes chez les individus atteints par rapport à leurs frères et sœurs sains et aux contrôles (Figure 15). Il est intéressant de noter que par rapport aux hommes, les femmes atteintes de TSA ont un plus grand nombre de CNV qui sont plus grands et touchent davantage de gènes (Girirajan *et al.*, 2013A; Huguet *et al.*, 2013).

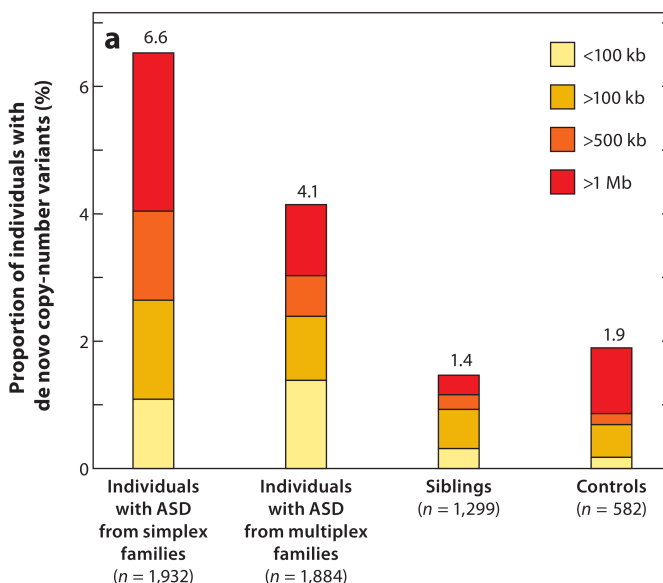


Figure 15 : Fréquence et taille des CNV *de novo* dans l'autisme

Fréquence et taille des CNV *de novo* chez les individus autistes issus de famille simplexe, multiplexe, leurs frères et sœurs sains et les contrôles (Huguet *et al.* 2013).

Plus de 40% des CNV sont hérités d'un parent sain, ce qui donne un argument en faveur d'un modèle génétique multi-hit. Comme indiqué précédemment, chacun des parents transmettrait à son enfant un CNV qui présenterait un effet individuel faible ou nul (chez le parent porteur), mais qui, dans le cas d'une association avec un autre CNV, *de novo* ou

transmis par l'autre parent, peut contribuer à l'autisme. Les CNV semblent être plus souvent hérités de la mère (54%), cependant cette valeur n'est pas significative (Huguet *et al.*, 2013).

Deux études ont établi une plus forte probabilité (27%) de retrouver des CNV chez les patients avec un autisme syndromique (Jacquemont *et al.*, 2006; Morrow *et al.*, 2008).

Parmi les gènes affectés par les CNV retrouvés dans l'autisme, on observe un enrichissement pour ceux codant des protéines impliquées dans la fonction synaptique. Glessner et collaborateurs ont montré une surreprésentation de ces gènes chez des patients avec TSA par rapport aux contrôles, comme par exemple *NRXN1* et *CNTN4* qui sont des molécules d'adhérence neuronale, ou encore *NLGN1* et *ASTN2* (Glessner *et al.* 2009).

En conclusion, les CNV sont retrouvés de façon significative dans l'autisme, mais ne représentent qu'une faible proportion des causes génétiques. La détection croissante de variations nucléotidiques constitue un autre élément déterminant pour appréhender la forte composante génétique dans l'autisme.

IV.2.2 : Les variations nucléotidiques et les insertions/délétions (indels)

Les variants nucléotidiques, aussi appelés Single Nucleotide Variant (SNV), sont des variations d'une base dans le génome. Le terme SNP est utilisé quand ils sont retrouvés à une fréquence >1% dans la population générale. De même, les indels correspondent à des insertions ou des délétions de quelques bases que l'on peut observer en séquençage (mais pas en CGH array).

De la même manière que pour les CNV, les SNP et les indels sont également présents dans la population générale. En 2008, Ng et collaborateurs ont réalisé un séquençage d'exome sur l'ADN d'un individu phénotypiquement normal. En comparant avec le génome de référence du NCBI (National Center for Biotechnology Information), ils ont identifié chez cet individu 12 500 variants affectant une protéine codante et répartis en 10 400 SNV non synonymes (dont 1 500 sont prédits comme ayant des effets fonctionnels) et 700 indels codants. Environ 7% des SNP non synonymes n'ont pas été trouvés dans la base de données dbSNP qui rassemble les SNP identifiés dans la population générale (Sherry *et al.*, 1999), et sont *a priori* nouveaux. Ils observent que 72% des nouveaux SNP sont à l'état hétérozygote (Ng *et al.*, 2008).

D'autres bases de données regroupant les SNP retrouvés dans la population générale sont disponibles sur internet et servent de support pour l'analyse des variants candidats au sein de cohortes d'individus "contrôles" ne présentant pas *a priori* de pathologies neurodéveloppementales :

- L'Exome Sequencing Project (ESP; <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) qui regroupe les données d'exomes de 6503 personnes atteintes d'affections cardio-vasculaires et pulmonaires. Cette cohorte semble ainsi adaptée pour les études sur les maladies neuropsychiatriques touchant le développement du SNC. Il est aussi possible de séparer les résultats en fonction de l'origine ethnique des sujets (afro-américaine et caucasienne-américaine).
- Le Projet 1000 Génomes qui rassemble les données de séquençage du génome entier de 1 088 individus de différentes ethnies (<http://www.1000genomes.org/>; 1000 Genomes Project Consortium, 2010).

La première étude d'exomes sur patients atteints d'autisme a été réalisée en 2011, par O'Roak et collaborateurs, sur 20 trios. Ils ont pu identifier des mutations *de novo* potentiellement causales chez 4 patients dans des gènes précédemment associés à l'autisme, à la DI et à l'épilepsie : les gènes *GRIN2B*, *SCN1A* et *LAMC3*, qui codent respectivement la sous unité 2B du récepteur au glutamate NMDA, la sous-unité $\alpha 1$ des canaux sodiques voltage-dépendants, et la laminine $\gamma 3$. En outre, un patient est également porteur d'une mutation *de novo* au niveau du gène *FOXP1*, qui code la protéine Forkhead-Box P1, et une mutation héritée dans le gène *CNTNAP2*, qui code une contactine, ce qui montre l'importance du modèle du multi-hit (O'Roak *et al.*, 2011).

En 2012, le séquençage de génome complet réalisé sur 10 paires de jumeaux monozygotes a permis de constater que les gènes de susceptibilité à l'autisme semble se situer dans des régions d'hyper mutabilité (Michaelson *et al.*, 2012).

En 2013, Shi et collaborateurs ont décrit le séquençage de génome complet de 2 frères atteints issus d'une grande famille composée de 8 autres enfants. En supposant un modèle récessif, les auteurs ont identifié 7 gènes candidats communs aux deux frères. Ils ont aussi utilisé une stratégie d'analyse qui ne nécessite pas d'hypothèse sur le modèle de la maladie et ont établi une liste de 59 variants augmentant la susceptibilité à l'autisme. Ils ont enfin identifié 33 variants non codants prioritaires, qui sont localisés près de gènes déjà candidats dans l'autisme (Shi *et al.*, 2013).

Chapitre IV : Mécanismes génétiques et moléculaires dans l'autisme

Dans une autre étude réalisée sur 32 familles avec au moins un enfant autiste, Jiang et collaborateurs ont identifié 3 210 237 SNV et 804 635 indels par génomes, dont respectivement 19 241 (0,6%) et 510 (0,06%) étaient situés dans les régions exoniques. Au total, des variations candidates ont été caractérisées dans 9 gènes déjà impliqués dans l'autisme, 8 gènes candidats et dans 4 nouveaux gènes (Jiang *et al.*, 2013).

Au vu de ces résultats, la question de l'intérêt de réaliser le séquençage de génomes complets peut se poser. Effectivement, ces études ne décrivent que des variations localisées dans des régions codantes alors que 99% de leur SNV se trouvent dans les régions non codantes. Cependant les auteurs indiquent qu'il y a une meilleure couverture de certaines régions géniques par cette approche.

De nouvelles mutations sont régulièrement identifiées dans des gènes déjà connus dans les troubles neurodéveloppementaux comme pour le gène *NLGN4X*, le gène *CHD7* impliqué dans le syndrome de CHARGE (OMIM 214800; O'Roak *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013) ou le gène *DYRK1A* qui est situé dans la région critique du syndrome de Down (OMIM 190685; O'Roak *et al.*, 2012; Iossifov *et al.*, 2012).

Plus largement, on constate que la majorité des gènes et des CNV retrouvés dans l'autisme (Figure 16; Tableau 2) sont aussi impliqués dans d'autres troubles neurodéveloppementaux ou neuropsychiatriques. C'est le cas du gène *ANK3* qui est impliqué dans les TDAH, les troubles Bipolaires (TB), les RD, l'épilepsie, la DI et la schizophrénie (SCZ) (Bi *et al.*, 2012; Epi4K Consortium, 2013; Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium; 2011; Iqbal *et al.*, 2013; Durak *et al.*, 2014). Ces données suggèrent un continuum génétique très important entre les différentes pathologies neurodéveloppementales et neuropsychiatriques.

Tableau 2 : Gènes candidats dans les TSA isolés à partir de séquençage d'exomes et de génomes

Chr	Gene symbole	Description	Involved in other neurodevelopmental disease
De novo mutation			
1	<i>NTNG1</i>	Netrin G1	SCZ
1	<i>POGZ</i>	Pogo transposable element with ZNF domain	no
2	<i>IFH1</i>	Interferon induced with helicase C domain 1	no
2	<i>SCN2A</i>	Sodium channel, voltage-gated, type II, alpha subunit	ADHD, DD, EP, ID
5	<i>GPR98</i>	G protein-coupled receptor 98	no
6	<i>VIP</i>	Vasoactive intestinal peptide	no
8	<i>PKHD1L1</i>	Polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive)-like 1	no
10	<i>USP54</i>	Ubiquitin specific peptidase 54	no
11	<i>CAPRN1</i>	Cell cycle associated protein 1	no
11	<i>KIRREL3</i>	Kin of IRRE like 3 (Drosophila)	no
11	<i>MICALCL</i>	MICAL C-terminal like	no
12	<i>GRIN2B</i>	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B	ADHD, DD, EP, ID, OCD, SCZ
14	<i>CHD8</i>	Chromodomain helicase DNA binding protein 8	SCZ
16	<i>ABCC12</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 12	no
18	<i>KATNAL2</i>	Katanin p60 subunit A-like 2	no
21	<i>DYRK1A</i>	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A	DD, EP, ID
Inherited mutations			
1	<i>POMGNT1</i>	Protein O-linked mannose beta1,2-N- acetylglucosaminyltransferase	no
2	<i>SCN1A</i>	Sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit	ADHD, DD, EP, ID
3	<i>AMT</i>	Aminomethyltransferase	no
6	<i>PEX7</i>	Peroxisomal biogenesis factor 7	no
6	<i>SYNE1</i>	Spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	ADHD, BPD, MDD, SCZ
8	<i>VPS13B</i>	Vacuolar protein sorting 13 homolog B (yeast)	EP, ID
9	<i>LAMC3</i>	Laminin, gamma 3	no
10	<i>ANK3</i>	Ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	ADHD, BPD, DD, EP, ID, SCZ
12	<i>NCKAP5L</i>	NCK-associated protein 5-like	no
12	<i>PAH</i>	Phenylalanine hydroxylase	no
12	<i>UBE3B</i>	Ubiquitin protein ligase E3B	DD, ID
17	<i>ZNF18</i>	Zinc finger protein 18	no
20	<i>KCNQ2</i>	Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2	ADHD, BPD, DD, EP, ID
22	<i>CLTCL1</i>	Clathrin, heavy chain-like 1	SCZ
X linked transmission			
X	<i>AFF2</i>	AF4/FMR2 family, member 2	ADHD, DD, EP, ID
X	<i>BCORL1</i>	BCL6 corepressor-like 1	no
X	<i>KAL1</i>	Kallmann syndrome 1 sequence	no
X	<i>KIAA022</i>	KIAA2022	ID
X	<i>MECP2</i>	Methyl CpG binding protein 2	ADHD, EP, ID, SCZ
X	<i>NLGN4X</i>	Neurologin 4, X-linked	ADHD, DD, ID, TS
X	<i>PCDH11X</i>	Protocadherin 11 X-linked	no
X	<i>SRPX2</i>	Sushi-repeat containing protein, X-linked 2	no
X	<i>TMLHE</i>	Trimethyllysine hydroxylase, epsilon	ID
X	<i>UPF3B</i>	UPF3 regulator of non sense transcripts homolog B (Yeast)	ADHD, DD, ID, SCZ
X	<i>WWC3</i>	WWC family member 3	no
X	<i>ZC3H12B</i>	Zinc finger CCCH-type containing 12B	no

Les gènes les plus retrouvés sont surlignés en gris. Le lien avec les pathologies a été établi selon les données de SFARI (mise à jour Septembre 2014). ADHD : Trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité, BPD : Trouble Bipolaire, DD : Retard de développement, EP : Epilepsie, ID : Déficience Intellectuelle, MDD : Trouble dépressif majeur OCD : Trouble obsessionnel compulsif, TS : Syndrome de Tourette SCZ : Schizophrénie (D'après Jiang *et al.*, 2014).

IV.2.2.1 : Caractérisation de SNV *de novo*

Les différentes études de génomes complets et surtout d'exomes (Charbour *et al.*, 2012; Iossifov *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2012; Neale *et al.*, 2012; O'Roak *et al.*, 2012; Sanders *et al.*, 2012; Bi *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2013; Toma *et al.*, 2014; Srivastava *et al.*, 2014; An *et al.*, 2014; Iossifov *et al.*, 2014; De Rubeis *et al.*, 2014) ont permis d'observer davantage de mutations dans les gènes à expression neuronale chez les patients avec autisme par rapport aux contrôles. Une forte association de mutations *de novo* dans l'autisme, ainsi que des cas de modèles génétiques multi-hit sont constatés, impliquant aussi bien des mutations hétérozygotes « perte de fonction » que des variants faux-sens qui pourraient concerner environ 10% des sujets avec TSA (O'Roak *et al.*, 2011; Iossifov *et al.*, 2012; Sanders *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013; Ronemus *et al.*, 2014).

La majorité des mutations *de novo* (2/3) sont d'origine paternelle, à l'opposé de ce qui est observé pour les CNV qui semblent davantage hérités du génome maternel. L'âge du père à la conception de l'enfant constituerait un facteur très important, avec une augmentation prédite du taux de mutation. Un modèle exponentiel estime que le nombre moyen de mutations d'origines paternelle double tous les 18 ans (O'Roak *et al.*, 2012).

Les différentes études de séquençage ont permis de mettre en évidence l'influence d'un grand nombre de gènes dans l'autisme (Tableau 2; Figure 16), dont certains sont retrouvés impliqués de manière récurrente (Tableau 2), comme par exemple *KATNAL2* dont plusieurs variations ont été retrouvées dans différents exomes (Sanders *et al.*, 2012; O'Roak *et al.*, 2012). De même, des mutations (Neale *et al.*, 2012; O'Roak *et al.*, 2012; Bernier *et al.*, 2014) et des CNV (Prontera *et al.*, 2014) ont été identifiées dans le gène *CHD8*.

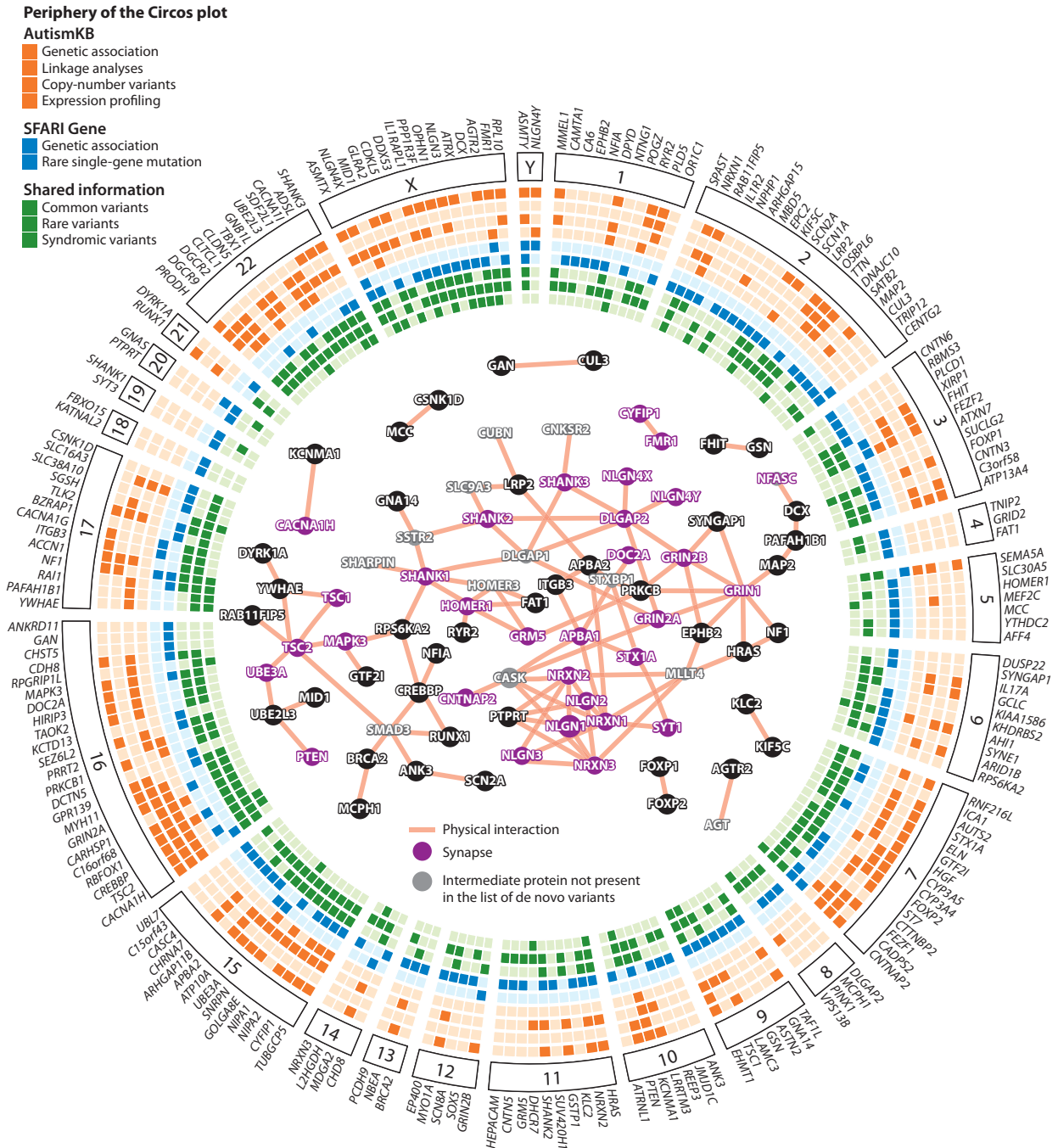


Figure 16 : Synthèse des gènes impliqués par des mutations *de novo* dans les TSA.

Représentation en cercle de 203 gènes identifiés avec mutations *de novo* chez les autistes présents dans AutismKB (mise à jour Juillet 2011) et dans SFARI Gene (Mise à jour Septembre 2012). Au centre se trouve une analyse de réseaux avec GenMANIA qui met en évidence les interactions entre les protéines synaptiques (Huguet *et al.*, 2013).

IV.2.2.2 : SNV rares hérités et modèles récessifs

Les variations génétiques et génomiques *de novo* identifiées dans les TSA, et plus largement dans les maladies génétiques, sont en général considérées pathogènes ou ayant un effet délétère. À l'opposé, des mutations héritées de parent sain ne présenteraient pas au premier abord un impact négatif sur l'expression ou la fonction du gène candidat.

Néanmoins, si l'on prend l'exemple de délétions héritées, celles-ci peuvent contribuer à la pathologie en cas de combinaison avec un variant *de novo*, rare ou hérité localisé dans l'allèle sur l'autre autosome. En effet, Hochstenbach et collaborateurs. (2012) avaient démontré chez des sujets avec TSA la présence de délétions héritées combinées avec un variant supposé délétère sur l'autre allèle d'un gène affecté par la délétion, conduisant finalement à un modèle récessif.

Yu et collaborateurs ont analysé par séquençage d'exome une cohorte de familles consanguines incluant plusieurs sujets avec TSA (Yu *et al.*, 2013). L'identification entre autres de mutations récessives pathogènes dans les gènes *NLGN4X*, *MECP2*, *PAH* et *VPS13B*, leur ont permis de suggérer que des mutations bi-alléliques sont possiblement associées dans les TSA.

Enfin, dans le cadre de gènes localisés sur le chromosome X, la mutation retrouvée chez un sujet masculin atteint peut être transmise par sa mère, conductrice saine de la variation. Betancur a dressé en 2011 une synthèse sur 90 gènes impliqués dans les troubles neurodéveloppementaux (DI et TSA) et localisés sur le chromosome X, et a pu montrer que 50% d'entre eux étaient impliqués dans les TSA (Betancur, 2011).

Ces différents cas illustrent la présence de modèles dits récessifs autosomiques ou liés à l'X, qui sont bien caractérisés dans les DI (Najmabadi *et al.*, 2011), et qui émergent significativement dans les TSA.

IV.3 : Mécanismes et voies biologiques impliqués dans l'autisme

L'analyse détaillée des CNV (Tableau 1; Figure 14) et des gènes (Tableau 2; Figure 16) impliqués dans l'autisme (Betancur, 2011) permet de mettre en avant certaines voies physiopathologiques (Figure 17; Krumm *et al.*, 2014) inter-connectées et pouvant être soumises à des modifications extérieures telles que l'environnement.

IV.3.1 : Rôle des facteurs épigénétiques

L'épigénétique est définie par l'ensemble des mécanismes moléculaires agissant sur la structure de l'ADN et sur la régulation de l'expression des gènes. L'épigénétique va surtout intervenir au niveau de la chromatine et de son remodelage.

Une récente étude (De Rubeis *et al.*, 2014) et une méta-analyse sur 4 publications de séquençages d'exomes (Iossifov *et al.*, 2012; Neale *et al.* 2012; O'Roak *et al.*, 2012; Sanders *et al.*, 2012) ont montré qu'il y avait une surreprésentation de gènes avec des fonctions dans la régulation de la chromatine et exprimés dès les premières étapes du développement du SNC (Tableau 3; Ben-David et Shifman, 2013). Par exemple, des mutations sont décrites pour le gène *ARID1B* (également impliqué dans le syndrome de Coffin-Siris), qui code une protéine du complexe SWI/SNF (SWItch/Sucrose NonFermetable) intervenant dans l'activation et la répression de la transcription de certains gènes, via le remodelage de la chromatine (O'Roak *et al.*, 2012). Il y a aussi le syndrome de Rett, causé par des mutations dans le gène *MECP2*, qui code une protéine impliquée dans la méthylation de l'ADN (Amir *et al.*, 1999).

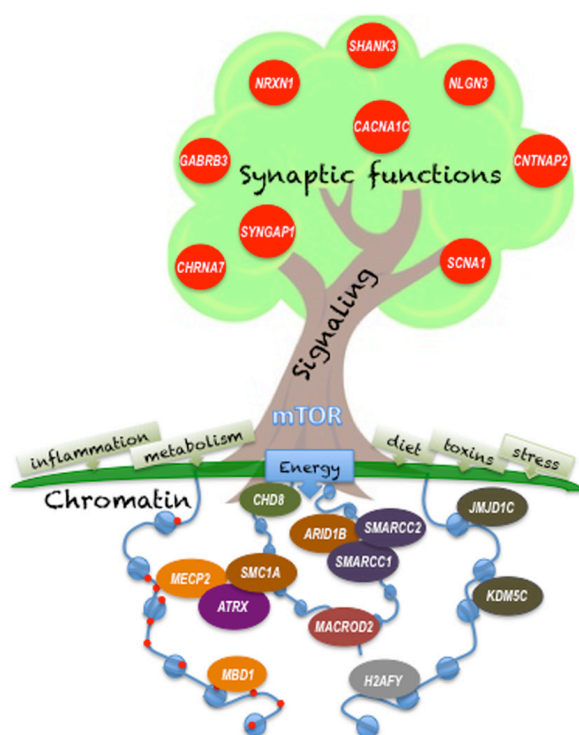


Figure 17 : Représentation schématique des voies physiopathologiques impliquées dans les TSA.

D'après LaSalle, 2013

La première étude de séquençage de génomes (Michaelson *et al.*, 2012), a mis en évidence que le remodelage de la chromatine influence la localisation des mutations *de novo* retrouvées chez les patients. Les auteurs ont observé que les variants ne sont pas distribués au

hasard dans le génome, mais regroupés en points chaud ("hotspot") dans des régions où la chromatine est ouverte, active et sans nucléosome.

Tableau 3 : Gènes impliqués dans la régulation épigénétique et à expression développementale précoce

Genes	"transcription regulation	"chromatin modification"	"chromatin regulator"
<i>ADNP</i>	+		
<i>ARID1B</i>	+	+	+
<i>BCL11A</i>	+		
<i>BRWD1</i>	+		
<i>CBX4</i>	+	+	+
<i>CNOT3</i>	+		
<i>CSTF2T</i>			
<i>CUL3</i>			
<i>DYRK1A</i>			
<i>MBD5</i>			
<i>MED13L</i>	+		
<i>MLL3</i>	+	+	+
<i>MLL5</i>	+	+	+
<i>NFI1</i>	+		
<i>PHF2</i>			
<i>POGZ</i>			
<i>PRPF39</i>			
<i>SETBP1</i>			
<i>SETD2</i>	+	+	+
<i>SMARCC2</i>	+	+	+
<i>SPAST</i>			
<i>SUV420H1</i>	+	+	+
<i>TBR1</i>	+		
<i>TCF3</i>	+		
<i>VCP</i>			
<i>ZMYND11</i>	+		

Liste des gènes enrichis dans le module "développement", c'est-à-dire les gènes qui sont fortement exprimés avant la naissance et dont l'expression diminue après la naissance (Ben-David et Shifman, 2013)

VI.3.2 : La voie de signalisation *Wnt* et *mTOR*.

Bien que les TSA soient la conséquence de mutations dans des gènes ayant des fonctions moléculaires multiples, une convergence se dessine vers certaines voies de signalisation, notamment *Wnt*/ β -Catenine et *mTOR*/*PI3K* (Figure 18).

La voie de signalisation Wnt/ β -Catenine (Figure 18A) est fortement impliquée dans le développement car elle influence la subdivision du tube neural antérieur dans les principales régions du cerveau, mais aussi la prolifération des précurseurs neuronaux. En outre, elle permet la migration des cellules neuronales, le guidage des axones et la formation des synapses et des dendrites (Mulligan et Cheyette, 2012).

Des mutations et des CNV sont retrouvés dans des gènes codant des protéines agissant dans cette voie. Martin et collaborateurs ont identifié une mutation rare dans le gène *WNT1*, qui induit une activation de la voie Wnt (Martin *et al.*, 2013). Des CNV affectant les gènes *WNT3* et *WNT9B* chez des patients autistes ont été recensés par Levy et collaborateurs (2011) ainsi que des variants rares isolés dans *WNT2* (Wassink *et al.*, 2001). Chez les rats traités au valproate (modèle environnemental d'autisme), la surexpression *Wnt1* et *Wnt2* lors du développement neuronal est associée avec une activation de la voie Wnt/ β -Catenine (Wang *et al.*, 2010).

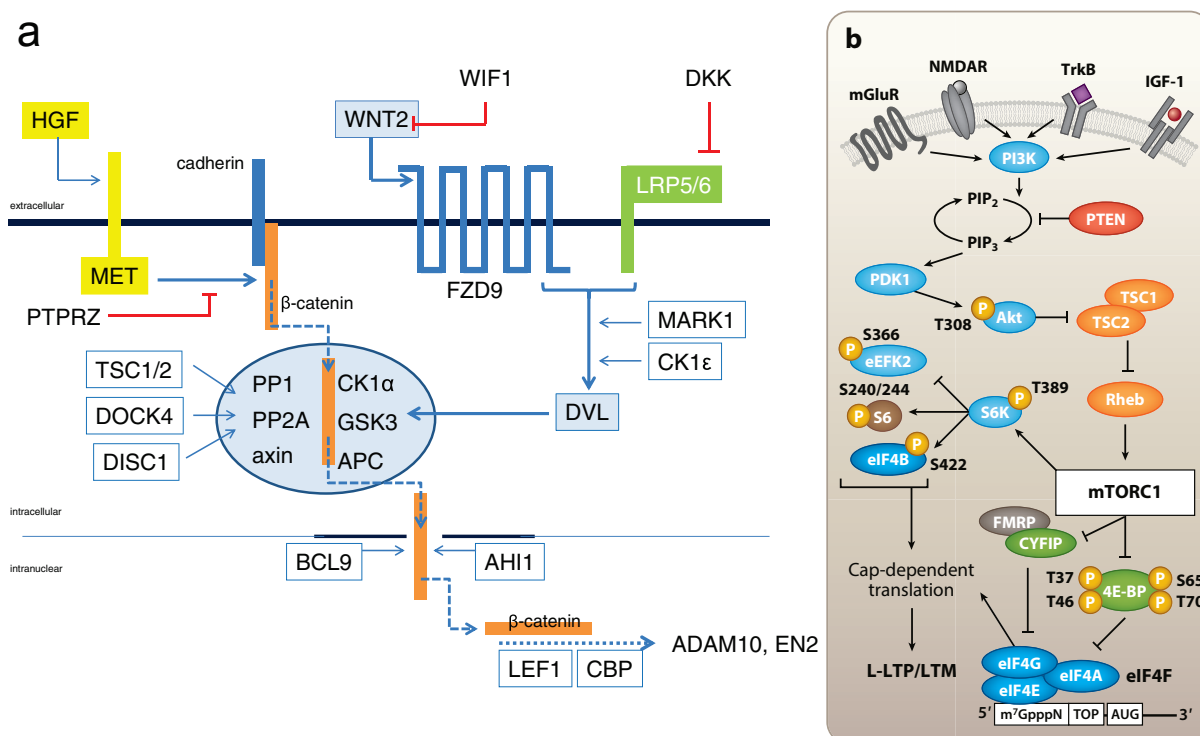


Figure 18 : Implication de la voie de signalisation Wnt et mTOR dans l'autisme

(A) Représentation schématisée de la voie de signalisation Wnt2. L'activation du récepteur FZD9 par WNT2 va permettre l'expression de la protéine dishevelled (DVL). Cette dernière va entraîner l'inhibition du complexe de dégradation de la β -caténine (ellipse en bleu clair). La β -caténine va ensuite activer la transcription de certains gènes, comme *EN2* (Kalkman, 2012).

(B) Représentation schématisée de la traduction coiffe-dépendante par la phosphorylation de mTORC1 et de ses principaux effecteurs. L'activité de mTORC1 est entraînée par l'activation de la voie de signalisation via l'envoi d'un signal excitateur par des récepteurs, comme mGluR ou NMDA (Buffington *et al.*, 2014).

La voie de signalisation mTOR (Figure 18B) est un élément régulateur central de la croissance cellulaire, de la prolifération, de la survie et de la traduction des protéines coiffe-dépendantes. Dans le cerveau, les composants de cette voie sont présents au niveau des synapses, où ils régulent la morphologie des épines dendritiques, et sont également essentiels pour la synaptogenèse (Sawicka et Zukin, 2012).

Des mutations localisées dans les gènes *TSC1*, *TSC2*, ou encore *PTEN*, vont causer une sur-activation de la voie mTOR. Chez la souris invalidée pour ces gènes, on observe une amélioration du phénotype lorsqu'elle reçoit de la rapamycine, molécule inhibitrice de la protéine mTORC1 (Buffington *et al.*, 2014). Il a également été constaté une sur-activation de la voie mTOR au niveau des synapses, dans le modèle murin du FXS (Sharma *et al.*, 2010).

VI.3.3 : La voie synaptique

La synapse désigne une zone de contact fonctionnelle qui s'établit entre deux neurones, ou entre un neurone et une autre cellule. Elle va assurer la conversion d'un potentiel d'action déclenché dans le neurone pré-synaptique en un signal dans la cellule post-synaptique. Le signal est soit transmis électriquement (synapse électrique) soit via des neurotransmetteurs (synapse chimique). Au niveau de la synapse chimique, il existe des synapses excitatrices (Glutamatergique) et de synapses inhibitrices (GABAergique).

La synapse comprend un grand nombre de protéines permettant sa conformation correcte et son bon fonctionnement. Des mutations dans les gènes impliqués dans le maintien de la synapse peuvent avoir un effet sur la structure et l'activité synaptique. A ce jour, de nombreux gènes candidats dans l'autisme codent des protéines synaptiques (Figure 19; De Rubeis *et al.*, 2014; Delorme *et al.*, 2013; Bayés *et al.*, 2011).

Ainsi, dans la famille des gènes *SHANK*, qui codent des protéines d'échafaudage au sein de la densité post-synaptique, différentes mutations et CNV ont été décrits. Dans le gène *SHANK1*, des CNV ont été identifiés chez des patients autistes de haut niveau (Sato *et al.*, 2012). Il en est de même pour le gène *SHANK2*, impliqué dans l'autisme, le RD, l'épilepsie et la DI (Berkel *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2010; Leblond *et al.*, 2012). Le dernier gène de cette famille, *SHANK3*, est également impliqué dans l'autisme et la DI (Durant *et al.*, 2007).

On observe le même constat pour la famille des gènes de la neurexine (*NRXN1*, *NRXN2* et *NRXN3*), en pré-synaptique, et de la neuroligine (*NLGN1*, *NLGN3*, *NLGN4X* et *NLGN4Y*), en post-synaptique. Comme pour la famille des gènes *SHANK*, ces gènes ne sont pas seulement impliqués dans l'autisme, mais aussi dans d'autres syndromes neurodéveloppementaux et neuropsychiatriques (Reissner *et al.*, 2014).

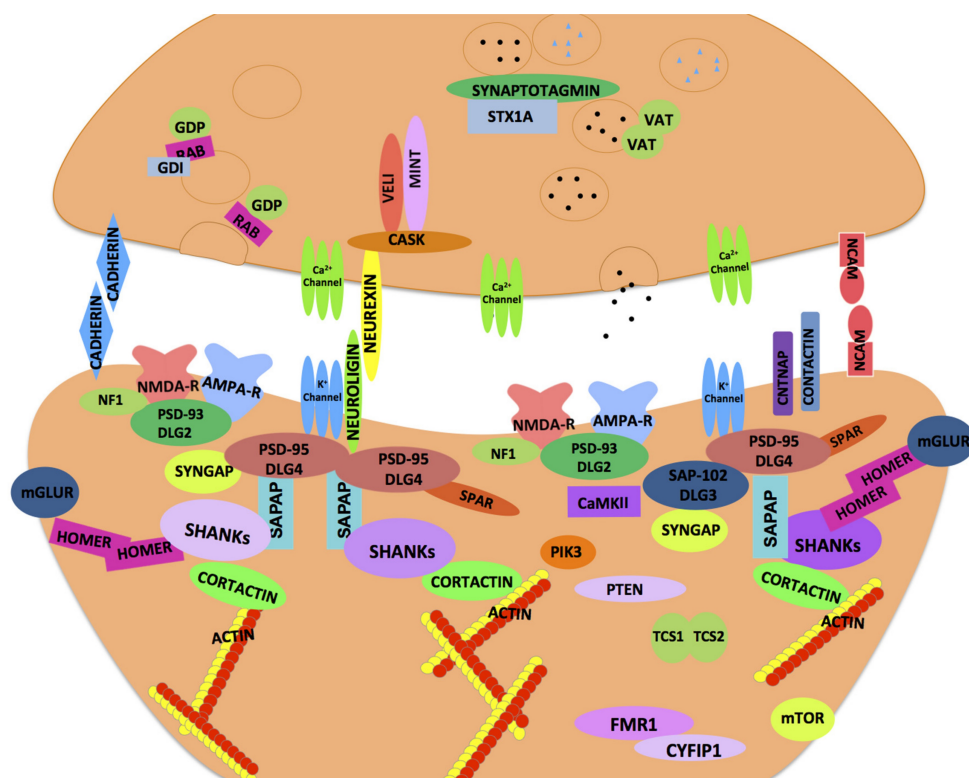


Figure 19 : Réseau protéique synaptique impliqué dans les maladies neurodéveloppementales.

Représentation schématique d'un ensemble de protéines pré- et post-synaptiques impliquées dans l'autisme. Ce réseau est composé de protéines transmembranaires (par exemple : Neurexine et Neurologine), de molécules d'adhésion cellulaire (comme la Cadherine et NCAM), de protéines d'échafaudage (par exemple : PSD-95, Cask et les protéines de la famille Shank) et des protéines du cytosquelette (comme Homer et Cortactin) qui permettent de faire les liens avec le cytosquelette d'actine (Banerjee *et al.*, 2014)

Chapitre V : Complexes protéiques synaptiques et autisme

V.1 : La jonction et l'organisation synaptique

Un neurone est une cellule excitable constituant l'unité fonctionnelle de base du système nerveux. Il assure la transmission de l'influx nerveux. Il est composé d'un corps cellulaire et de deux types de prolongements, un axone unique qui conduit le potentiel d'action et des dendrites qui sont en moyenne 7 000 par neurone (Figure 20A). On observe, sur les dendrites, des épines dendritiques qui permettent le contact avec un autre neurone en créant une zone de contact, la synapse. Un cerveau humain contiendrait environ un million de milliard (10^{15}) de synapses.

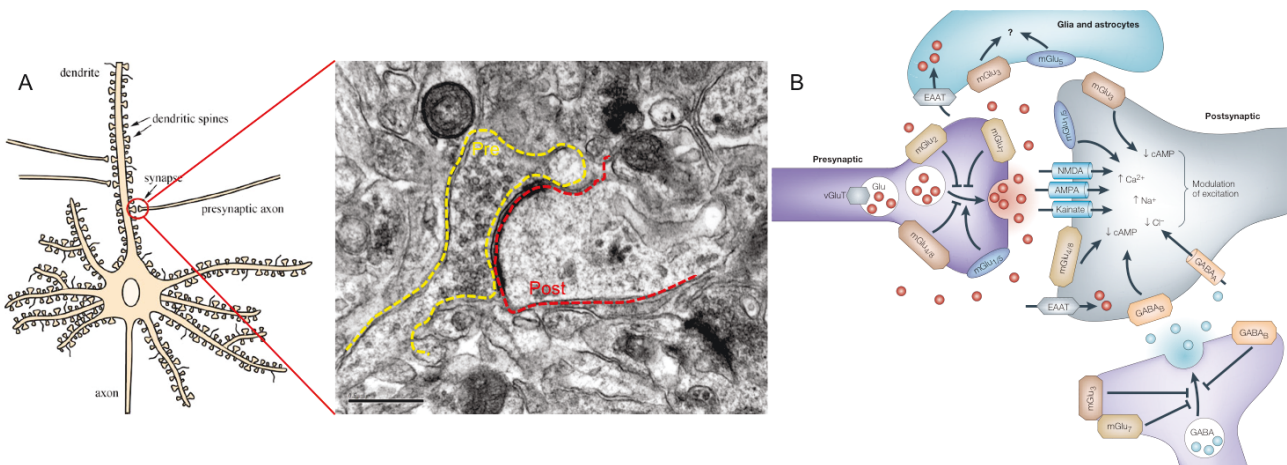


Figure 20: Structure et organisation d'une cellule neuronale et d'une jonction synaptique

(A) Représentation schématique d'un neurone. Les dendrites comprennent des épines dendritiques qui vont permettre d'établir des contacts avec d'autres neurones en formant des synapses (Smrt et Zhao, 2010). La structure synaptique comprend trois zones, la région pré- et post-synaptique et la fente synaptique (Section d'un cerveau adulte de souris en microscopie électronique). La ligne jaune et la ligne rouge représentent respectivement les contours de la zone pré-synaptique et post-synaptique. L'espace entre les deux lignes est la fente synaptique (B) Représentation schématique de terminaisons synaptiques glutamatergiques et GABAergiques (Swanson *et al.*, 2005).

La structure synaptique est divisée en trois compartiments (Figure 20) :

- Le bouton pré-synaptique qui contient les vésicules synaptiques remplies de neurotransmetteurs.
- La fente synaptique qui est la région où sont libérés les neurotransmetteurs qui vont pouvoir aller activer des récepteurs.
- La terminaison post-synaptique, riche en protéines, qui va pouvoir conduire l'information donnée par les neurotransmetteurs lorsqu'ils vont se fixer sur les récepteurs cibles (Kandel *et al.*, 2000).

Les synapses peuvent être classées en fonction du neurotransmetteur qu'elles libèrent : les synapses glutamatergiques (majoritaires dans le cerveau), GABAergiques, cholinergiques (localisées dans les jonctions neuromusculaires) et adrénergiques (répondant à l'adrénaline et à la noradrénaline) (Perea *et al.*, 2009).

Quelques travaux ont proposé l'hypothèse que les TSA peuvent être liés à une hypo- (Carlsson, 1998) ou hyper- (Bejjani *et al.*, 2012) activation des récepteurs glutamatergiques.

V.2 : La synapse glutamatergique

La synapse glutamatergique est une synapse chimique excitatrice, qui va répondre au glutamate qui représente le principal neurotransmetteur excitateur dans le SNC chez les mammifères. Celui-ci va en particulier activer les récepteurs métabotropiques et ionotropiques. Le glutamate est produit au sein des mitochondries des neurones pour être ensuite stocké dans les vésicules neuronales. Lorsqu'un potentiel d'action est généré, le glutamate est libéré dans la fente synaptique, et va se lier aux récepteurs post-synaptiques (Figure 21; Meldrum, 2000; Heath et Shaw, 2002).

V.2.1 : Les récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques ont pour rôle de moduler les propriétés des canaux ioniques en réponse à la fixation du neurotransmetteur. Ils vont changer leur conformation afin d'activer une cascade de signalisation intracellulaire. Ces récepteurs sont généralement couplés à des molécules associées à la membrane appelées protéine-G, car elles ont la propriété de lier le GTP. Les récepteurs métabotropiques comprennent sept domaines transmembranaires reliés par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires (Figure 21B; Alexander et Godwin, 2006). Il existe 3 groupes de récepteurs métabotropiques avec un total de huit sous-types (Figure 21A, partie de gauche; Swanson *et al.*, 2005). Le groupe I (mGluR1 et mGluR5) va stimuler la phospholipase C et l'hydrolyse de la phosphoinositide. En général, les récepteurs de ce groupe sont excitateurs, et vont promouvoir la libération de neurotransmetteurs, potentialiser la réponse des récepteurs ionotropiques et moduler différents courants dépolarisants (Anwyl, 1999). Les récepteurs du Groupe II (mGluR2 et mGluR3) et III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8) vont inhiber l'AMPC et bloquer la libération de neurotransmetteurs. Au niveau de l'axone, ceux-ci peuvent induire l'inhibition des canaux calciques et l'activation des canaux potassiques (Anwyl, 1999). Tous ces récepteurs se situent du côté pré- ou post-synaptique. On observe que les récepteurs

mGluR3 et mGluR5 sont aussi retrouvés au niveau des cellules gliales et des astrocytes (Figure 20; Swanson *et al.*, 2005).

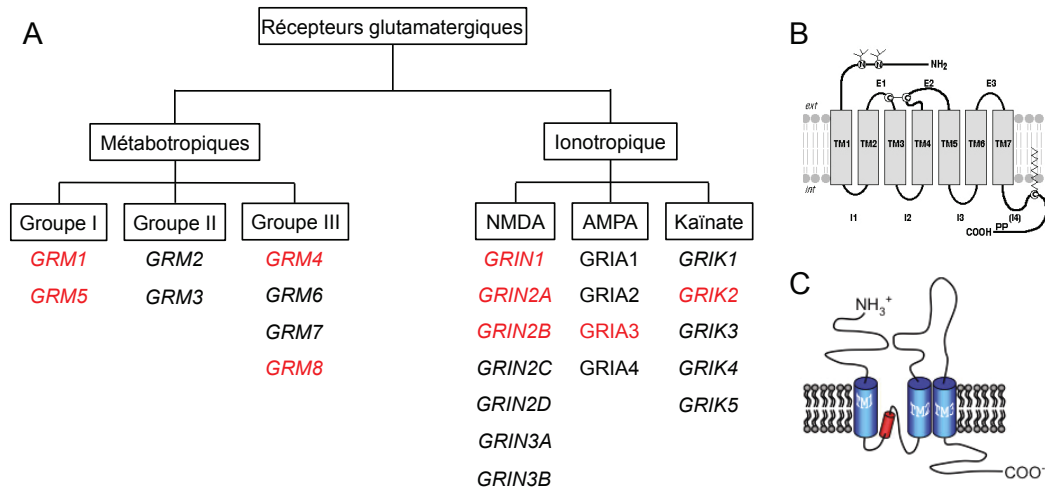


Figure 21 : Représentation des deux types de récepteurs glutamatergiques

Il existe deux types de récepteurs glutamatergiques, (A) les récepteurs métabotropiques (à gauche) qui sont divisés en 3 groupes et les récepteurs ionotropiques (à droite) divisés en 3 types qui sont NMDA, AMPA et Kaïnate. Les gènes déjà connus impliqués dans l'autisme sont en rouge. (B & C) Représentation schématique de la structure 2D d'un récepteur métabotrope (B) et ionotrope (C)

V.2.2 : Récepteurs ionotropiques

Les récepteurs ionotropiques ont un rôle clé dans la transmission et la plasticité synaptique, dans le développement neuronal, dans l'apprentissage et la mémoire. En réponse aux neurotransmetteurs, ils vont former des canaux ioniques. Ils sont généralement sélectifs à un type d'ion tel que Ca^{2+} , Na^+ , K^+ ou Cl^- . Il existe trois formes de récepteurs ionotropiques, qui sont le récepteur NMDA (*N*-méthyle-*D*-aspartate), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate acide) et Kaïnate (Figure 21A, partie de droite, Collingridge *et al.*, 2008).

Structurellement, ils vont former des tétramères qui sont codés par 16 gènes, dont plusieurs subissent un épissage alternatif ou une édition de l'ARN, ce qui permet d'obtenir des propriétés physiologiques différentes. Ils ont quatre domaines distincts, un domaine extracellulaire N-terminal, un domaine extracellulaire de liaison au ligand, un domaine transmembranaire et un domaine carboxy-terminal intracellulaire (Figure 21C; Traynelis *et al.*, 2010). Les récepteurs NMDA sont des hétérotétramères composés de deux sous-unités *GRIN1*, et de deux sous-unités *GRIN2A-D*, ou deux sous-unités *GRIN1* avec une sous-unité *GRIN2A-D* et une *GRIN3A-B*. Les récepteurs AMPA sont constitués des homo- ou hétérotétramères formés à partir de ses quatre sous-unités GRIA1-4. Enfin, les récepteurs Kaïnates sont des hétérotétramères formés à partir de leurs 5 sous-unités respectives GRIK1 à 5 (Uzunova *et al.*, 2014).

Les récepteurs NMDA et AMPA vont avoir un profil d'expression spécifique au cours du développement : les synapses immatures ne vont exprimer que des récepteurs NMDA alors que les récepteurs AMPA seront exprimés plus tard lors du développement (Hall *et al.*, 2007). En outre, les récepteurs NMDA vont inhiber l'expression des récepteurs AMPA lors du développement du SNC (Adesnik *et al.*, 2008)

V.2.3 : Le protéome post-synaptique

La région post-synaptique comprend un grand nombre de protéines (environ 1 120), définissant le protéome post-synaptique (PSP) (Figure 22). Plusieurs complexes multi-protéiques sont retrouvés :

- La densité post-synaptique (PSD) est constituée de 1 080 protéines appartenant à différentes classes et représentant un large éventail de fonctions cellulaires comme les récepteurs membranaires (y compris les récepteurs au glutamate), les canaux ioniques, les protéines d'adhésion, de signalisation, les adaptateurs, les protéines impliquées dans le transport, le métabolisme de l'ARN et dans la transcription et la traduction (Grant *et al.*, 2005; Laumonier *et al.*, 2007).
- Les complexes protéiques sont liés aux récepteurs glutamatergiques. Chaque récepteur est relié à un réseau protéique propre, mais on constate que ceux-ci sont finalement interconnectés au sein de la région post-synaptique (Figure 22). Le complexe NRC/MASC (*N*-methyl-D-aspartate *r*eceptor *c*omplex / *m*embrane-associated guanylate kinase-associated *s*ignalling *c*omplex) associe 186 protéines liées au récepteur NMDA, le complexe AMPA-R est composé de 9 protéines, liées au récepteur AMPA et le complexe mGluR5-R, comprend 52 protéines, liées aux récepteurs mGluR.

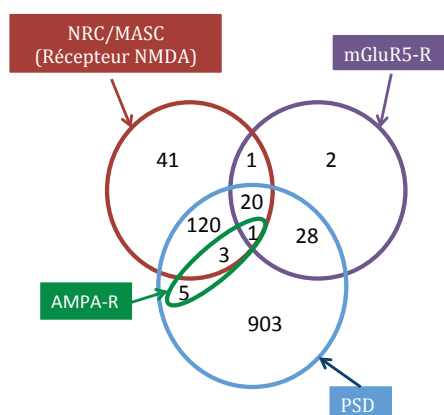


Figure 22 : Protéome post-synaptique de la synapse glutamatergique

Diagramme de Venn représentant les complexes protéiques appartenant au PSP (Adapté de Laumonier *et al.*, 2007). D'après la base de données G2C (<http://www.genes2cognition.org/>).

V.3 : Le complexe NRC/MASC : Cible privilégiée dans l'autisme ?

La connectivité synaptique dans le cerveau est le résultat d'un équilibre subtil entre la synaptogenèse et le modelage de la synapse. Lors du développement il y a un affinement des circuits neuronaux induit par des changements dans la connectivité, qui pourrait être à l'origine de la formation de la mémoire et de l'acquisition des comportements. Des perturbations de cet équilibre vont entraîner un développement anormal du cerveau, ce qui peut conduire à des troubles neuropsychiatriques (Gambrill et Barria, 2011).

Le récepteur NMDA joue un rôle central dans les processus liés à l'apprentissage, à la mémoire et au développement synaptique. Il est composé de 4 sous-unités, et présente un haut niveau d'expression dans le SNC. Son nombre, sa localisation, sa composition en sous-unités sont strictement régulés et différent entre les synapses et au cours du développement (Sanz-Clemente *et al.*, 2013). Il est observé que les sous-unités NR2A, codée par *GRIN2A*, et NR2B, codée par *GRIN2B*, du récepteur NMDA sont différenciellement exprimées au cours du développement. Le ratio de sous-unités NR2A/NR2B va permettre de contrôler le taux de formation des synapses et leur maturation. Les deux sous-unités n'auraient pas du tout le même rôle dans la formation des synapses et une modification dans leurs proportions et répartitions pourrait être néfaste pour le développement neuronal (Gambrill et Barria, 2011).

Les récepteurs NMDA sont des canaux cationiques perméables au sodium, potassium et au calcium. L'activation des récepteurs NMDA, et l'augmentation de Ca^{2+} dans la région post-synaptique qui en découle, constituent un déclencheur de la plasticité synaptique, une cascade d'événements est alors activée et va modifier considérablement l'efficacité synaptique et la morphologie neuronale. Classiquement, l'activation des récepteurs NMDA peut conduire à une potentialisation ou à une dépression synaptique en fonction de la quantité et la cinétique de l'afflux de Ca^{2+} .

Ainsi une entrée massive de Ca^{2+} conduit à un renforcement synaptique, il s'agit alors d'une potentialisation à long terme (LTP). La LTP est définie par une augmentation du nombre de récepteurs AMPA insérés à la membrane et par un élargissement de la région post-synaptique. En revanche, un influx plus faible de Ca^{2+} sur un temps plus long déclenche l'induction de la dépression à long terme (LTD), qui se traduit par une diminution de l'efficacité synaptique par la suppression des récepteurs AMPA à la membrane et par un rétrécissement de l'épine dendritique (Holtmaat et Svoboda, 2009). Des modifications dans les

sous-unités du récepteur AMPA, et potentiellement dans le complexe qui lui est lié, peuvent avoir un impact sur le neurodéveloppement.

Le complexe NRC/MASC, qui est lié au récepteur NMDA, est le deuxième complexe le plus important de la région post-synaptique de la synapse glutamatergique. Il est composé de 186 protéines (Tableau 4), incluant des canaux ioniques et des récepteurs (12), des protéines d'échafaudage (20), des enzymes de type kinase (23) ou phosphatase (7), des protéines G et des modulateurs (19), des molécules et des enzymes de signalisation (40), des protéines de la transcription et de la transduction (5), des molécules du cytosquelette et de l'adhérence cellulaire (34), des protéines des vésicules synaptiques et de transport des protéines (22) (Grant *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2006).

Tableau 4 : Liste des gènes du complexe NRC/MASC

Symbole	Localisation	Protéome Synaptique			Base de données			
		PSD	AMPA-R	mGluR5	SFARI		AutismKB	
					Gène	CNV	SNV	CNV
Canaux et récepteur(s):								
Récepteurs au Glutamate :								
<i>GRIK2</i>	6q16.3	■			X	X	X	X
<i>GRIN1</i>	9q34.3	■			X	X		X
<i>GRIN2A</i>	16p13.2			■	X	X	X	X
<i>GRIN2B</i>	12p13.1				X	X	X	
<i>GRM1</i>	6q24.3	■			X	X		
<i>GRM5</i>	11q14.2-q14.3			■	X	X	X	
Ca²⁺ ATPases :								
<i>ATP2B4</i>	1q32.1	■				X	X	
Na⁺/K⁺ ATPase :								
<i>ATPIA1</i>	1p13.1	■	■	■		X		
<i>ATPIA3</i>	19q13.2	■		■		X		X
Canaux anioniques voltage-dépendants :								
<i>VDAC1</i>	5q31.1	■				X		
<i>VDAC2</i>	10q22.2					X		
Autres canaux et récepteurs :								
<i>SLC1A2</i>	11p13	■					X	
MAGUK/adaptateurs/Protéines d'échafaudage :								
Protéines d'échafaudage avec domaines PDZ :								
<i>DLG1</i>	3q29	■				X		X
<i>DLG2</i>	11q14.1	■				X		X
<i>DLG3</i>	Xq13.1	■				X	X	
<i>DLG4</i>	17p13.1	■			X	X		X
<i>HOMER1</i>	5q14.1			■	X	X	X	X
<i>MPP2</i>	17q21.31	■				X		X
<i>MPP3</i>	17q21.31	■				X		X
<i>SHANK1</i>	19q13.33	■		■	X	X		
<i>TJP1</i>	15q13.1	■				X		X

Chapitre V : Complexes protéiques synaptiques et autisme

Symbole	Localisation	Protéome Synaptique			Base de données			
		PSD	AMPA-R	mGluR5	SFARI	AutismKB		
					Gène	CNV	SNV	CNV
Protéines d'échafaudage sans domaines PDZ :								
<i>AKAP5</i>	14q23.3	■						
<i>AKAP9</i>	7q21.2	■				X		
<i>APPL1</i>	3p14.3							X
<i>DLGAP1</i>	18p11.31	■				X		
<i>GNB2L1</i>	5q35.3					X		X
<i>GRB2</i>	17q25.1	■				X		
<i>MAPK8IP1</i>	11p11.2					X		
14-3-3 :								
<i>YWHAE</i>	17p13.3	■			X	X		X
<i>YWHAG</i>	7q11.23			■		X		X
<i>YWHAH</i>	22q12.3							X
<i>YWHAZ</i>	8q22.3							
Ser/thr kinases :								
<i>AKT2</i>	19q13.2	■						X
<i>CAMK2A</i>	5q32	■						
<i>CAMK2B</i>	7p13	■				X		X
<i>DUSP4</i>	8p12							X
<i>GSK3B</i>	3q13.33	■			X			
<i>MAP2K1</i>	15q22.31	■				X		X
<i>MAP2K2</i>	19p13.3					X		X
<i>MAP2K3</i>	17p11.2					X		X
<i>MAP2K7</i>	19p13.2					X		X
<i>MAPK1</i>	22q11.21-q11.22	■			X	X		X
<i>MAPK10</i>	4q21.3					X		X
<i>MAPK3</i>	16p11.2				X	X	X	X
<i>PDPK1</i>	16p13.3					X		X
<i>PRKACB</i>	1p31.1	■				X		X
<i>PRKAR2B</i>	7q22.3							X
<i>PRKCB</i>	16p12.2-p12.1				X			
<i>PRKCE</i>	2p21					X		X
<i>PRKCG</i>	19q13.42	■						X
<i>RAF1</i>	3p25.2					X	X	X
<i>RPS6KA3</i>	Xp22.12	■			X	X	X	X
<i>STK39</i>	2q24.3	■			X	X		
Tyr kinases :								
<i>PTK2B</i>	8p21.2	■				X		X
<i>SRC</i>	20q11.23	■						
Protéines phosphatases :								
<i>PPP1CC</i>	12q24.11	■				X	X	X
<i>PPP2CA</i>	5q31.1					X		
<i>PPP2R1A</i>	19q13.41	■						
<i>PPP3CA</i>	4q24							X
<i>PPP5C</i>	19q13.32					X		
<i>PTPN11</i>	12q24.13	■			X	X		X
<i>PTPN5</i>	11p15.1					X		
Proteins G :								
<i>GNAS</i>	20q13.32	■			X		X	
<i>GNB1</i>	1p36.33	■				X		X
<i>GNB2</i>	7q22.1	■				X		X
<i>GNB4</i>	3q26.33					X		
<i>HRAS</i>	11p15.5	■			X	X	X	X
<i>RAB2A</i>	8q12.1					X	X	
<i>RAB37</i>	17q25.1					X		X

Chapitre V : Complexes protéiques synaptiques et autisme

Symbole	Localisation	Protéome Synaptique			Base de données			
		PSD	AMPA-R	mGluR5	SFARI	AutismKB		
					Gène	CNV	SNV	CNV
<i>RAB3A</i>	19p13.11					X		X
<i>RAB6A</i>	11q13.4					X		X
<i>RAC1</i>	7p22.1					X		X
<i>RALA</i>	7p14.1							X
<i>RAN</i>	12q24.33					X		X
<i>RAP2A</i>	13q32.1					X		
Modulateurs G :								
<i>CIT</i>	12q24.23					X		X
<i>FGD4</i>	12p11.21					X		X
<i>GAP43</i>	3q13.31				X	X		
<i>KALRN</i>	3q21.2						X	
<i>NF1</i>	17q11.2				X	X	X	
<i>SYNGAP1</i>	6p21.32				X	X		X
Molécules de signalisation et enzymes:								
Protéines de choc thermique/chaperones/chaperonines :								
<i>HSPA1B</i>	6p21.33					X		X
ATP synthases :								
<i>ATP5A1</i>	18q21.1							
<i>ATP5C1</i>	10p14					X		X
<i>ATP6V0D1</i>	16q22.1					X		X
<i>ATP6V1A</i>	3q13.2-q13.31					X		
NADH déshydrogénase :								
<i>NDUFV2</i>	18p11.22					X		
Autres molécules de signalisation :								
<i>ARC</i>	8q24.3					X	X	
<i>ARF3</i>	12q13.12					X		X
<i>ARNT</i>	1q21.3						X	
<i>BAD</i>	11q13.1							X
<i>CACNG2</i>	22q12.3					X		X
<i>CALB2</i>	16q22.2					X		X
<i>CALM1</i>	14q32.11					X		
<i>DNM1</i>	9q34.11					X		X
<i>FUS</i>	16p11.2						X	X
<i>IRS1</i>	2q36.3							
<i>NOS1</i>	12q24.22					X		X
<i>PLA2G4A</i>	1q31.1					X		X
<i>PLCB1</i>	20p12.3				X	X		X
<i>PLCG1</i>	20q12							
<i>SPINK5</i>	5q32							
<i>TP53BP1</i>	15q15.3					X		X
<i>VEGFA</i>	6p21.1					X		X
Autres enzymes:								
<i>ALDOC</i>	17q11.2							
<i>EHMT2</i>	6p21.33					X		X
<i>GLUL</i>	1q25.3					X		X
<i>LDHA</i>	11p15.1					X		
<i>LDHB</i>	12p12.1					X		X
<i>PFKL</i>	21q22.3					X		X
<i>PIK3CA</i>	3q26.32					X		
<i>PKLR</i>	1q22					X		X
<i>PRDX1</i>	1p34.1					X		
<i>PRDX2</i>	19p13.2					X		X
<i>TP11</i>	12p13.31					X		X

Chapitre V : Complexes protéiques synaptiques et autisme

Symbole	Localisation	Protéome Synaptique			Base de données			
		PSD	AMPA-R	mGluR5	SFARI	AutismKB		
					Gène	CNV	SNV	CNV
Enzymes mitochondriales :								
<i>ACO2</i>	22q13.2						X	X
<i>DLAT</i>	11q23.1							
<i>DPYSL2</i>	8p21.2					X		X
<i>GAPDH</i>	12p13.31					X		X
<i>GOT2</i>	16q21					X		X
<i>PRDX6</i>	1q25.1							
Transcription et traduction :								
Eléments de transcription :								
<i>GCFC1</i>	21q22.11							X
<i>PHB2</i>	12p13.31					X		X
Ribosome :								
<i>RPL13</i>	16q24.3					X		X
<i>RPL13A</i>	19q13.33							X
<i>RPL7</i>	8q21.11					X		
Cytosquelette et adhésion cellulaire :								
Actine/ARP :								
<i>ARPC2</i>	2q35							
<i>ARPC3</i>	12q24.11					X	X	X
<i>ARPC4</i>	3p25.3					X		X
Tubuline :								
<i>TUBA1A</i>	12q13.12					X	X	X
Actine :								
<i>ACTN2</i>	1q43					X		
<i>ACTN3</i>	11q13.2					X		X
<i>ACTN4</i>	19q13.2					X		X
Spectrine :								
<i>SPTBN1</i>	2p16.2							X
MAPs :								
<i>MAP2</i>	2q34				X	X		X
Caténines :								
<i>CTNNB1</i>	3p22.1				X	X	X	
Myéline :								
<i>MBP</i>	18q23					X		X
<i>MOG</i>	6p22.1							
<i>PLP1</i>	Xq22.2					X		
Autres protéines du cytosquelette :								
<i>ABLIM1</i>	10q25.3					X		
<i>ADAM22</i>	7q21.12					X	X	
<i>BSN</i>	3p21.31					X		X
<i>CAPZA2</i>	7q31.2							X
<i>CAPZB</i>	1p36.13					X		X
<i>CSE1L</i>	20q13.13							
<i>CTTN</i>	11q13.3							X
<i>DBN1</i>	5q35.3					X		X
<i>DSG1</i>	18q12.1					X		
<i>FLNC</i>	7q32.1					X		X
<i>GSN</i>	9q33.2				X	X		X
<i>INA</i>	10q24.33					X		
<i>LMNB1</i>	5q23.2					X		
<i>NEFL</i>	8p21.2				X	X		X
<i>NEFM</i>	8p21.2					X		X
<i>SHANK2</i>	11q13.3-q13.4				X	X		X
<i>SLMAP</i>	3p14.3					X		X

Chapitre V : Complexes protéiques synaptiques et autisme

Symbole	Localisation	Protéome Synaptique			Base de données			
		PSD	AMPA-R	mGluR5	SFARI Gène	CNV	SNV	AutismKB CNV
Autres molécules d'adhésion cellulaire :								
<i>CDH2</i>	18q12.1	■				X		
<i>LICAM</i>	Xq28			■		X		X
<i>LGII</i>	10q23.33	■				X		X
<i>LIN7A</i>	12q21.31	■				X		X
Vésicules synaptiques/protéines de transport :								
Clathrine :								
<i>CLTC</i>	17q23.1	■		■			X	X
Vésicules synaptiques :								
<i>FABP5</i>	8q21.13	■		■	X	X		X
<i>NSF</i>	17q21.31	■		■		X		X
<i>RTNI</i>	14q23.1	■				X		
<i>SNAP25</i>	20p12.2	■				X		X
<i>STX1A</i>	7q11.23	■			X	X		X
<i>STXBPI</i>	9q34.11		■		X	X	X	X
<i>SYNGRI</i>	22q13.1	■		■		X		X
<i>SYTI</i>	12q21.2	■				X		X
Protéines de transport :								
<i>SLC25A12</i>	2q31.1	■			X	X		
<i>SLC25A22</i>	11p15.5	■				X		X
<i>SLC25A4</i>	4q35.1	■				X		X
<i>SLC25A5</i>	Xq24	■				X	X	
Protéines motrice :								
<i>KLC2</i>	11q13.2	■			X			X
<i>MYH10</i>	17p13.1	■				X	X	
<i>MYH11</i>	16p13.11	■				X		X
<i>MYH6</i>	14q11.2	■				X		X
<i>MYH9</i>	22q12.3	■				X		X
<i>MYL12B</i>	18p11.31	■				X		
<i>MYL6</i>	12q13.2	■				X		X
<i>MYO1B</i>	2q32.3	■				X		X
<i>MYO5A</i>	15q21.2	■				X		X
Non caractérisées/Nouvelles :								
<i>ATG16L1</i>	2q37.1					X		
<i>FAM171A1</i>	10p13					X		
<i>LCA5</i>	6q14.1					X		
<i>SERPINA3</i>	14q32.13	■				X		X

La liste est établie à partir des données issues du site Genes to Cognition (<http://www.genes2cognition.org/>). L'implication des gènes dans l'autisme a été évaluée à l'aide de la base de données SFARI Gene (Mise à jour Septembre 2014) et AutismKB (Mise à jour mai 2012).

L'implication du gène *GRIN2A* dans l'autisme a été évoquée pour la première fois dans une étude d'association (IMGSAC, 2001). En 2005, Barnby et collaborateurs ont repris les résultats de cette étude et ont effectué un TDT sur 239 familles multiplexes qui a permis de confirmer une association avec le gène *GRIN2A* (Barnby *et al.*, 2005). Par la suite d'autres études ont décrit des mutations (Tarabeux *et al.*, 2011) ou des CNV (Girirajan *et al.*, 2013B) dans ce gène. En outre, des variations ont également été observées chez des patients avec

encéphalopathie épileptique (Lesca *et al.*, 2012), mais aussi dans la DI (Endele *et al.*, 2010; De Ligt *et al.*, 2012).

En ce qui concerne le gène *GRIN2B*, la première mutation impliquée dans l'autisme n'a été découverte qu'en 2011 (O'Roak *et al.*, 2011), cependant des mutations dans ce gène avaient déjà été mises en évidence chez des patients schizophrènes (Ohtsuki *et al.*, 2001), et dans la DI (Endele *et al.*, 2010).

Dans les principales bases de données génétiques pour l'autisme, SFARI Gene (Basu *et al.*, 2009) et AutismKB (Xu *et al.*, 2012), des mutations localisées dans les gènes qui codent les protéines du complexe NRC/MASC ont également été caractérisées (Tableau 4). Ce complexe est un assemblage très organisé et structuré de nombreuses protéines (Figure 23A). Des altérations de ce réseau peuvent engendrer des défauts dans la structure du complexe et aboutir à une atteinte neurodéveloppementale (Ebert et Greenberg, 2013; Grant, 2013).

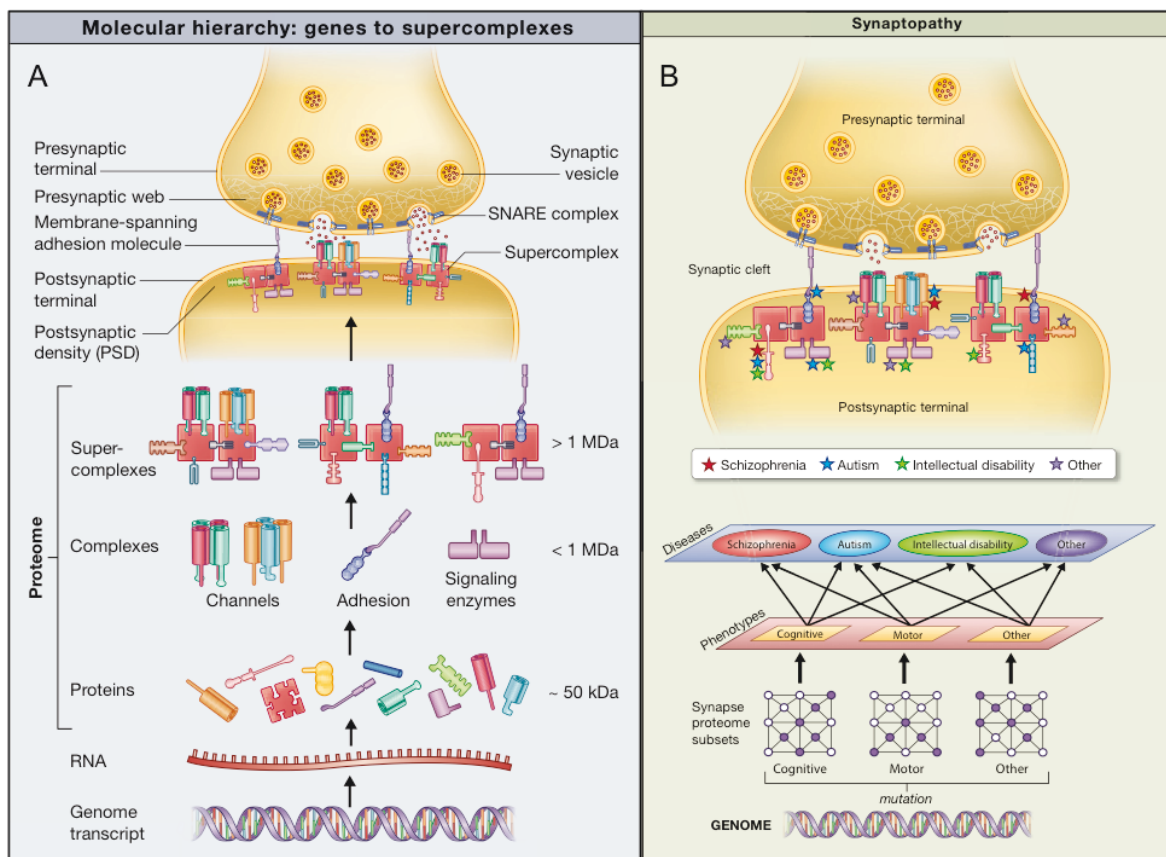


Figure 23: Hiérarchie moléculaire et synaptopathie

A : Les protéines, codées par les gènes, vont former des complexes (Canaux, Molécules d'adhésion, enzymes de signalisation...) qui vont s'associer et former des supercomplexes, tels que les différents complexes de la PSP. Ceux-ci vont alors être retrouvés à la synapse et permettre son bon fonctionnement. B : Lorsque des mutations arrivent dans les gènes qui codent ces protéines, différentes maladies peuvent se développer, elles sont appelées synaptopathies. En effet des mutations dans ces protéines vont pouvoir avoir une influence sur la formation du supercomplexe et donc induire son mauvais fonctionnement (Grant, 2013).

De la même manière que pour les sous unités du récepteur NMDA, on observe aussi que les gènes de ce complexe sont impliqués dans d'autres maladies neurodéveloppementales et neuropsychiatriques. Par exemple, le gène *RPS6KA3*, qui code une sérine/thréonine kinase, est impliqué dans l'autisme (O'Roak *et al.*, 2012), le syndrome de Coffin-Lowry (Merienne *et al.*, 1999), mais aussi dans l'épilepsie et les TDAH (Matsumoto *et al.*, 2013). Les mutations dans le gène *STXBPI* peuvent causer une encéphalopathie épileptique, mais aussi l'autisme, et DI (Campbell *et al.*, 2012). En ce qui concerne *SYNGAP1*, des mutations ont été identifiées dans l'autisme et l'épilepsie (Hamdan *et al.*, 2011) mais aussi dans la DI et le RD (De Ligt *et al.*, 2012; Brett *et al.*, 2014).

De manière générale, il existe un nombre significatif de gènes impliqués dans différentes pathologies neuropsychiatriques ciblant des défauts au niveau synaptique. Cela a récemment permis de mettre en avant le terme de synaptopathie (Grant, 2013). Les synaptopathies vont partager des gènes en commun et c'est l'association de certaines variations qui conduira à telle ou telle synaptopathie. Cela suggère l'impact du modèle multi-hit (Figure 23B; Girirajan *et al.*, 2010).

V.4 : Point sur les essais thérapeutiques

À ce jour, deux médicaments approuvés par la Food and Drug Administration sont proposés dans le cadre d'une opportunité thérapeutique pour l'autisme, à savoir le Risperidone et l'Aripiprazole. Ces antipsychotiques atypiques agissent sur la modulation des comportements répétitifs et vont avoir un faible effet sur le déficit en communication observé chez les patients avec autisme (McCracken *et al.*, 2002; Aman *et al.*, 2005; Farmer et Aman, 2011; Ching et Pringsheim, 2012).

Plus récemment, les dernières études se sont concentrées davantage sur les fonctions neuronales (Spooren *et al.*, 2012; Delorme *et al.*, 2013; Canitano, 2014). Les molécules pharmacologiques candidates vont viser la traduction des ARN et l'équilibre Excitation/Inhibition (E/I) des synapses neuronales.

Pour viser la régulation de la traduction des ARN, deux stratégies sont mises en place :

- La première consiste à cibler la voie PI3K-mTOR en utilisant la Rapamycine (Carson *et al.*, 2012). En effet cette voie est centrale pour la synthèse de protéines synaptiques et interagit avec les récepteurs métabotropiques et NMDA (Figure 18B). Enfin, elle est directement liée à la maintenance de la balance E/I (Wang et Doering, 2013).

- La deuxième technique vise à inhiber les actions des récepteurs métabotropiques du groupe I, mGluR1 et mGluR5 (Figure 21). Par exemple une diminution de 50% de l'expression de mGluR5 diminue la traduction protéique en excès et induit une amélioration du comportement dans le modèle de murin du FXS (Dölen *et al.*, 2007).

Des molécules visant les récepteurs excitateurs (glutamatergique) et inhibiteurs (GABAergique) sont utilisées (Spooren *et al.*, 2012; Delorme *et al.*, 2013; Canitano, 2014) pour moduler la balance E/I. Certaines ciblent les récepteurs AMPA (Silverman *et al.*, 2013), d'autres les récepteurs NMDA (Deutsh *et al.*, 2012), ou encore les récepteurs GABA_B (Henderson *et al.*, 2012). Par exemple le Bumétanide, dont l'action principale et initiale est d'agir sur la diurèse, est actuellement testé chez des patients avec autisme pour son effet sur l'inhibition des récepteurs GABAergiques (Lemonnier *et al.*, 2012).

On observe un intérêt croissant pour l'ocytocine, qui est une hormone impliquée notamment dans le développement social. En effet, la prise d'ocytocine en intra-nasale a pour effet d'augmenter l'initiative, la cognition sociale et la motivation (Bartz et Hollander, 2008; Andari *et al.*, 2010), et réduit les comportements répétitifs et restreints chez des autistes. Cependant les effets de l'ocytocine restent encore à clarifier (Barideau et Anagnostou, 2014).

Objectifs

Décrite pour la première fois il y a plus de 70 ans par Kanner puis par Asperger (Kanner, 1943; Asperger, 1944), l'autisme, et plus largement les troubles du spectre de l'autisme (TSA ou Autism spectrum disorders en anglais), est un trouble du développement du SNC dont la définition par le DSM-5 inclut des altérations des interactions sociales et de la communication, ainsi que des comportements restreints et répétitifs (American Psychiatric Association, 2013).

Bien que les causes et l'origine physiopathologiques des TSA soient à ce jour mal connus, les données étiologiques mettent en avant une forte composante génétique (Folstein et Rutter, 1977; Tordjman *et al.*, 2014), mais également l'influence de facteurs environnementaux (Huguet *et al.*, 2013; Zhubi *et al.*, 2014).

De façon globale, deux modèles génétiques sont proposés et mis en avant dans les TSA. D'une part, le modèle "Variant commun – Maladie fréquente" (*Common Variant - Common Disease - CVCD*) est basé sur l'association d'un grand nombre de variants communs (retrouvés à une fréquence >1% dans la population générale) dont la co-expression chez le sujet entraîne la maladie, alors que leur impact individuel est faible voire nul.

D'autre part, le modèle du "Variant Rare – Maladie fréquente" (*Rare Variant - Common Disease - RVCD*) suggère l'implication de variants rares (retrouvés à une fréquence <1% dans la population générale) ou *de novo* et ayant un risque significatif par un impact délétère connu ou prédict (Liu & Takumi, 2014). Ce modèle comprend en particulier les mécanismes multi-hit, c'est-à-dire l'association de plusieurs variants rares chez un patient hérités de chacun des deux parents (Girirajan *et al.*, 2010; Berg et Geschwind, 2012).

Plus de 300 gènes sont connus comme étant impliqués dans l'autisme (Betancur, 2011; Huguet *et al.*, 2013), à travers des variations du nombre de copies (CNV) et/ou des variations nucléotidiques (SNV).

De nombreux gènes codent des protéines participant à la structure et à la fonction synaptique, en particulier la région post-synaptique de la synapse glutamatergique. Le complexe multi-protéique associé au récepteur post-synaptique NMDA constitue une cible mutationnelle récurrente dans les pathologies du SNC, en particulier développementales (Laumonnier *et al.*, 2007).

Objectifs

L'objectif de la thèse a consisté à effectuer une étude génétique globale du complexe NRC/MASC, sur une cohorte de 96 patients atteints d'autisme (critère du DSM-IV) (Figure 24) et selon deux approches complémentaires :

- Une étude pangénomique réalisée en CGH array à haute résolution. Le but est de détecter la présence de variations structurales déséquilibrées délétères dans leur génome.
- Une étude de criblage génétique par capture ciblée d'exons et de séquençage à haut-débit. Un total de 216 gènes synaptiques dont 179 gènes appartenant au complexe NRC/MASC, a été étudié dans le but de détecter des variations nucléotidiques candidates.

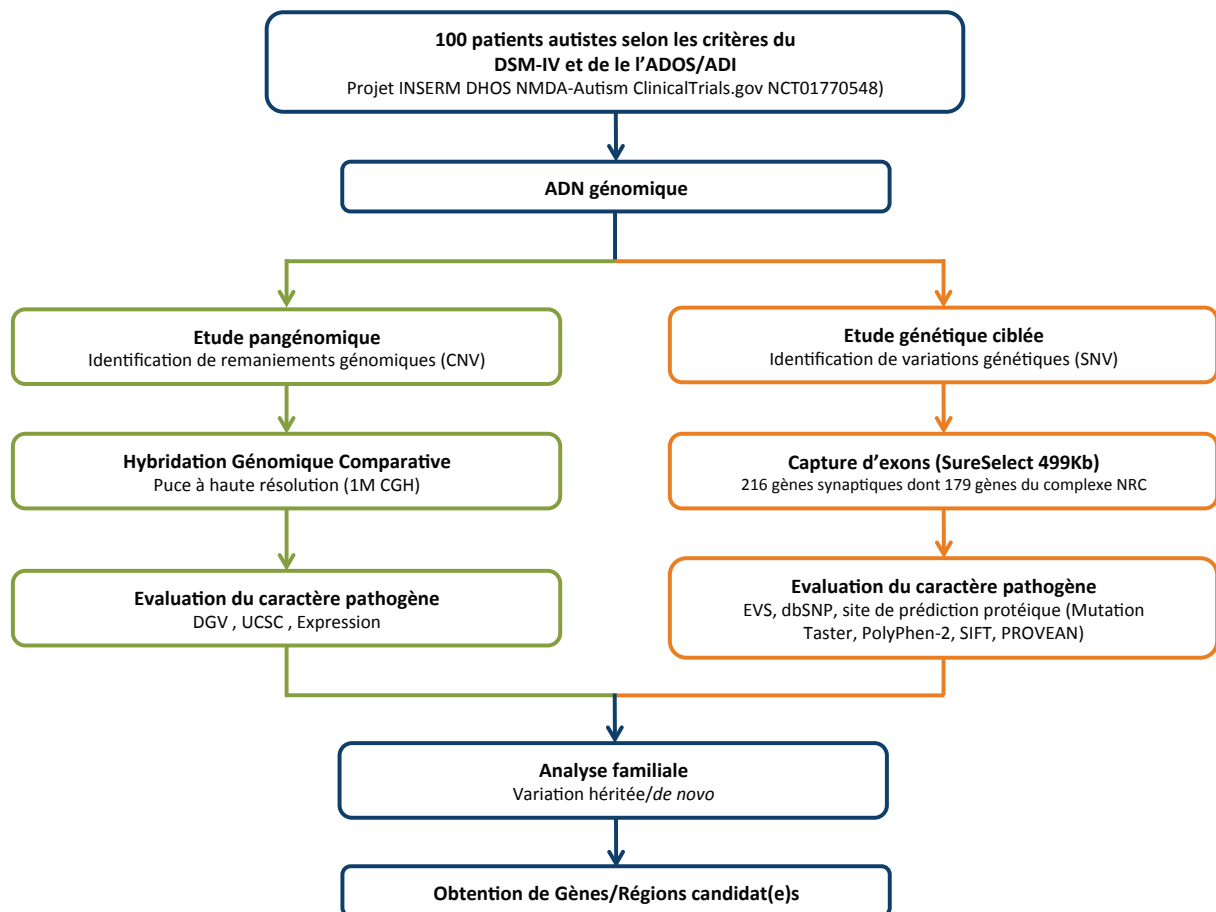


Figure 24 : Représentation schématique de l'objectif de la thèse

Matériels et Méthodes

Chapitre I : La population étudiée

La population des sujets autistes étudiée dans le cadre de cette thèse est issue d'un projet de recherche clinique translationnelle INSERM DHOS "Neurophysiological Molecular and Developmental Analysis of the Glutamate Synapse in Autism (NMDA-Autism)" co-porté par l'UMR Inserm U930 (coordinateur pour le projet, Pr F. Bonnet-Brilhault) et le CIC-0202 du CHRU de Tours (coordinateur initial Pr P Goupille). Il porte la référence Clinical Trial NCT01770548.

L'objectif de ce projet a consisté à identifier des marqueurs cliniques, génétiques et neurophysiologiques dans l'autisme associés à des anomalies de la synapse glutamatergique, par l'utilisation d'approches multidisciplinaires et complémentaires :

- Étude clinique : diagnostic positif, niveau de développement, profils développementaux, croissance cérébrale pré et postnatale, signes morphologiques mineurs.
- Étude électrophysiologique : étude des potentiels évoqués auditifs (PEA) avec examen de la réponse corticale appelée Mismatch Negativity (MMN). Cette approche est effectuée systématiquement chez les sujets porteurs d'une mutation pathogène probable.
- Étude génétique : Recherche de CNV et étude des gènes du protéome lié au récepteur NMDA.

Les patients recrutés ne présentent ni syndrome de l'X fragile ni Angelman, et sont âgés de plus de 2 ans. Le projet prévoit également d'inclure les parents et les apparentés. Enfin, une cohorte de 200 témoins majeurs (caucasien, âge entre 18 et 45 ans, absence de pathologie neuropsychiatrique également au sein de leur famille) a été créée spécifiquement pour ce projet. Des témoins mineurs sont recrutés spécifiquement par le CHRU de Tours pour l'étude électrophysiologique (Figure 25).

Cette étude est en outre multicentrique avec la participation du Centre Ressources Autisme (CRA) de Bretagne (Pr Eric Lemonnier) et l'UMR Inserm 1079 de Rouen (Dr Dominique Champion et Pascal Saugier-Veber).

Chapitre I : La population étudiée

La contribution de chaque centre dans le recrutement des sujets et/ou familles est la suivante :

- Inserm UMR 930 /CHRU Tours : 38 sujets et 69 apparentés
- CRA Bretagne : 28 sujets et 60 apparentés
- Inserm UMR1079 : 30 sujets et 17 apparentés

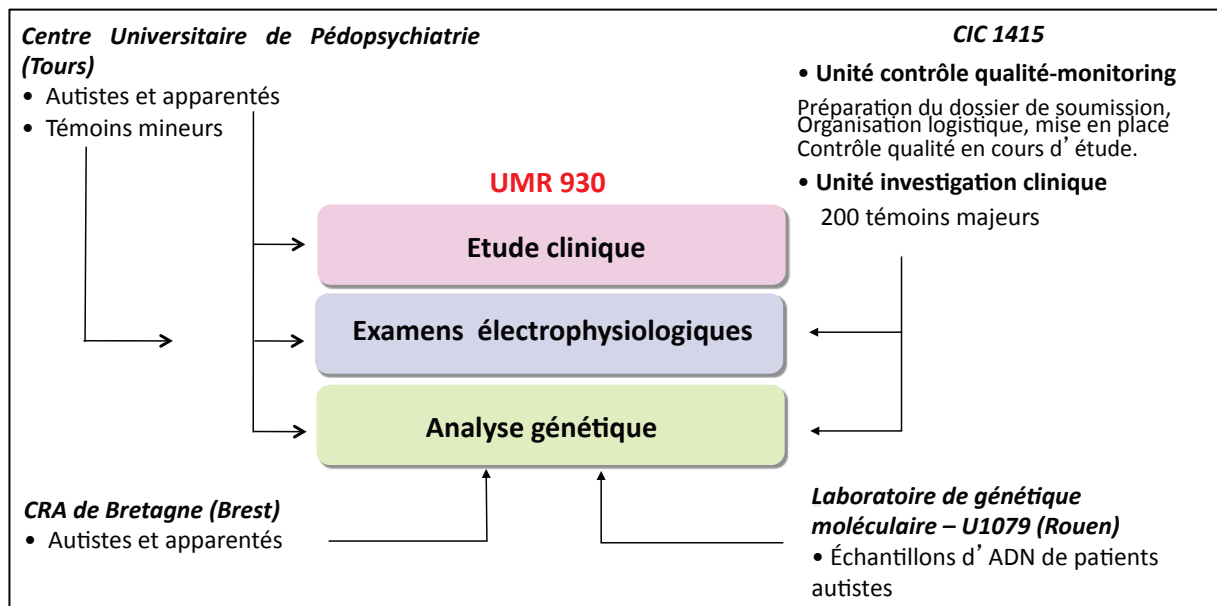


Figure 25 : Schéma d'organisation du projet Autism-NMDA pour l'établissement de la population des sujets autistes

Chapitre II : Étude pangénomique

La première partie du travail de thèse a consisté à rechercher la présence éventuelle chez les patients autistes de variations structurales dans leur génome grâce aux approches technologiques d'Hybridation Génomique Comparative sur puce (CGH array) et de PCR quantitative en temps réel (qPCR).

II.1 : L'Hybridation Génomique Comparative sur puce (CGH array)

II.1.1 : Principe

La CGH array est une technique qui consiste à hybrider sur une même puce l'ADN du patient marqué avec une cyanine (Cy5 – fluorochrome rouge) et un ADN de référence, du même sexe que le patient, marqué à la Cy3 (fluorochrome vert). Nous avons utilisé la puce ayant la plus haute résolution fournie par Agilent Technologies (Santa Clara, CA), et contenant près d'un million de sondes oligonucléotidiques [SurePrint G3 Human CGH microarray 1x1M (G4447A)]. Le plateau technique de CGH array de l'université de Tours (PPF) est en effet équipé d'un scanner de lames Agilent.

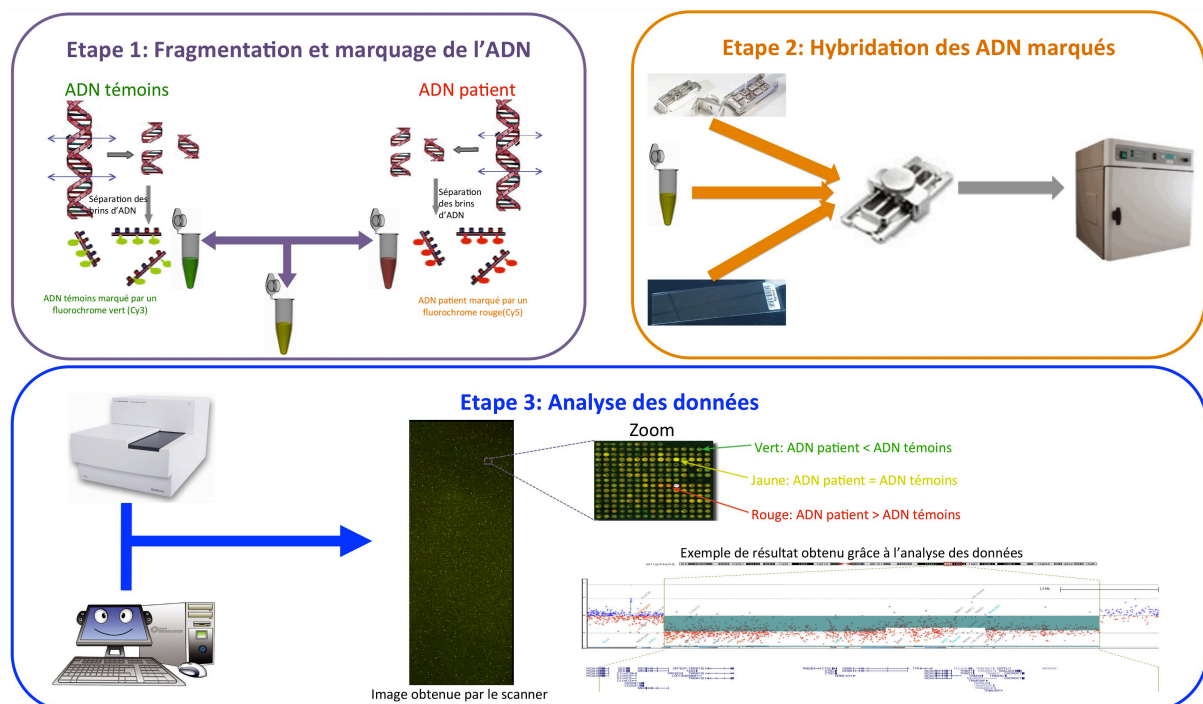


Figure 26 : Représentation schématique des différentes étapes de la CGH array

La première étape de la CGH array consiste à fragmenter l'ADN du patient et de la référence puis à les marquer avec la Cy5 et la Cy3 respectivement. Lors de la deuxième étape, les deux ADN sont hybridés sur la même puce puis l'ensemble est incubé durant 40h à 65°C. La dernière étape est l'analyse bioinformatique des données permettant de déterminer les CNV candidats.

Chapitre II : Etude pangénomique

Nous avons suivi le protocole de préparation et d'hybridation des échantillons indiqué par le fournisseur (Agilent Oligonucleotide Array-Baser CGH for Genomic DNA Analysis, Version 7.1, December 2011).

II.1.2 : Protocole

La première étape est le marquage des ADN du patient et de la référence, à la cyanine 3 ou 5 respectivement. Pour cela, 0,5 µg d'ADN du patient et de l'ADN de la référence sont digérés à l'aide de deux enzymes de restriction AluI et RsaI pendant 2 heures à 37°C. Les enzymes sont ensuite inactivées 20 minutes à 65°C. Les fragments d'ADN digéré obtenus (taille de 200 à 500 pb) sont ensuite marqués grâce à l'incorporation des cyanines via l'Exo (-) Klenow pendant 2 heures à 37°C. La réaction est interrompue par l'inactivation des enzymes à 65°C pendant 10 minutes (Figure 26, Étape 1).

La deuxième étape est l'hybridation des ADN sur la puce. Les deux ADN marqués sont ensuite mélangés dans un tampon d'hybridation et en présence d'un excès d'ADN Cot-1 (25 µg) puis sont co-hybridés sur la puce SurePrint G3 Human CGH microarray 1x1M (G4447A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). L'ensemble est ensuite incubé pendant 40h dans un four d'hybridation à 65°C sous rotation lente à 20 rpm. Le mouvement de rotation lente permet au mélange d'hybridation d'accéder à toutes les sondes qui se trouvent sur la puce et de s'y hybrider (Figure 26, Étape 2).

Lors de la troisième étape, la puce est ensuite analysée dans un scanner (SureScan Microarray Scanner G2600D) à l'aide du logiciel Scan Control Software Version 9.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). L'image obtenue est composée de points verts, rouges et jaunes, en fonction de l'hybridation de l'ADN sur les sondes oligonucléotidiques de la puce (Figure 26, Étape 3).

II.1.3 : Analyse des données

L'analyse de l'image brute est effectuée par les logiciels Feature Extraction Software version 10.7.3 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) et Agilent CytoGenomics Edition 2.0.6.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Les données brutes sont extraites à l'aide du logiciel Feature Extraction auquel on fournit l'image et le détail de la grille associée à la puce (021529_20111015). La grille est caractérisée par un fichier spécifiant la correspondance de chaque point sur la puce avec la localisation de l'oligonucléotide sur le génome. Les données sont extraites avec le protocole CytoCGH_0105_May11 qui fait le lien entre les régions chromosomiques et les points sur la puce. Il permettra également d'estimer la qualité de

l'hybridation sur la puce et s'il y a besoin d'éliminer des points. On obtient alors un nouveau fichier qui va être analysé à l'aide du logiciel Agilent CytoGenomics Edition 2.0.6.0 avec l'algorithme ADM-2 (Aberration Detection Method-2; Annexe 1).

Ce fichier regroupe toutes les variations structurales retrouvées chez nos patients, et une représentation graphique de chaque sonde dans le génome (Figure 26, Étape 3).

En moyenne le logiciel nous a permis de détecter en moyenne 120 remaniements par patient. Sur ces remaniements, différents filtres sont utilisés pour effectuer un tri sélectif des CNV (Figure 27). Tous les remaniements observés chez la référence sont d'abord exclus. En effet, nous avons passé au préalable sur le même format de puce l'ADN de référence masculin marqué à la Cy3 avec l'ADN de référence féminin à la Cy5. Cette hybridation nous permet alors d'éliminer les CNV présents chez chacun des deux ADN de référence et d'exclure ces régions candidates chez les patients autistes.

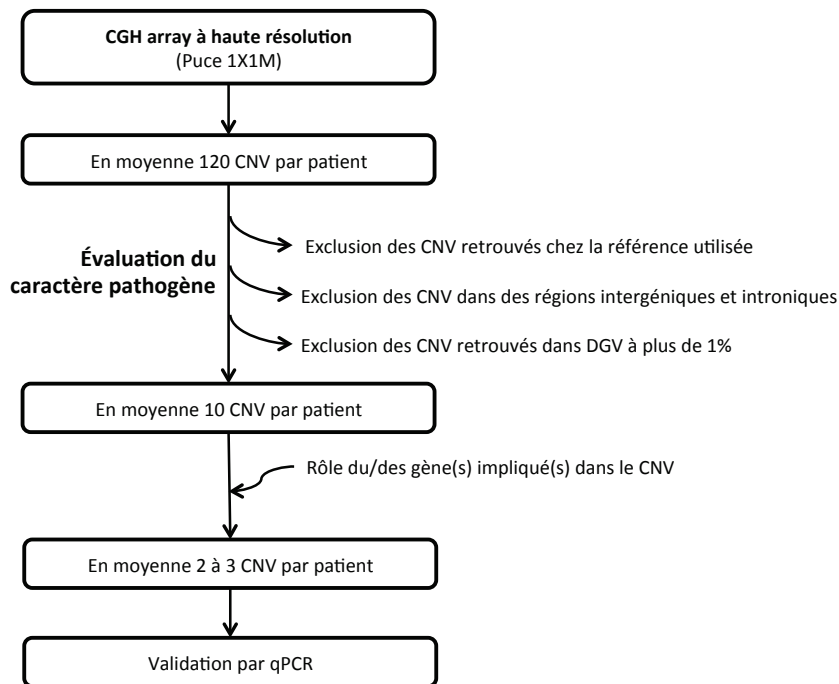


Figure 27 : Protocole d'analyse pour la CGH array

Dans le cadre de cette thèse, nous avons décidé de nous concentrer sur les variants rares à effet majeur, pour cela nous avons utilisé 3 critères de sélection qui nous ont fait conserver en moyenne 10 variations structurales. Le rôle des gènes inclus dans les CNV a été ensuite évalué par la littérature scientifique. Les CNV les plus intéressants ont été vérifiés en qPCR.

Les CNV restants ont été analysés à l'aide du site internet UCSC (Kent *et al.*, 2002; <http://genome.ucsc.edu/>) afin de les trier en remaniements exoniques, introniques ou intergéniques. Dans ce travail, nous avons décidé d'éliminer les CNV intergéniques, car leur interprétation est peu évidente. Il sera cependant intéressant de les étudier ultérieurement car ils pourraient avoir un impact sur des séquences non codantes pouvant réguler l'expression

des gènes ou encore avoir un effet sur le repliement de l'ADN. Nous avons aussi exclu dans un premier temps les CNV introniques bien que ceux-ci puissent avoir un effet modificateur sur l'épissage du gène cible par exemple.

Pour tous les CNV exoniques, c'est-à-dire impliquant entre un exon et plusieurs gènes, nous cherchons s'ils sont retrouvés dans la population générale, à l'aide de la base de données DGV (Database of Genomic Variants; MacDonald *et al.*, 2014). Si les CNV candidats sont retrouvés à plus de 1% dans la population générale, nous les considérons comme étant un CNP. Dans notre étude nous avons privilégié les CNV retrouvés dans moins de 1% de la population générale, critère principal pour définir le CNV rare.

Cette classe de CNV, peu ou pas observée dans les populations contrôles, constitue ainsi le noyau de nos analyses en CGH array. Les gènes inclus dans ces régions candidates sont analysés par rapport à leur profil d'expression, en particulier neurodéveloppemental. De manière intéressante, il semble que davantage de variations dans les gènes à expression neuronale soient retrouvées chez les autistes qu'au sein de la population générale (Huguet *et al.*, 2013). Chaque CNV candidat est enfin analysé en qPCR chez le patient et ses parentés afin de valider sa présence et son mode de transmission de manière formelle.

II.2 : La PCR quantitative en temps réel

Tous les CNV observés en CGH array et ayant passés les filtres de sélection ont été vérifiés en PCR quantitative en temps réel (qPCR) chez nos patients et leurs parentés, par au moins deux expériences indépendantes.

II.2.1 : Principe

La technique de qPCR consiste à réaliser une amplification d'un fragment d'acide nucléique par PCR en présence d'un agent fluorescent (ici le SYBR® Green) qui s'intercale exclusivement dans l'ADN double brin. Ainsi la fluorescence détectée à chaque cycle est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié. Sur chaque courbe obtenue, le Cp (Crossing point) est enregistré, il correspond au point d'intersection entre la droite de la dérivée seconde de la courbe d'amplification de l'ADN étudié et la ligne de bruit de fond, indiquant le nombre de cycles nécessaires pour atteindre une valeur seuil définie. Le traitement des données se fait à l'aide du logiciel LightCycler® 480 software release 1.5.0 (Roche, Bâle, Suisse).

II.2.2 : Protocole de quantification

Les qPCR sont réalisées dans des plaques de 96 puits avec un milieu réactionnel de 10 µL contenant 10 ng d'ADN, 5 µM de chaque amorce (Annexe 2) et 5 µL de Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologie, Santa Clara, CA). La réaction de qPCR a été effectuée grâce au LightCycler®480 (Roche, Bâle, Suisse) et consiste en 3 étapes : une pré-incubation de 5 minutes à 95°C, puis 45 cycles composés chacun d'une dénaturation de 10 secondes à 95°C et d'une hybridation/élongation de 5 ou 10 secondes à température variable en fonction du couple d'amorces (Annexe 2), pendant laquelle la fluorescence est mesurée, et une étape finale, permettant d'obtenir une courbe de fusion, composée d'une dénaturation de 5 secondes à 95°C. La température est ensuite fixée à 65°C pendant 1 minute suivie d'une dénaturation lente réalisée en augmentant la température (0,11°C/s) jusqu'à 97°C. Pendant cette dénaturation, la fluorescence est mesurée en continue permettant d'obtenir une courbe de fusion, laquelle permet de contrôler la qualité des amplicons spécifiques de chaque couple d'amorces.

II.2.3 : Analyse des données

Les Cp indiqués par le logiciel ont été normalisés par rapport à nos deux gènes contrôles, *ALB* (11q23.3) et *HEM3* (4q13.3), qui codent respectivement l'albumine et l'hydroxyméthylbilane synthase (*HMBS*).

Pour un gène donné l'expérience a été faite au moins deux fois. Pour quantifier une variation de l'amplification, la moyenne entre les expériences puis une normalisation par rapport au résultat obtenu chez les parents du sujet ou par rapport à une référence commerciale (Promega, Madison, WI) sont effectuées. Si la valeur finale est inférieure à 0,7, la délétion est confirmée, si la valeur est supérieure à 1,25 alors la duplication est confirmée selon les indications fournies par Prasad *et al.*, 2012.

Chapitre III : Étude génétique ciblée

La deuxième partie de l'étude a consisté à analyser 216 gènes (Tableau 5), dont 179 gènes appartenant au complexe NRC/MASC (gènes en rouge) sur les 186 dont il est composé, plus 37 gènes de notre choix (gènes en noir), n'appartenant pas au complexe NRC/MASC et déjà impliqués dans l'autisme, ou d'autre troubles neurodéveloppementaux et/ou neuropsychiatriques.

Tableau 5 : Liste des 216 gènes inclus dans l'étude génétique

Symbole	Localisation	Symbole	Localisation	Symbole	Localisation	Symbole	Localisation
<i>ACTN2</i>	1q43	<i>EHMT2</i>	6p21.33	<i>PTPN5</i>	11p15.1	<i>YWHAE</i>	17p13.3
<i>ARNT</i>	1q21.3	<i>FYN</i>	6q21	<i>RAB6A</i>	11q13.4	<i>ATP5A1</i>	18q21.1
<i>ATPIA1</i>	1p13.1	<i>GRIK2</i>	6q16.3	<i>SHANK2</i>	11q13.3-q13.4	<i>CDH2</i>	18q12.1
<i>ATP2B4</i>	1q32.1	<i>GRM1</i>	6q24.3	<i>SLC1A2</i>	11p13	<i>DLGAP1</i>	18p11.31
<i>CAPZB</i>	1p36.13	<i>HSPA1B</i>	6p21.33	<i>SLC25A22</i>	11p15.5	<i>DSG1</i>	18q12.1
<i>GLUL</i>	1q25.3	<i>MOG</i>	6p22.1	<i>ARF3</i>	12q13.12	<i>NDUFV2</i>	18p11.22
<i>GNB1</i>	1p36.33	<i>PTCHD4</i>	6p12.3	<i>ARPC3</i>	12q24.11	<i>ACTN4</i>	19q13.2
<i>PKLR</i>	1q22	<i>SYNGAP1</i>	6p21.32	<i>CIT</i>	12q24.23	<i>AKT2</i>	19q13.2
<i>PLA2G4A</i>	1q31.1	<i>VEGFA</i>	6p21.1	<i>FGD4</i>	12p11.21	<i>ATPIA3</i>	19q13.2
<i>PRDX1</i>	1p34.1	<i>ADAM22</i>	7q21.12	<i>GRIN2B</i>	12p13.1	<i>MAP2K2</i>	19p13.3
<i>PRDX6</i>	1q25.1	<i>AKAP9</i>	7q21.2	<i>LDHB</i>	12p12.1	<i>MAP2K7</i>	19p13.2
<i>PRKACB</i>	1p31.1	<i>CAMK2B</i>	7p13	<i>LIN7A</i>	12q21.31	<i>PPP2R1A</i>	19q13.41
<i>RGS7</i>	1q43	<i>CAPZA2</i>	7q31.2	<i>MYL6</i>	12q13.2	<i>PPP5C</i>	19q13.32
<i>ADRA2B</i>	2q11.1	<i>CNTNAP2</i>	7q35-q36.1	<i>NOS1</i>	12q24.22	<i>PRDX2</i>	19p13.2
<i>ARPC2</i>	2q35	<i>FLNC</i>	7q32.1	<i>PHB2</i>	12p13.31	<i>PRKCG</i>	19q13.42
<i>ATG16L1</i>	2q37.1	<i>GNB2</i>	7q22.1	<i>PPP1CC</i>	12q24.11	<i>RAB3A</i>	19p13.11
<i>ERBB4</i>	2q34	<i>MAGI2</i>	7q21.11	<i>PTPN11</i>	12q24.13	<i>RPL13A</i>	19q13.33
<i>INPP4A</i>	2q11.2	<i>PRKAR2B</i>	7q22.3	<i>RAN</i>	12q24.33	<i>SHANK1</i>	19q13.33
<i>IRS1</i>	2q36.3	<i>RAC1</i>	7p22.1	<i>SYT1</i>	12q21.2	<i>CSE1L</i>	20q13.13
<i>KIF1A</i>	2q37.3	<i>RALA</i>	7p14.1	<i>TPI1</i>	12p13.31	<i>EPB41L1</i>	20q11.23
<i>MYO1B</i>	2q32.3	<i>STX1A</i>	7q11.23	<i>RAP2A</i>	13q32.1	<i>GNAS</i>	20q13.32
<i>NRXN1</i>	2p16.3	<i>YWHAG</i>	7q11.23	<i>AKAP5</i>	14q23.3	<i>PLCB1</i>	20p12.3
<i>PRKCE</i>	2p21	<i>ARC</i>	8q24.3	<i>CALM1</i>	14q32.11	<i>PLCG1</i>	20q12
<i>SLC25A12</i>	2q31.1	<i>DLGAP2</i>	8p23.3	<i>MYH6</i>	14q11.2	<i>SNAP25</i>	20p12.2
<i>SPTBN1</i>	2p16.2	<i>DPYSL2</i>	8p21.2	<i>RTN1</i>	14q23.1	<i>SRC</i>	20q11.23
<i>STK39</i>	2q24.3	<i>DUSP4</i>	8p12	<i>SERPINA3</i>	14q32.13	<i>GCFC1</i>	21q22.11
<i>APPL1</i>	3p14.3	<i>FABP5</i>	8q21.13	<i>SIPA1L1</i>	14q24.2	<i>PFKL</i>	21q22.3
<i>ARPC4</i>	3p25.3	<i>NEFL</i>	8p21.2	<i>AP4E1</i>	15q21.2	<i>ACO2</i>	22q13.2
<i>ATP6V1A</i>	3q13.2-q13.31	<i>NEFM</i>	8p21.2	<i>MAP2K1</i>	15q22.31	<i>CACNG2</i>	22q12.3
<i>BSN</i>	3p21.31	<i>PTK2B</i>	8p21.2	<i>MYO5A</i>	15q21.2	<i>MAPK1</i>	22q11.21-q11.22
<i>CNTN6</i>	3p26.3	<i>RAB2A</i>	8q12.1	<i>TJPI</i>	15q13.1	<i>MYH9</i>	22q12.3
<i>CTNNA1</i>	3p22.1	<i>RPL7</i>	8q21.11	<i>TP53BP1</i>	15q15.3	<i>SHANK3</i>	22q13.33
<i>DLG1</i>	3q29	<i>YWHAZ</i>	8q22.3	<i>ATP6V0D1</i>	16q22.1	<i>SYNGR1</i>	22q13.1
<i>FOXP1</i>	3p13	<i>DNM1</i>	9q34.11	<i>CALB2</i>	16q22.2	<i>YWHAH</i>	22q12.3
<i>GAP43</i>	3q13.31	<i>GRIN1</i>	9q34.3	<i>FUS</i>	16p11.2	<i>ARHGGEF6</i>	Xq26.3
<i>GNB4</i>	3q26.33	<i>GSN</i>	9q33.2	<i>GOT2</i>	16q21	<i>CASK</i>	Xp11.4
<i>GSK3B</i>	3q13.33	<i>STXBPI</i>	9q34.11	<i>GRIN2A</i>	16p13.2	<i>CNKSR2</i>	Xp22.12
<i>KALRN</i>	3q21.2	<i>ABLIM1</i>	10q25.3	<i>MAPK3</i>	16p11.2	<i>DLG3</i>	Xq13.1
<i>MAGI1</i>	3p14.1	<i>ATP5C1</i>	10p14	<i>MYH11</i>	16p13.11	<i>FRMPD4</i>	Xp22.2
<i>NLGN1</i>	3q26.31	<i>FAM171A1</i>	10p13	<i>PDPK1</i>	16p13.3	<i>GRIA3</i>	Xq25
<i>PIK3CA</i>	3q26.32	<i>INA</i>	10q24.33	<i>PRKCB</i>	16p12.2-p12.1	<i>IL1RAPL1</i>	Xp21.3-p21.2
<i>RAF1</i>	3p25.2	<i>KCNMA1</i>	10q22.3	<i>RPL13</i>	16q24.3	<i>MCF7</i>	Xq27.1
<i>SLMAP</i>	3p14.3	<i>LGII</i>	10q23.33	<i>ALDOC</i>	17q11.2	<i>NLGN3</i>	Xq13.1
<i>MAPK10</i>	4q21.3	<i>VDAC2</i>	10q22.2	<i>ARHGDI1A</i>	17q25.3	<i>NLGN4</i>	Xp22.31
<i>PPP3CA</i>	4q24	<i>ACTN3</i>	11q13.2	<i>CLTC</i>	17q23.1	<i>OPHN1</i>	Xq12
<i>SLC25A4</i>	4q35.1	<i>BAD</i>	11q13.1	<i>DLG4</i>	17p13.1	<i>PLP1</i>	Xq22.2

Symbole	Localisation	Symbole	Localisation	Symbole	Localisation	Symbole	Localisation
<i>CAMK2A</i>	5q32	<i>CTTN</i>	11q13.3	<i>GRB2</i>	17q25.1	<i>PPP1R3F</i>	Xp11.23
<i>DBN1</i>	5q35.3	<i>DLAT</i>	11q23.1	<i>MAP2K3</i>	17p11.2	<i>PTCHD1</i>	Xp22.11
<i>GNB2L1</i>	5q35.3	<i>DLG2</i>	11q14.1	<i>MPP2</i>	17q21.31	<i>RPS6KA3</i>	Xp22.12
<i>HOMER1</i>	5q14.1	<i>GRM5</i>	11q14.2-q14.3	<i>MPP3</i>	17q21.31	<i>SEPT6</i>	Xq24
<i>LMNB1</i>	5q23.2	<i>HRAS</i>	11p15.5	<i>MYH10</i>	17p13.1	<i>SLC25A5</i>	Xq24
<i>PPP2CA</i>	5q31.1	<i>KLC2</i>	11q13.2	<i>NF1</i>	17q11.2	<i>SLITRK2</i>	Xq27.3
<i>SPINK5</i>	5q32	<i>LDHA</i>	11p15.1	<i>NSF</i>	17q21.31	<i>TSPAN7</i>	Xp11.4
<i>VDAC1</i>	5q31.1	<i>MAPK8IP1</i>	11p11.2	<i>RAB37</i>	17q25.1	<i>UPF3B</i>	Xq24

Liste des 216 gènes capturés, en rouge on retrouve les gènes impliqués dans le complexe NRC/MASC, soit 82,9% de la liste. En noir (17,1%) se sont des gènes candidats dans l'autisme ou des gènes impliqués dans d'autres troubles neurodéveloppementaux ou neuropsychiatriques, ou des gènes qui ont une expression neuronale

Ce travail a été effectué en partenariat avec la société IMAXIO (Clermont-Ferrand), spécialisée dans les approches de séquençage à haut-débit.

III.1 : La capture d'exon ciblée

III.1.1 : Principe

Cette technique a pour but de capturer les exons et les jonctions intron/exon d'une série de gènes d'intérêt (Tableau 5). Les fragments d'ADN capturés sont ensuite amplifiés sur quelques cycles de PCR puis séquencés.

III.1.2 : Protocole

La première étape consiste à préparer une librairie pour la capture des fragments d'ADN d'intérêt à l'aide du kit SureSelect Custom DNA (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) (Figure 28, Étape 1). Trois microgrammes d'ADN génomique subissent une sonication afin d'obtenir des fragments de taille variant entre 150 et 200 pb. Les extrémités des fragments sont rendues franches par l'utilisation de la T4 ADN polymérase et du fragment Klenow de l'ADN polymérase I. De plus, un groupement phosphate est ajouté par la T4 polynucléotide kinase en 5' en vue de l'addition d'une base adénine (A). Cette base est ajoutée en 3' par le fragment Klenow (exo-) pour permettre la ligation d'adaptateurs. Les adaptateurs sont alors liés aux extrémités des molécules d'ADN par la T4 ADN ligase. Les ADN sont ensuite amplifiés par PCR à l'aide d'amorces s'hybridant sur les adaptateurs et de l'enzyme "Herculase II Fusion DNA Polymerase" (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). On obtient alors des fragments variant entre 250 et 275 pb, qui constituent notre librairie.

La deuxième étape du protocole (Figure 28, Étape 2) est de capturer les séquences qui nous intéressent. Pour cela, 750 ng de notre librairie est hybridée avec un pool d'oligonucléotides ARN biotinylés de 120 mers. Ce pool représente les exons des 216 gènes de notre liste

d'intérêt et a été généré à façon par Agilent. Pendant cette étape il y a hybridation de nos séquences d'intérêt avec les sondes ARN, pour obtenir des hybrides ADN-ARN. Ces hybrides vont alors être capturés à l'aide de billes magnétiques couplées à la streptavidine (DynaL MyOne Streptavidin T1, Invitrogen™, Carlsbad, NM). Les ADN capturés vont ensuite être purifiés et amplifiés par PCR à l'aide d'amorces s'hybridant sur les adaptateurs et de l'enzyme "Herculase II Fusion DNA Polymerase" (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

La dernière étape (Figure 28, Étape 3) est la formation puis le séquençage des clusters. Un cluster correspond à l'amplification d'un fragment d'ADN unique en environ 1 000 copies. Il est réalisé de façon automatique dans un appareil appelé "cBot" et selon le protocole "cBot" (Illumina®, San Diego, CA) avec le TruSeqPE Cluster kit v2. Les ADN sont dénaturés avec du NaOH 2N à une concentration finale de 1 nM puis dilués dans du tampon d'hybridation à une concentration de 20 pM. Les ADN capturés et dénaturés vont être déposés sur une lame de verre (appelée "flow cell") et vont se fixer grâce aux adaptateurs. En effet la flow cell comprend des oligonucléotides complémentaires des adaptateurs.

Le séquençage est réalisé en double lecture selon le protocole "Paired End Sequencing" (Illumina®, San Diego, CA) sur le séquenceur "Genome Analyzer IIX" (Illumina®, San Diego, CA). Le kit TruSeq SBS kit v5 a été utilisé pour réaliser le séquençage. Le séquençage, basé sur le séquençage par synthèse, c'est-à-dire par l'analyse de l'incorporation des nucléotides les uns après les autres, a été réalisé deux fois 76 cycles. Lors d'un cycle, il y a incorporation d'un des quatre nucléotides, qui possèdent chacun une fluorescence spécifique. Quatre images sont capturées de façon à identifier l'incorporation spécifique à chaque cluster. A la fin, le terminateur et la fluorescence sont enlevés et un nouveau cycle commence.

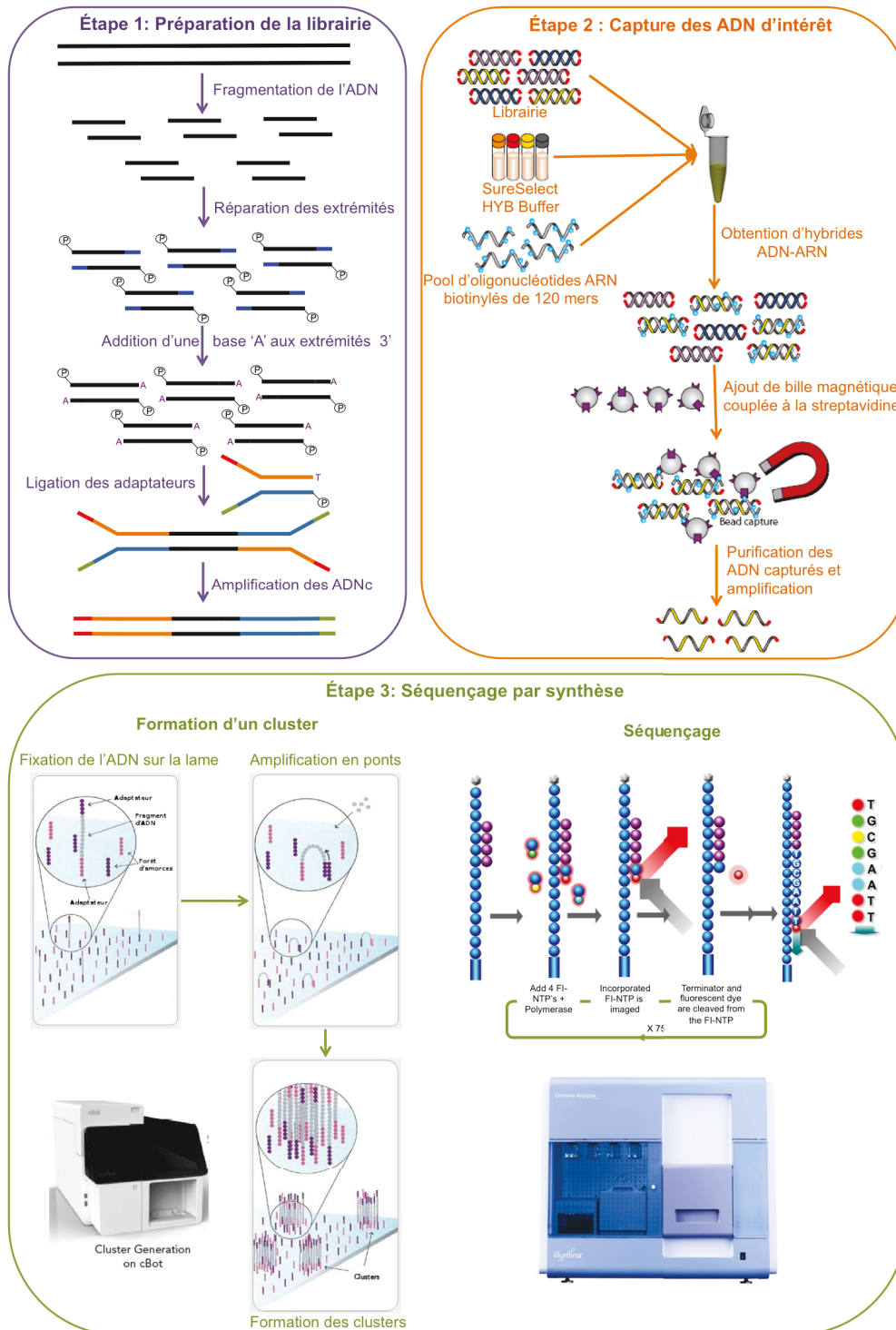


Figure 28 : Représentation schématique des étapes de la capture d'exon ciblée

Une librairie de fragments d'ADN génomique des patients va être produite puis les séquences d'intérêt sont capturées à l'aide d'un pool d'ARN biotinylés de 120 mers. Les ADN capturés purifiés seront ensuite séquencés.

III.1.3 : Analyse des reads

III.1.3.1 : Alignement des reads

Les séquences (reads) sont alignées avec le logiciel CASAVA version 1.8 (*Consensus Assessment of Sequence And Variation*) sur le génome de référence GRCh37/hg19 dont les séquences ont été obtenues depuis le site de l'UCSC (Kent *et al.*, 2002).

L'algorithme utilisé, ELANDv2e (*Efficient Large Scale Alignment of Nucleotides Databases*), détecte les alignements qui ont un nombre limité de différences avec la séquence de référence. Les valeurs de qualité de chaque base et les positions des mismatches par rapport à la séquence de référence sont utilisées pour donner un score de probabilité à chaque alignement candidat : la contribution de chaque nucléotide du read est pondérée par sa qualité. Les meilleurs candidats sont retenus et un score est alors calculé. Ce score est calculé selon une échelle Phred : un score Q20 signifie qu'il y a 1% de chance que cet alignement soit dû au hasard.

III.1.3.2 : Contrôle qualité

Les reads vont ensuite être contrôlés sur leurs qualités afin d'exclure ceux dont la qualité n'est pas suffisante pour la détermination des variations. On va les évaluer sur cinq critères qui sont :

- La qualité des bases qui est égale à la moyenne des valeurs de qualité des nucléotides qui le composent.
- Le score d'alignement défini par le nombre de nucléotides avec match parfait par rapport à la longueur du read
- La profondeur de lecture qui représente la moyenne des valeurs de l'ensemble des positions de la région d'intérêt.
- La qualité de mapping des reads qui prend en compte les insertions, délétions ou substitutions nécessaires à l'alignement à une position donnée.
- Les reads dupliqués, qui sont des reads exactement identiques, permet d'évaluer la complexité de la librairie et donc la pertinence de la librairie

III.1.3.3 : Filtration

Pour les reads ayant passé les critères de qualité une étape de filtrations va être effectuée selon différents critères qui sont la qualité des nucléotides, le statut des reads et la localisation dans les régions d'intérêt. Les reads avec une qualité moyenne inférieure à 30 et

avec au moins un nucléotide ambigu sont supprimés, ainsi que ceux qui ne chevauchent pas les régions d'intérêt à plus ou moins 300 pb.

III.1.3.4 : Recherche des variations

Enfin, pour les reads qui ont passé les critères de sélections et de filtrations, on va chercher à déterminer les variations présentes en comparant les reads au génome de référence GRCh37/hg19. Cette étape est effectuée sur des régions dites "potentielles". Ces dernières sont sélectionnées en fonction des paramètres suivants :

- Nombre de reads couvrant chaque région d'intérêt (pour éviter les régions trop peu couvertes), minimum 10 reads
- Nombre de reads variants minimum couvrant la région de manière différente de la séquence de référence, 2 variants minimum
- Effet des polymères pour les reads se situant à proximité.

Pour chaque région potentielle, l'algorithme de détection prend en compte, pour chaque read, le nucléotide et sa valeur associée de qualité et produit une séquence génotype consensus. A chaque position, seuls les deux nucléotides apparaissant les plus fréquemment sont considérés.

III.1.4 : Analyse des variations

Après alignement des reads et recherche des variations, nous avons obtenus 2 466 variations en totalité. A partir de toutes ces variations, nous avons dû sélectionner des variants candidats en utilisant différents critères de sélection (Figure 29).

Tout d'abord nous avons décidé d'éliminer les variations retrouvées à plus de 1% dans dbSNP132, dans l'Exome Variant Server (EVS) et dans le 1 000 genome project. Notre modèle génétique étant le RVCD, cela implique que les variations retrouvées à plus de 1% dans la population générale ne sont pas considérées.

Afin de déterminer le degré de pathogénicité des mutations, nous avons utilisé quatre sites de prédiction d'effet délétère protéique, PROVEAN (Choi *et al.*, 2012), SIFT (Kumar *et al.*, 2009; Ng et Henikoff, 2006; Ng et Henikoff, 2003; Ng et Henikoff, 2002; Ng et Henikoff, 2001), PolyPhen-2 (Adzhubei *et al.*, 2013; Adzhubei *et al.*, 2010) et Mutation Taster (Schwarz *et al.*, 2014). Nous avons gardé toutes les variations prédites pathogènes par au moins trois des quatre sites de prédiction utilisés.

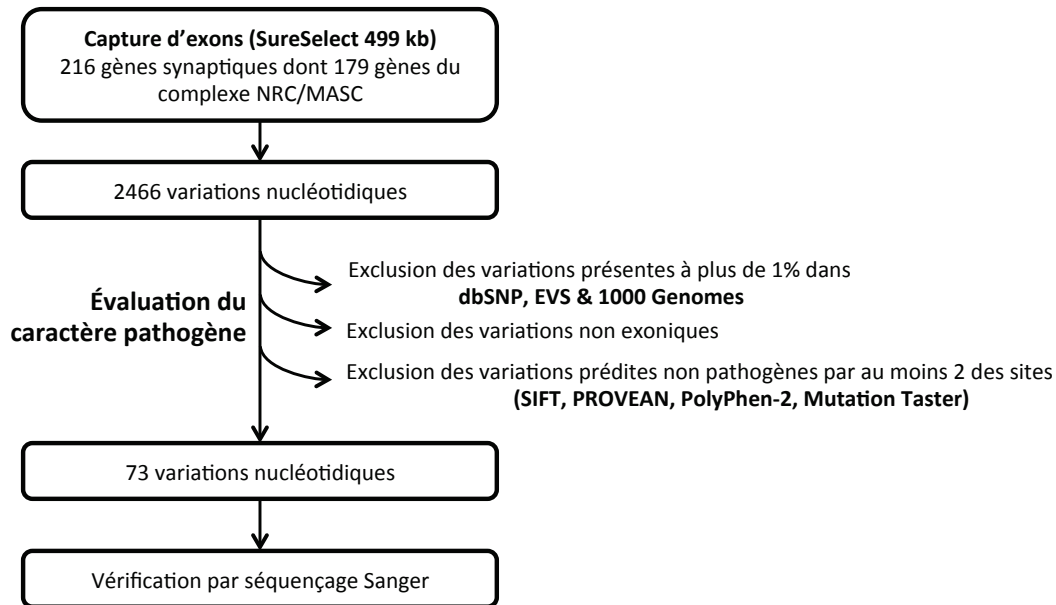


Figure 29 : Protocole d'analyse pour la capture d'exon ciblée

Dans le cadre de cette thèse, nous avons décidé de nous concentrer sur les variants rares à effet majeur (modèle RVCD), pour cela nous avons utilisé 3 critères de sélection avec lesquels nous avons conservé 72 variations nucléotidiques. Tous ces variants ont alors été vérifiés par séquençage Sanger

Au finale, cette étape de filtration nous a permis de sélectionner 73 variations nucléotidiques, chacune vérifiée en séquençage Sanger, excepté une dans le gène *NDUFV2* pour lequel il nous a été impossible d'amplifier la région contenant le variant.

III.2 : Le séquençage Sanger

Pour les 72 variations nucléotidiques restantes, nous avons vérifié leur présence et leur transmission chez nos patients et leurs parentés par PCR à l'aide de couples d'amorces (Annexe 3) spécifiques du fragment d'intérêt puis par séquençage selon la méthode de Sanger.

III.2.1 : La PCR

Les PCR ont été réalisées avec le kit Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs®). Le mélange réactionnel de la PCR se compose de 25 µL contenant entre 100 et 200 ng d'ADN, 0,02U/µL de Q5® High-Fidelity DNA Polymérase, 1X de tampon 5X Q5® Reaction Buffer (New England Biolabs®), 200 µM de dNTPs, 0,5 µM de chaque amorce sens et anti-sens (Annexe 3), et 1X de tampon 5X Q5® High GC Enhancer si le fragment est riche en bases GC. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur pendant 35 cycles comprenant chacun 10 secondes de dénaturation à 98°C, 30 secondes d'hybridation des amorces sur l'ADN à une température d'hybridation T_m dépendante du couple d'amorces

(Annexe 3) et 30 secondes d'élongation à 72°C; ces 35 cycles sont précédés d'une dénaturation initiales de 30 secondes à 98°C et suivis d'une élongation finale de 5 minutes à 72°C.

La vérification du produit de PCR est obtenue par migration électrophérique de 5 µL de chaque produit de PCR additionné de 2 µL d'une solution de glycérol et de bleu de bromophénol, sur gel d'agarose (Eurobio®) à 1,2% dans du tampon TBE 1X (Tris 1,0 M, acide borique 1,9 M, EDTA 0,01M). Le bromure d'éthidium (BET, Merck®), qui est un intercalant de l'ADN, incorporé à 0,5 µg/µL dans le gel permet de visualiser les fragments obtenus en émettant une fluorescence après une irradiation aux UV. La taille des fragments est estimée par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire (Quick-Load® 100 pb DNA ladder, New England Biolabs®) ayant migré en parallèle.

III.2.2 : Le séquençage Sanger

Après amplification du fragment, les deux brins du produit de PCR sont synthétisés séparément. Cette réaction est effectuée dans un volume de 10 µL contenant entre 100 et 200 ng du fragment d'ADN obtenus, avec 10 µM d'amorce sens ou anti-sens (Annexe 3), 1,5 µL de tampon BigDye Terminator v1.1,v3.1 (Applied Biosystems®) et 1 µL de mix BigDye Terminator v1.1 Cycle (Applied Biosystems®). La réaction de séquençage se déroule selon le cycle suivant, répété 25 fois : une dénaturation de 10 secondes à 96°C, une hybridation des amorces de 5 secondes à 50°C et une élongation de 4 minutes à 60°C.

Les produits ainsi obtenus sont alors purifiés à l'aide du kit de purification Montage Millipore. Après cette purification les ADN sont analysés par électrophorèse capillaire sur un séquenceur ABI 3130x1 16 capillaires (Applied Biosystems®). Les séquences sont ensuite analysées avec le logiciel CodonCode Aligner.

Résultats

Chapitre I : Caractérisation de CNV et SNV candidats

L'objectif de ce travail était d'évaluer la contribution des CNV rares ou *de novo* et des mutations retrouvées au sein du complexe NRC/MASC dans l'autisme. Pour cela nous avons réalisé en parallèle, sur 96 patients, une CGH array à haute résolution, pour déterminer les CNV présents dans leurs génomes, et la capture ciblée d'exons (approche SureSelect Agilent) sur 216 gènes dont 179 gènes du complexe NRC/MASC.

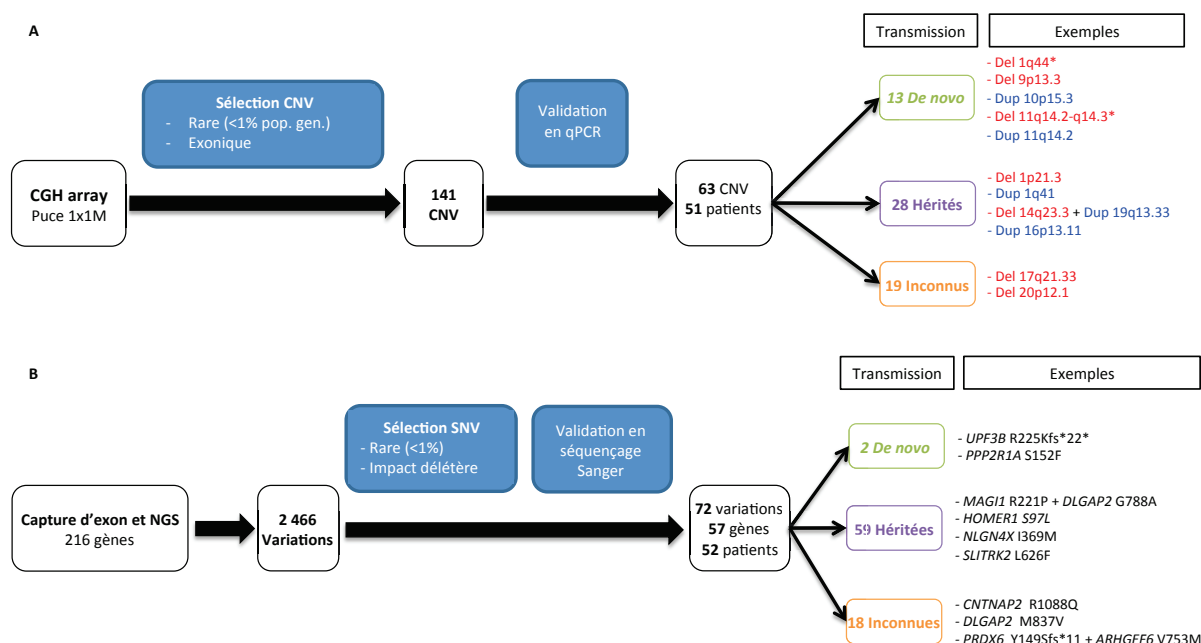


Figure 30 : Synthèse des résultats

A : Synthèse des résultats obtenus par la méthode de CGH array. Sur tous les CNV détectés nous avons appliqué des critères de sélections pour ne garder que les plus intéressants. Ces CNV ont ensuite été validés en qPCR et en parallèle nous avons déterminé le mode de transmission. Pour les CNV conservés, quelques exemples, les plus intéressants sont cités sur la droite.

B : Synthèse des résultats obtenus par la capture ciblée d'exons. Un grand nombre de variations nucléotidiques (2 466) ont été observées. Après l'utilisation de critères de sélection nous en avons conservées 72 qui ont été validées par séquençage Sanger et en parallèle nous avons déterminé le mode de transmission. Sur les variations conservées, quelques exemples, les plus intéressants sont cités sur la droite.

* Variations (CNV ou SNV) pour lesquelles un diagnostic a été donné.

La figure 30 propose une synthèse des résultats les plus significatifs dégagés par l'étude pangénomique (recherche de CNV) et l'étude génétique ciblée (capture d'exons). En fonction de nos critères de sélection des variants, nous avons identifié :

- Treize CNV *de novo* chez 11 patients, 28 hérités chez 19 patients et 19 dont on n'a pas pu déterminer le mode de transmission chez 14 patients (Figure 30A). Un diagnostic génétique a été effectué pour 2 patients (délétion 1q44 *de novo* chez la patiente TAF26 et délétion 11q14.2-q14.3 *de novo* chez la patiente BAF13).

- Deux SNV *de novo* chez 2 patients, 59 SNV hérités chez 41 patients et 18 ont un statut non déterminé du fait de la non-disponibilité de l'ADN d'un des deux parents chez 13 patient (Figure 30B). Un diagnostic génétique a été effectué pour le patient TAF35 porteur d'une mutation tronquante *de novo* qui entraîne un décalage de phase de lecture dans le gène *UPF3B*.

I.1 : Implication des CNV

Les CNV rares, *de novo* ou hérités sont observés chez 5 à 10% des patients avec TSA (Devlin et Scherer, 2012), une CGH array à haute résolution a donc été réalisée pour chaque patient. Nous avons utilisé une puce à haute résolution (CGH 1x1M - Agilent Technologies) permettant la détection de remaniements jusqu'à environ 1 Kb.

Un total de 141 CNV candidats a pu être établi sur la base de nos critères de sélection (Figure 27). La vérification par qPCR a abouti à la validation de **70** d'entre eux (49,6%) (Tableau 6). Au final, 51 patients (53,1%) sont concernés, dont 27 combinent à la fois des CNV et des SNV.

CNV *de novo* :

Nous avons observé un total de 13 CNV *de novo*, impliquant 11 patients.

- Une délétion de 650 kb a été identifiée chez le sujet TAF26 au niveau de la région 1q44 (Figure 34C). Cette patiente avait été initialement incluse dans une étude en CGH-array à basse résolution sur l'analyse de microdélétions de la région 1q44 associées à une DI (Thierry *et al.*, 2012).

- Une duplication de 4,5 kb localisée en 8p21.3 concerne les 2 derniers exons du gène *SH2D4A* [MIM614968] chez le sujet TAF01 (Figure 34A). Ce gène code une protéine à domaines SH2 (Src Homology 2) généralement présents dans les protéines adaptatrices qui aident à la transduction de signal (Koytiger *et al.*, 2013). Le patient TAF01 porte également une délétion *de novo* de 4,8 kb en 7q36.3 affectant le gène *MNX1*.

- Le sujet TAF18 est porteur d'une délétion localisée en 10p15.1 causant la perte de l'exon 6 ou 7 (selon l'isoforme) du gène *GDI2* [MIM600767] (Figure 34A). Ce dernier code une protéine de la PSD (Bayés *et al.*, 2011) qui régule l'échange GDP-GTP au niveau des protéines Rab en inhibant la dissociation du GDP de celles-ci. Les protéines Rab sont des petites protéines de liaison au GTP de la superfamille des Ras impliquées dans le trafic des vésicules entre les compartiments cellulaires (Sedlacek *et al.*, 1998).

Tableau 6 : Liste des CNV candidats identifiés au sein de la cohorte de sujets autistes

Patient	Sexe	Agilent CytoGenomics Edition 2.0.6.0						Gène	Hérité / De Novo	DGV	SFARI Gene	
		Type	Chr	Cytobande	Start (hg19)	Stop (hg19)	Taille (pb)				CNV	SNV
CNV de novo												
BAF05007JB	M	Dup	10	p15.3	136 361	975 994	839633	ZMYND11, DIP2C, C10orf108, LARP4B	De Novo	Non	Gain	Non
BAF08011JL	M	Dup	17	p13.1	9 548 548	9 553 111	4563	USP43	De Novo	Non	Gain	Non
		Dup	21	q22.3	45 820 653	45 833 003	12350	TRPM2	De Novo	Non	Gain	Non
BAF13020LL	F	Del	11	q14.2 - q14.3	85 690 989	91 304 855	5613866	PICALM, EED, C11orf73, CCDC81, ME3, PRSS23, FZD4, TMEM135, RAB38, CTSC, GRM5, TYR, NOX4, FOLH1B, TRIM77, TRIM49, TRIM53, TRIM64B, LOC729384, TRIM64, UBTFL1, NAALAD2, CHORDC1	De Novo	Non	Perte	GRM5 & TYR: Oui
RAF28028CL	M	Dup	11	q14.2	88 242 840	88 265 783	22943	GRM5	De novo	Non	Perte	Oui
TAF01001RB	M	Del	7	q36.3	156 792 950	156 797 778	4828	MNX1	De Novo	9/8090	Perte	Non
		Dup	8	p21.3	19 248 339	19 252 914	4575	SH2D4A	De Novo	4/8559	Non	Non
TAF02002CM	M	Del	9	p13.3	34 584 151	34 590 830	6679	CNTFR	De Novo	1/6533	Gain	Non
TAF18017JB	M	Del	10	p15.1	5 813 611	5 816 976	3365	GDI2	De Novo	2/270	Non	Non
		Dup	21	q22.3	44 804 803	44 839 985	35182	SIK1	De Novo	81/11907	Gain	Non
TAF19018EB	M	Del	16	p13.11	14 968 855	15 116 406	147551	NOMO1, NPIP, PDXDC1	Mère	Non	Perte	Non
TAF23021AS	F	Del	7	q34	142 340 360	142 492 085	151725	PRSS1, TRY6, PRSS2	De Novo	9/2533	Perte	Non
TAF26025AL	F	Del	1	q44	244 765 499	245 422 788	657289	C1orf101, PPPDE1, FAM36A, NCRNA00201, HNRNPU, EFCAB2, KIF26B	De Novo	Non	Perte	Non
TAF35034RL	M	Dup	17	p13.1	7 306 518	7 313 698	7180	C17orf61, NLGN2	De Novo	Non	Gain	NLGN2: Oui
CNV hérité												
BAF03003BG	M	Del	11	p15.4	8 959 136	8 964 726	5590	ASCL3	Père	2/1153	Oui	Non
BAF03004HG	F	Dup	16	p13.11	15 126 709	16 292 235	1165526	PDXDC1, NTANI, RRN3, MPV17L, C16orf45, KIAA0430, NDE1, MIR484, MYH11, C16orf63, ABCC1, ABCC6	Père	Non	Gain	Non
BAF06008YB	M	Dup	13	q12.11	20 804 067	20 830 833	26766	GJB6	Mère & Frère (sain)	Non	Perte	Non
BAF07009MP	M	Dup	7	p21.3	8 180 613	8 529 737	349124	ICAI, NXPPI	Père	2/8090	Gain	ICAI & NXPPI: Oui
BAF08012FL	M	Del	11	q14.1	78 187 727	78 193 269	5542	NARS2	Père	Non	Gain	Non
		Del	2	q37.1	233 019 961	233 036 850	16889	DIS3L2	Mère	5/6542	Perte	Non
BAF11017GL	M	Del	5	q12.1	60 147 017	60 286 925	139908	ERCC8, NDUFAF2	Mère	17/10116	Perte	Non
		Dup	11	q13.4	73 016 499	73 020 353	3854	ARHGEF17	Mère	Non	Perte	Non
BAF12019YR	M	Dup	12	q13.12	49 671 791	49 690 616	18825	PRPH	Mère	2/482	Gain	Non
BAF14021OF	F	Dup	5	p15.33	677 853	777 000	99147	TPPP	Mère	Non	Gain	Non
BAF15022ML	F	Dup	12	p11.23 - p11.22	27 261 993	27 810 751	548758	STK38L, ARNTL2, C12orf70, PPFIBP1	Mère	2/2028	Gain	Non

Chapitre I : Caractérisation de CNV et SNV candidats

Patient	Sexe	Agilent CytoGenomics Edition 2.0.6.0						Gène	Hérité / De Novo	DGV	SFARI Gene	
		Type	Chr	Cytobande	Start (hg19)	Stop (hg19)	Taille (pb)				CNV	SNV
BAF16024SJ	M	Dup	2	q11.2	99 834 693	99 924 580	89887	<i>LYG2, LYG1</i>	Mère	8/10116	Gain	Non
		Dup	2	q13	110 854 924	110 983 703	128779	<i>MALL, NPHPI, NCRNA00116</i>	Père	26/9304	Gain	Non
		Del	11	p15.4	8 959 136	8 964 726	5590	<i>ASCL3</i>	Père	2/1153	Oui	Non
BAF17025DA	F	Del	11	q14.3	89 942 189	90 129 060	186871	<i>CHORDC1</i>	Mère & Soeur (sain)	1/1557	Gain	Non
		Del	17	q12	37 834 008	37 853 527	19519	<i>PGAP3, ERBB2</i>	Mère	10/8559	Non	Non
BAF18026BLL	M	Dup	4	q21.1	77 811 064	77 835 558	24494	<i>ANKRD56</i>	Mère & Frère (affecté & sain)	Non	Non	Non
BAF18027NL	M	Dup	4	q21.1	77 811 064	77 835 558	24494	<i>ANKRD56</i>	Mère & Frère (affecté & sain)	Non	Non	Non
RAF07007QD	M	Dup	11	q12.2	61 228 054	61 568 694	340640	<i>C11orf66, LRRC10B, SYT7, RPLP0P2, DAGLA, C11orf9, DKFZP434K028, C11orf10, MIR611, FEN1, FADSI</i>	Mère	Non	Non	<i>DAGLA</i> : Oui
		Del	20	p12.1	14 597 964	14 745 302	147338	<i>MACROD2</i>	Inconnu	7/8861	Perte	Oui
RAF08008EB	M	Dup	1	q41	220 087 566	220 115 448	27882	<i>SLC30A10</i>	Père	Non	Gain	Non
		Dup	21	q22.3	44 804 803	44 837 614	32811	<i>SIK1</i>	Hérité	81/11907	Gain	Non
TAF05005MF	F	Del	8	p21.3	19 979 183	20 008 894	29711	<i>SLC18A1</i>	Père	18/6837	Gain	Non
TAF06006AF	M	Dup	9	q34.13	135 552 843	135 556 084	3241	<i>GTF3C4</i>	Mère	Non	Non	Non
		Del	17	q21.33	47 652 223	47 656 650	4427	<i>NXP3</i>	Inconnu	1/6533	Non	Non
TAF07007LP	M	Del	15	q21.1	47 665 822	47 808 584	142762	<i>SEMAD6</i>	Mère	Non	Non	Non
TAF08008JD	M	Del	12	q24.31	123 296 494	123 308 005	11511	<i>CCDC62</i>	Mère	4/6533	Perte	Non
TAF09009DL	M	Del	19	q13.33	48 304 452	48 312 229	7777	<i>TPRX1</i>	Mère	2/12147	Non	Non
		Del	19	q13.33	49 203 439	49 209 966	6527	<i>FUT2</i>	Inconnu	22/9806	Perte	Non
TAF12012CD	M	Dup	16	p12.3	20 552 093	20 648 308	96215	<i>ACSM2B, ACSM1</i>	Père	2/6535	Gain	Non
TAF14014GA	M	Del	11	p15.4	8 959 136	8 964 726	5590	<i>ASCL3</i>	Père	2/1153	Oui	Non
TAF15015GD	M	Del	11	q14.1	85 431 879	85 471 564	39685	<i>SYTL2</i>	Père	2/7684	Perte	Non
		Del	1	p21.3	98 149 468	98 177 563	28095	<i>DPYD</i>	Père	Non	Perte	Oui
TAF24022LB	M	Dup	1	q21.1	142 617 943	146 504 219	3886276	<i>LOC100130000, FLJ39739, LOC100286793, PPIAL4G, FAM72D, LOC728853, LOC728875, PPIAL4C, PPIAL4B, PPIAL4A, C1orf152, NBPF9, PDE4DIP, SEC22B, NOTCH2NL, NBPF10, HFE2, TXNIP, POLR3GL, ANKRD34A, LIXIL, RBM8A, GNRHR2, PEX11B, ITGA10, ANKRD35, PIAS3, NUDT17, POLR3C, RNF115, CD160, PDZK1, GPR89A, GPR89C, PDZK1P1, LOC200030, NBPF11, LOC728989</i>	Père	Non	Gain	<i>RBM8A</i> : Oui

Chapitre I : Caractérisation de CNV et SNV candidats

Patient	Sexe	Agilent CytoGenomics Edition 2.0.6.0							Hérité / De Novo	DGV	SFARI Gene	
		Type	Chr	Cytobande	Start (hg19)	Stop (hg19)	Taille (pb)	Gène			CNV	SNV
TAF28027CT	M	Del	1	q32.1	202 302 215	202 310 105	7890	<i>UBE2T</i>	Père	Non	Perte	Non
TAF32031LP	M	Del	14	q23.3	67 313 072	67 351 687	38615	<i>GPHN</i>	Mère	10/8559	Perte	Oui
		Dup	19	p13.3	4 219 514	4 222 723	3209	<i>ANKRD24</i>	Père	Non	Gain	Non
TAF38037CM	M	Dup	4	p16.3	723 519	730 210	6691	<i>PCGF3</i>	Père	Non	Gain	Non
		Dup	17	q12	36 902 734	36 906 767	4033	<i>PCGF2</i>	Père	Non	Perte	Non
TAF41040HB	M	Del	6	q25.3	159 129 248	159 150 166	20918	<i>SYTL3</i>	Père	Non	Gain	Non
Autres CNV												
RAF02002AA	M	Del	13	q12.11	20 797 139	21 104 589	307450	<i>GJB6, CRYL1</i>	Inconnu	1/771	Perte	Non
RAF09009AB	M	Dup	9	q34.11	130 624 062	130 641 466	17404	<i>AK1</i>	Inconnu	2/6984	Perte	Non
		Dup	21	q22.3	44 711 851	44 885 413	173562	<i>C21orf136, SIK1, C21orf125, C21orf84</i>	Inconnu	Non	Gain	Non
RAF11011ES	M	Del	1	p36.11	26 909 368	27 049 451	140083	<i>ARID1A</i>	Inconnu	1/1250	Non	Non
		Dup	11	q13.2	66 021 374	66 080 196	58822	<i>KLC2, RAB1B, CNIH2, YIF1A, TMEM151A</i>	Inconnu	Non	Non	<i>KLC2</i> : Oui
RAF12012LL	M	Dup	2	q11.2	99 833 195	99 924 580	91385	<i>LYG2, LYG1</i>	Inconnu	8/10116	Gain	Non
		Del	12	q24.33	129 392 426	129 787 560	395134	<i>GLT1D1, TMEM132D</i>	Inconnu	Non	Gain	Non
RAF14014BR	M	Del	19	q13.33	48 304 452	48 312 229	7777	<i>TPRX1</i>	Inconnu	2/12147	Non	Non
		Dup	17	q24.2	65 628 220	65 947 743	319523	<i>PITPNC1, NOL11, SNORA38B, BPTF</i>	Inconnu	Non	Gain	Non
RAF17017MR	M	Dup	22	q11.21 - q11.23	21 798 705	24 632 825	2834120	<i>HIC2, PI4KAP2, RIMBP3B, RIMBP3C, UBE2L3, YDJC, CCDC116, SDF2L1, MIR301B, MIR130B, PPIL2, YPEL1, MAPK1, PPM1F, TOP3B, VPRED1, LOC96610, ZNF280B, ZNF280A, PRAME, LOC648691, POM121L1P, GGTL2, RTDR1, GNAZ, RAB36, BCR, ZDHHC8P, IGLL1, C22orf43, LOC91316, RGL4, ZNF70, VPRED3, C22orf15, CHCHD10, MMP11, SMARCB1, DERL3, SLC2A11, MIF, GSTT2B, GSTT2, DDTL, DDT, GSTTP1, LOC391322, GSTT1, GSTTP2, CABINI, SUS2, GGT5</i>	Inconnu	Non	Gain	<i>MAP2K1 & TOP3B</i> : Oui
RAF19019DR	M	Dup	15	q26.1	92 673 959	93 172 602	498643	<i>SLCO3A1, ST8SIA2, C15orf32, LOC100144604, FAM174B</i>	Inconnu	Non	Perte	<i>ST8SIA2</i> : Oui
RAF22022EF	M	Dup	1	q32.2	211 275 223	211 282 773	7550	<i>KCNH1</i>	Inconnu	Non	Gain	Non
RAF24024LB	M	Del	5	q31.2	138 371 250	138 420 586	49336	<i>SIL1</i>	Inconnu	Non	Perte	Non
TAF04004NR	F	Del	16	q24.1	84 493 077	84 504 821	11744	<i>ATP2C2</i>	Inconnu	11/10116	Perte	Non
		Del	X	p22.2	12 630 269	12 633 225	2956	<i>FRMPD4</i>	Inconnu	Non	Perte	Oui

Chapitre I : Caractérisation de CNV et SNV candidats

Patient	Sexe	Agilent CytoGenomics Edition 2.0.6.0						Hérité / De Novo	DGV	SFARI Gene		
		Type	Chr	Cytobande	Start (hg19)	Stop (hg19)	Taille (pb)			Gène	CNV	SNV
TAF11011JF	M	Del	20	p12.1	14 607 738	14 967 159	359421	MACROD2	Inconnu	7/8861	Perte	Oui

Les données de la partie gauche du tableau sont les CNV identifiés par l'analyse faite par le logiciel Agilent CytoGenomics Edition 2.0.6.0 avec l'algorithme ADM-2 (Annexe 1). **Les délétions sont représentées en rouge et les duplications en bleu.** La fréquence des CNV dans la population générale a été déterminée à l'aide de la base de données DGV (Mise à jour Octobre 2014). Nous avons utilisé la base de données SFARI Gene (Mise à jour Septembre 2014) pour voir si les CNV observés chez nos patients ont déjà été retrouvés impliqués dans l'autisme. Nous avons utilisé la même base de données pour voir si des SNV étaient retrouvés dans les gènes impliqués dans les CNV. Le caractère hérité/*de novo* a été évalué par qPCR.

Nous avons détecté une délétion *de novo* localisée en 9p13.3 qui entraîne la perte du premier exon du gène *CNTFR* [MIM118946] chez le sujet TAF02 (Figure 34C). Ce gène code un membre de la famille des récepteurs aux cytokines de type 1. La protéine appartient à la PSD (Collins *et al.*, 2006) et est un composant ligand-spécifique d'un récepteur tripartite pour un facteur neurotrophique ciliaire, qui joue un rôle critique dans la survie neuronale, dans la différenciation et l'expression de gènes (Sleeman *et al.*, 2000). Des modifications dans la protéine *CNTFR* pourraient donc avoir un effet sur la survie neuronale et donc être un bon gène candidat dans l'autisme.

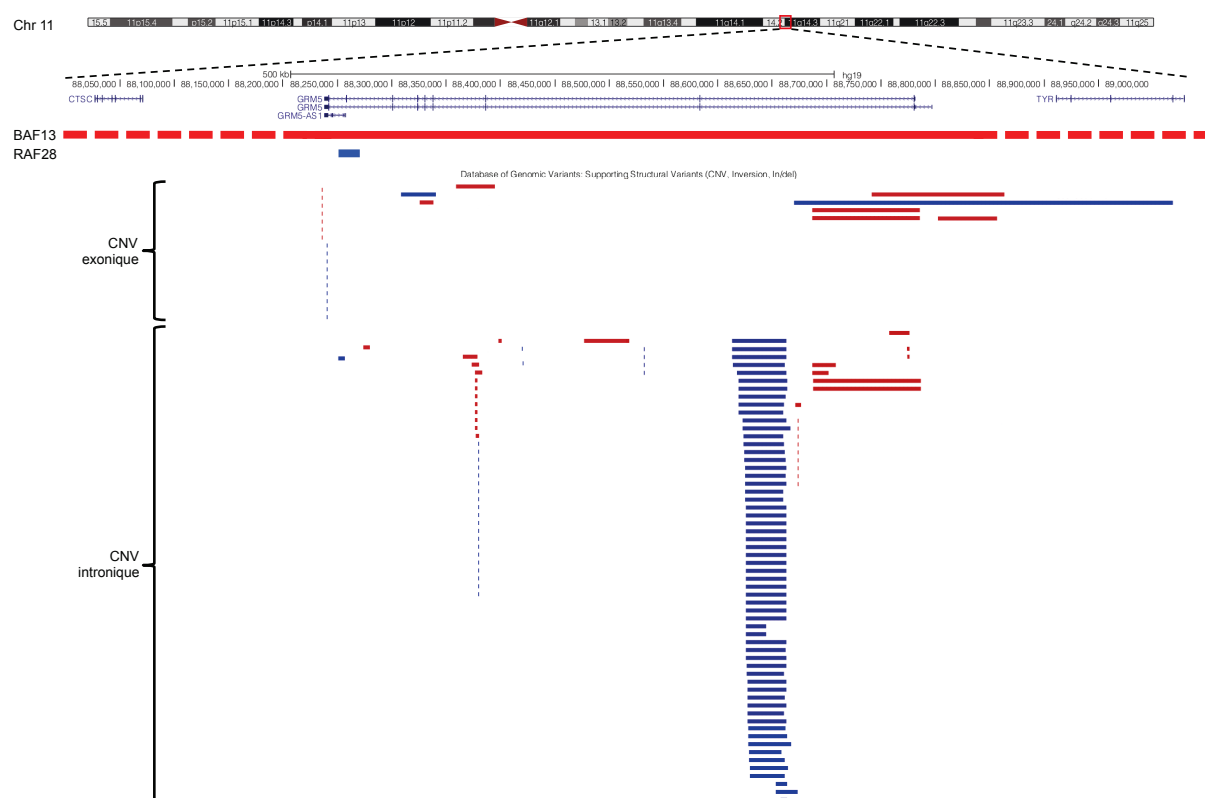


Figure 31: Récurrence de CNV dans le gène *GRM5*

Deux CNV ont été observés dans le gène *GRM5* qui code le récepteur métabotrope mGluR5 : une délétion *de novo* de 5,6 Mb, incluant la totalité du gène, et une duplication *de novo* de 23 kb, impliquant l'exon 8 du transcrit "a". On observe qu'aucun CNP n'inclut la totalité du gène (DGV, mise à jour Octobre 2014)

Nous avons isolé 2 CNV localisés en 11q14 et présentant un territoire commun minimal impliquant le gène *GRM5* [MIM604102] (Figure 31) : une délétion *de novo* de 5,6 Mb chez le sujet BAF13 (Figure 34C) comprenant 23 gènes dont le gène *GRM5*, et une duplication *de novo* de 23 kb au niveau de l'exon 8 du transcrit "a" de *GRM5* chez le patient RAF28 (Figure 34C). Le gène *GRM5* code un récepteur métabotrope situé au niveau de la synapse glutamatergique. Des CNV dans ce gène ont été rapportés chez des patients avec des troubles

du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (Elia *et al.* 2011; Williams *et al.*, 2010), et des mutation ont également été identifiées chez des sujets autistes (Iossifov *et al.*, 2012; Kelleher *et al.*, 2012) et épileptiques (Klassen *et al.*, 2011).

CNV rares hérités :

Les autres CNV candidats possèdent un statut hérité ou inconnu (un des 2 parents non disponibles). Parmi les remaniements d'intérêt, nous avons en particulier détecté une microdélétion d'environ 4 kb en 17q21.33 qui entraîne la perte de la quasi totalité du gène *NXPH3* [MIM604636] dans la famille TAF06 (Figure 34C). Ce gène code un ligand qui est spécifique des neurexines- α , qui sont essentielles à la libération de neurotransmetteurs. De plus une altération de l'information sensorielle et de la coordination motrice est observée chez les souris KO pour ce gène (Beglopoulos *et al.*, 2005).

Deux CNV candidats, impliquant des gènes dont des mutations ont été rapportées chez les autistes, ont été délimités dans notre cohorte. En particulier, une duplication identifiée chez le sujet RAF11 et localisée en 11q13.2, implique 5 gènes dont le gène *KLC2* [MIM611729] qui a déjà été retrouvé chez des patients atteints d'autisme (Awadalla *et al.*, 2010). Le gène *KLC2* est un gène intéressant car il code une kinésine (Rahman *et al.*, 1998) qui appartient à notre complexe d'intérêt, le complexe NRC/MASC (Collins *et al.*, 2006).

Nos résultats ont permis de répliquer la mise en évidence de 52 CNV décrits par la littérature comme candidats dans l'autisme. Un total de 45 patients sont concernés et présentent 11 CNV *de novo* (19,3%), 31 CNV d'origine maternelle ou paternelle (54,4%), et 15 CNV dont l'origine parentale n'a pu être testée (26,3%).

De façon intéressante, une duplication de 1,2 Mb d'origine paternelle est localisée en 16p13.11 chez la patiente BAF03004HG (Figure 34A). Cette région comprenant 12 gènes, a déjà été identifiée délétée dans l'autisme et d'autres troubles neurodéveloppementaux (Tropeano *et al.*, 2013). Plusieurs études ont en revanche établi des conclusions opposées à propos du caractère pathogène de cette région dupliquée identifiée chez d'autres sujets autistes (Ramalingam *et al.*, 2011; Hannes *et al.*, 2009; Ullmann *et al.*, 2007). Cette région comprend les gènes *NDE1* [MIM609449] et *MYH11* [MIM160745]. Le gène *NDE1* est considéré comme candidat pour l'autisme (Ramalingam *et al.*, 2011). Il code une protéine localisée au

niveau du centrosome et qui interagit avec d'autres composants de ce complexe afin de réguler la fonction de la dynéine. La protéine NDE1 va réguler la production de neurones en contrôlant l'orientation du fuseau mitotique durant la division des cellules progénitrices de neurones corticaux (Feng et Walsh, 2004). Quant au gène *MYH11*, il code une protéine appartenant à la famille de la chaîne lourde de la myosine (Huang *et al.*, 2004) qui est retrouvée au niveau du complexe NRC/MASC (Collins *et al.*, 2006).

CNV récurrents dans le gène *MACROD2* [MIM611567] (Figure 32A) :

De façon intéressante, nous avons identifié une délétion de 148 kb chez le sujet RAF07 et d'une délétion de 359 kb chez le patient TAF11 (Figure 34C) qui entraînent chacune la perte de l'exon 5 de l'isoforme 1 de *MACROD2*. Ce gène code une protéine à expression neuronale qui intervient dans les processus épigénétiques (Maas *et al.*, 2007). L'exon 5 code une partie du domaine "MACRO" de la protéine *MACROD2*, et qui représente son domaine fonctionnel principal (Figure 32B). Il est ainsi probable que la portion protéique délétée puisse altérer la structure et la fonction du domaine MACRO. Le gène *MACROD2* est un candidat dans l'autisme (Prasad *et al.*, 2012; Egger *et al.*, 2014) les TDAH (Lionel *et al.*, 2011) et dans l'épilepsie (Lesca *et al.*, 2012).

CNV hérité et modèles double-hit :

Pour certains patients, nous avons constaté la possibilité d'un modèle génétique faisant interagir au moins deux CNV candidats, chacun hérité d'un parent sain.

Chez le sujet TAF32 (Figure 34A), la présence commune d'une délétion d'origine maternelle localisée en 14q23.3 causant la perte de l'exon 5 du gène *GPHN* [MIM603930] et d'une duplication d'origine paternelle localisée en 19p13.3 des exons 19 et 20 du gène *ANKRD24* a été mise en évidence. Le gène *GPHN* code la géphyrine qui est une protéine permettant l'ancrage des récepteurs inhibiteurs à la membrane post-synaptique (Rees *et al.*, 2003). Des amplifications et des délétions impliquant ce gène ont déjà été retrouvées chez des patients autistes (Kaminsky *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2010), ainsi que des variations nucléotidiques dans l'autisme, l'épilepsie, la DI ou la schizophrénie (Prasad *et al.*, 2012; Lionel *et al.*, 2013; Dejanovic *et al.*, 2014). La protéine *ANKRD24* a une expression neuronale et interagit au sein de la PSD. Des duplications intergéniques dans ce gène ont déjà été retrouvées dans l'autisme (Poultney *et al.*, 2013). Les protéines *GPHN* et *ANKRD24*

appartenant à la PSD, il est ainsi possible que leur altération puisse impacter l'organisation de l'échafaudage multi-protéique au sein de la PSD.

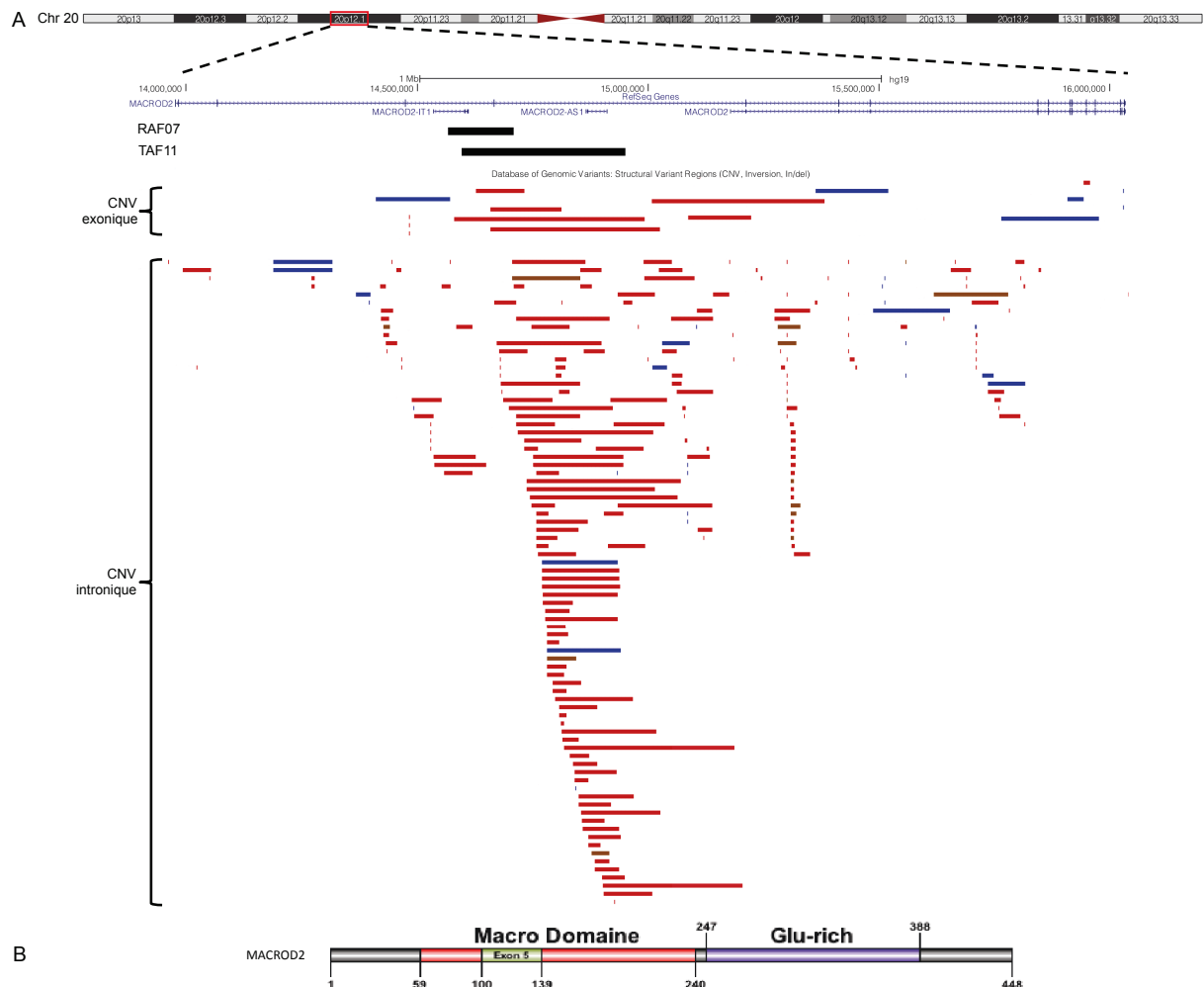


Figure 32: Récurrence des CNV décrits dans DGV : exemple du gène *MACROD2*

A : Position des deux délétions identifiées chez les deux sujets autistes qui entraînent la perte de l'exon 5 du gène. Dans DGV (mise à jour octobre 2014) on observe 7 CNV sur les 8 861 personnes testées au niveau de cet exon. B : Au niveau protéique, on observe que la protéine possède un domaine principal, le "MACRO" domaine. On constate que l'exon 5 code une partie de ce domaine, on peut donc supposer que son domaine n'est plus fonctionnel et que le CNV peut avoir une influence sur sa fonction.

I.2 : Identification et analyse de SNV

La partie codante d'un total de 216 gènes, dont 179 appartiennent au complexe NRC/MASC, a été capturée puis séquencée (Tableau 5), représentant environ 500 kb d'ADN génomique pour l'ensemble des gènes.

L'analyse des reads a indiqué que près de 65% d'entre eux couvrent nos régions d'intérêt à +/- 200 pb, que plus de 90% des bases de nos régions d'intérêt sont lues plus de 20 fois, qu'il y a peu de reads duplicats et que plus de 90% des bases s'alignent de manière unique sur le génome de référence GRCH37/hg19. Les reads conservés sont alors comparés au génome de référence, ce qui a permis d'obtenir 2 466 variations.

Chaque variation nucléotidique identifiée a été analysée sur les points suivants :

- Fréquence du variant au sein de la population générale, d'après les bases de données EVS, dbSNP et 1 000 Genome Project.
- Chaque variation ayant une fréquence < 1% dans la population générale a été évaluée pour son degré de pathogénicité avec quatre sites de prédiction (PROVEAN, SIFT, PolyPhen-2 et Mutation Taster). Toutes les variations prédites non pathogènes par au moins deux des quatre sites utilisés ont été exclues.
- Chaque variation ayant passé ces différents filtres a enfin été vérifiée par séquençage Sanger chez les sujets porteurs et chez leurs apparentés (Figure 29).

Au final, **72 variants** situés dans 57 gènes et retrouvés chez 52 patients ont été séquencés. Nous avons observé 2 SNV *de novo* (2,5%), et 59 SNV hérités d'un parent (74,7%) (Tableau 7).

SNV *de novo* :

- Une mutation *de novo* faux sens localisée dans le gène *PPP2RIA* [MIM605983] (hg19 g.Chr19:52714697C>T, c455C>T, p.Ser152Phe) a été détectée chez un garçon autiste et présentant un QI de 86 et des troubles du langage (TAF40; Figure 34B). Ce gène, exprimé fortement durant le développement du SNC, code une phosphatase qui appartient au complexe NRC/MASC et dont la fonction neuronale reste à déterminer. La sérine en position 152 est hautement conservée chez les vertébrés, *X. tropicalis* et *D. rerio*. Des mutations dans ce gène n'ont pas encore été identifiées dans l'autisme ou dans d'autres troubles neurodéveloppementaux ou neuropsychiatriques, néanmoins une mutation somatique

identique a été retrouvée dans un cas de mélanome malin (Clinical Variant database, accession RCV000072304.2 ; dbSNP rs267605629).

- Une délétion *de novo* de quatre bases (TTTC) a été retrouvée dans le gène *UPF3B* [MIM300298] (hg19 g.ChrX:118975169_118975172delTTTC, c.674_677delGAAA, p.Arg225Lysfs*22) chez le sujet TAF35 (Figure 34C). Il s'agit d'un garçon autiste ne présentant pas de dysmorphie et ayant un QI subnormal. De façon surprenante, Tarpey et collaborateurs ont rapporté cette mutation identique récurrente chez deux frères avec une DI syndromique (syndrome FG) de degré beaucoup plus sévère et des anomalies physiques (Tarpey *et al.*, 2007). Des études fonctionnelles sur l'ARNm ont montré une absence d'expression liée à la présence d'un codon stop prématuré, entraînant la dégradation de l'ARNm aberrant par la voie NMD (dégradation des ARNm non-sens). Les phénotypes observés entre notre patient et les deux frères de l'étude de Tarpey et collaborateurs sont très différents, suggérant soit un effet pléiotrope de la mutation ou l'implication de variants génétiques secondaires.

Des variations dans le gène *UPF3B* sont impliquées dans diverses pathologies neurodéveloppementales et neuropsychiatriques telles que la DI, la schizophrénie, et les TDAH (Laumonnier *et al.*, 2010; Addington *et al.*, 2011; Jolly *et al.*, 2013).

Les résultats de cette étude sont soumis pour publication et sont décrits dans la partie I-4.

Tableau 7 : Liste des SNV candidats identifiés au sein de la cohorte de sujets autistes

Patient	Sexe	Chr	Start (hg19)	Stop (hg19)	Ref	Call	Symbole	Conséquence	AA change	Supporting/Total reads	Hérité/ De Novo	dbSNP & 1000 genomes		EVS	SFARI Gene	
												dbSNP id	MAF	All Genotype Count	SNV	CNV
SNV de novo																
TAF35034RL	M	X	118975169	118975172	TTTC	----	UPF3B	Décalage de la phase de lecture		18/29	De Novo	Non		Non	Oui	Oui
		16	15814883	15814883	C	T	MYH11	Faux-sens	R1542Q	22/37	Père	rs143288748	0,0018/9	CC=0/ CT=20/ TT=6477	Non	Oui
TAF40039AR	M	19	52714697	52714697	C	T	PPP2R1A	Faux-sens	S152F	6/16	De Novo	rs267605629	NA	Non	Non	Non
SNV Hérité																
BAF05007JB	M	5	147494001	147494001	G	A	SPINK5	Faux-sens	G655D	18/46	Père & Soeur (sain)	rs142227576	0,0006/3	AA=0/ AG=36/ GG=6020	Non	Non
BAF06008YB	M	10	78846350	78846350	T	A	KCNMA1	Faux-sens, site d'épissage	I446F	61/111	Père & Frère (sain)	Non		Non	Oui	Oui
		3	65464362	65464362	C	G	MAG11	Faux-sens	R221P	65/154	Mère	Non		Non	Non	Oui
BAF09013RC	M	8	1626694	1626694	G	C	DLGAP2	Faux-sens	G788A	14/38	Père & Frère (sain)	Non		Non	Oui	Oui
BAF10014PM	F	10	105048373	105048373	A	C	INA	Faux-sens	K483Q	32/69	Père & Frère (sain)	rs185636023	0,0010/5	CC=0/ CA=2/ AA=6499	Non	Non
BAF10015LM	M	10	105048373	105048373	A	C	INA	Faux-sens	K483Q	20/44	Père & Frère (sain)	rs185636023	0,0010/5	CC=0/ CA=2/ AA=6499	Non	Non
BAF11017GL	M	1	182353682	182353682	C	T	GLUL	Faux-sens	R327Q	38/72	Père	Non		Non	Non	Oui
		3	49695184	49695184	C	G	BSN	Faux-sens	P2732R	28/58	Mère	rs201556520	0,0004/2	TT=0/ TC=1/ CC=6497	Non	Oui
BAF12018KR	M	17	72725478	72725478	C	G	RAB37	Faux-sens	F52L	28/73	Père & Frère (sain)	rs142549913	0,0012/6	GG=0/ GC=56/ CC=6447	Non	Oui
BAF12019YR	M	17	72725478	72725478	C	G	RAB37	Faux-sens	F52L	60/125	Père & Frère (sain)	rs142549913	0,0012/6	GG=0/ GC=56/ CC=6447	Non	Oui
BAF13020LL	F	14	72138225	72138225	A	G	SIPA1L1	Faux-sens	N882S	17/41	Mère & Frère (sain)	rs138550556	0,0014/7	GG=0/ GA=14/ AA=6489	Non	Oui
BAF14021OF	F	8	74204979	74204979	C	G	RPL7	Faux-sens	R23T	18/42	Mère	Non		Non	Non	Non
		2	54858137	54858137	G	A	SPTBN1	Faux-sens	G985S	52/101	Père & Frère (affecté)	Non		Non	Non	Non
BAF16023MJ	M	5	78746817	78746817	G	A	HOMER1	Faux-sens	S97L	21/41	Père & Frère (affecté)	rs201735834	NA	AA=0/ AG=5/ GG=5880	Oui	Oui
		22	41903841	41903841	C	G	ACO2	Faux-sens	L74V	15/38	Mère & Frère (affecté)	rs141772938	0,0016/8	GG=0/ GC=54/ CC=6448	Non	Non

Chapitre I : Caractérisation de CNV et SNV candidats

Patient	Sexe	Chr	Start (hg19)	Stop (hg19)	Ref	Call	Symbole	Conséquence	AA change	Supporting/Total reads	Hérité/ De Novo	dbSNP & 1000 genomes		EVS	SFARI Gene	
												dbSNP id	MAF	All Genotype Count	SNV	CNV
BAF16024SJ	M	2	54858137	54858137	G	A	<i>SPTBN1</i>	Faux-sens	G985S	34/71	Père & Frère (affecté)	Non	Non	Non	Non	
		5	78746817	78746817	G	A	<i>HOMER1</i>	Faux-sens	S97L	45/98	Père & Frère (affecté)	rs201735834	NA	AA=0/ AG=5/ GG=5880	Oui	Oui
		14	72138273	72138273	A	G	<i>SIPAIL1</i>	Faux-sens	N898S	46/104	Mère	rs141839740	NA	GG=0/ GA=3/ AA=6500	Non	Oui
BAF18026BL	M	22	41903841	41903841	C	G	<i>ACO2</i>	Faux-sens	L74V	32/62	Mère & Frère (affecté)	rs141772938	0,0016/8	GG=0/ GC=54/ CC=6448	Non	Non
		2	227661669	227661669	C	A	<i>IRS1</i>	Faux-sens	G596W	15/28	Père & Frères (affecté & sain)	Non	Non	Non	Non	
BAF18027NL	M	1	84610126	84610126	C	T	<i>PRKACB</i>	Faux-sens	R28W	61/148	Père	rs369569393	NA	TT=0/ TC=1/ CC=6502	Non	Oui
		2	227661669	227661669	C	A	<i>IRS1</i>	Faux-sens	G596W	24/42	Père & Frères (affecté & sain)	Non	Non	Non	Non	
BAF19028NT	M	6	102250302	102250302	G	A	<i>GRIK2</i>	Faux-sens	G398S	70/137	Mère & Frère (sain)	rs371912771	NA	AA=0/ AG=1/ GG=6501	Oui	Oui
		21	45738398	45738398	A	G	<i>PFKL</i>	Faux-sens	T378A	10/30	Père	rs151173166	0,0004/2	GG=0/ GA=2/ AA=6500	Non	Oui
RAF05005EP	F	6	33405560	33405560	G	A	<i>SYNGAP1</i>	Faux-sens	R293H	56/110	Mère & Frère (affecté, language disorder)	Non	Non	Oui	Oui	
		11	66033394	66033394	C	T	<i>KLC2</i>	Faux-sens	R505C	10/17	Père & Frère (Trouble du langage)	rs199498417	0,0006/3	Non	Oui	Non
RAF08008EB	M	8	1497146	1497146	G	T	<i>DLGAP2</i>	Faux-sens	C96F	24/40	Père (Epilepsie)	rs374898123	NA	TT=0/ TG=2/ GG=6476	Oui	Oui
RAF28028CL	M	3	115395293	115395293	A	C	<i>GAP43</i>	Faux-sens	K191T	7/19	Mère	Non	Non	Oui	Oui	
		19	51207413	51207413	C	G	<i>SHANK1</i>	Faux-sens	G396R	24/45	Père	Non	Non	Oui	Oui	
RAF29029VF	M	1	45980614	45980614	A	C	<i>PRDX1</i>	Faux-sens	V105G	43/97	Père	Non	Non	Non	Oui	
		10	95557483	95557483	C	T	<i>LGII</i>	Faux-sens	R533C	35/63	Père	Non	Non	Non	Oui	
TAF02002CM	M	8	1497368	1497368	C	A	<i>DLGAP2</i>	Faux-sens	S170Y	15/39	Mère	Non	Non	Oui	Oui	
		20	8717802	8717802	A	G	<i>PLCB1</i>	Faux-sens	N724S	25/59	Mère & Soeur (sain)	Non	Non	Oui	Oui	
TAF03003PA	M	X	144905819	144905819	C	T	<i>SLITRK2</i>	Faux-sens	L626F	77/77	Mère	rs149553831	NA	TT=0/ TC=5/ T=1/ CC=4055/ C=2442	Non	Non
TAF05005MF	F	3	196817888	196817888	C	T	<i>DLG1</i>	Faux-sens	R552H	16/31	Mère	rs141544348	0,0004/2	TT=0/ TC=3/ CC=6500	Non	Oui

Chapitre I : Caractérisation de CNV et SNV candidats

Patient	Sexe	Chr	Start (hg19)	Stop (hg19)	Ref	Call	Symbole	Conséquence	AA change	Supporting/Total reads	Hérité/ De Novo	dbSNP & 1000 genomes		EVS	SFARI Gene	
												dbSNP id	MAF	All Genotype Count	SNV	CNV
TAF06006AF	M	12	120150053	120150053	C	A	CIT	Faux-sens	R1595L	33/64	Mère	Non	NA	Non	Non	Oui
TAF09009DL	M	16	15857727	15857727	G	A	MYH11	Faux-sens	S359L	30/49	Mère	rs147496115	NA	AA=0/ AG=1/ GG=6496	Non	Oui
TAF11011JF	M	8	24776072	24776072	A	G	NEFM	Faux-sens	K902E	39/78	Mère	Non	NA	Non	Non	Oui
		11	18754915	18754915	T	C	PTPN5	Faux-sens	Y362C	54/117	Mère	rs367543226	NA	Non	Non	Oui
		19	54387498	54387498	G	A	PRKCG	Site d'épissage essentiel		32/70	Inconnu	Non	NA	Non	Non	Non
TAF12012CD	M	1	150786685	150786685	G	A	ARNT	Faux-sens	R661C	29/74	Père	Non	NA	Non	Non	Non
TAF13013MB	M	7	100276344	100276344	G	A	GNB2	Faux-sens	V315M	12/28	Mère	Non	NA	Non	Non	Oui
TAF16024VA	M	1	203670013	203670013	G	T	ATP2B4	Faux-sens	G288V	45/86	Mère	rs142206068	0,0040/20	TT=0/ TG=1/ GG=6502	Non	Oui
		11	84996317	84996317	C	T	DLG2	Faux-sens	E45K	31/51	Mère	rs373336609	NA	TT=0/ TC=1/ CC=5148	Non	Oui
TAF17016RD	M	14	72190481	72190481	TTCC	T---	SIPAIL1	Variation complexe	S1464.	31/128	Mère	rs141839740	NA	Non	Non	Oui
TAF22020KM	M	11	70333099	70333099	G	A	SHANK2	Faux-sens	P1036L	23/35	Père	rs200213968	NA	AA=0/ AG=2/ GG=6406	Oui	Oui
		14	23869498	23869498	C	T	MYH6	Faux-sens	M516I	37/76	Mère	Non	NA	Non	Non	Oui
TAF23021AS	F	7	91623942	91623942	A	G	AKAP9	Faux-sens	E195G	31/62	Mère	Non	NA	Non	Non	Oui
TAF25023NG	M	18	28935271	28935271	C	T	DSG1	Non-sens	R1038Stop	30/61	Père	Non	NA	Non	Non	Oui
TAF25023NG	M	7	128480982	128480982	G	A	FLNC	Faux-sens	D591N	18/33	Père	Non	NA	Non	Non	Oui
TAF26025AL	F	14	23858107	23858107	G	A	MYH6	Faux-sens	T1379M	13/25	Père	rs145611185	NA	AA=0/ AG=12/ GG=6491	Non	Oui
TAF27026DC	M	1	203681250	203681250	C	T	ATP2B4	Faux-sens	R732C	53/109	Mère	Non	NA	Non	Non	Oui
		17	26901112	26901112	G	A	ALDOC	Faux-sens	R258C	42/81	Mère	Non	NA	Non	Non	Non
TAF28027CT	M	7	78131047	78131047	G	A	MAGI2	Faux-sens	P271L	83/173	Père	rs147595175	NA	AA=0/ AG=2/ GG=6501	Non	Oui
TAF30029BQ	M	X	5821672	5821672	G	C	NLGN4X	Faux-sens	I369M	19/19	Mère	Non	NA	Non	Oui	Oui
		7	147926753	147926753	G	A	CNTNAP2	Faux-sens	R1088Q	38/80	Inconnu	rs201827086	0,0004/2	Non	Oui	Oui
TAF31030HC	F	7	146818170	146818170	G	C	CNTNAP2	Faux-sens	G285A	31/74	Mère	rs150918383	0,0004/2	CC=0/ CG=44/ GG=6459	Oui	Oui
TAF36035AL	M	12	117698412	117698412	G	A	NOS1	Faux-sens, site d'épissage	A742V	40/87	Mère	Non	NA	Non	Non	Oui
TAF37036JL	F	16	9857823	9857823	A	C	GRIN2A	Faux-sens	L1193W	5/21	Père	rs75761674	0,0002/1	Non	Oui	Oui
TAF41040HB	M	7	146818170	146818170	G	C	CNTNAP2	Faux-sens	G285A	21/48	Père	rs150918383	0,0004/2	CC=0/ CG=44/ GG=6459	Oui	Oui

Chapitre I : Caractérisation de CNV et SNV candidats

Patient	Sexe	Chr	Start (hg19)	Stop (hg19)	Ref	Call	Symbole	Conséquence	AA change	Supporting/Total reads	Hérité/ De Novo	dbSNP & 1000 genomes		EVS	SFARI Gene	
												dbSNP id	MAF	All Genotype Count	SNV	CNV
Autres SNV																
RAF03003LM	M	3	124117549	124117549	C	T	<i>KALRN</i>	Faux-sens	S724L	60/124	Inconnu	rs145790621	0,0004/2	TT=0/ TC=19/ CC=6484	Non	Non
		16	15854474	15854474	C	T	<i>MYH11</i>	Faux-sens	D398N	29/67	Inconnu	Non		Non	Non	Oui
RAF07007QD	M	7	128491324	128491324	C	T	<i>FLNC</i>	Faux-sens	R1860C	18/39	Inconnu	Non		TT=0/ TC=57/ CC=6148	Non	Oui
RAF14014BR	M	15	52689623	52689623	C	T	<i>MYO5A</i>	Faux-sens	G365D	31/59	Inconnu	Non		Non	Non	Oui
RAF20020LL	M	7	77824192	77824192	C	A	<i>MAGI2</i>	Faux-sens	R756S	27/49	Inconnu	Non		Non	Non	Oui
RAF22022EF	M	12	32772659	32772659	C	A	<i>FGD4</i>	Faux-sens	P456T	37/89	Inconnu	rs138160928	NA	AA=0/ AC=18/ CC=6485	Non	Oui
RAF23023TP	M	7	39726270	39726270	G	A	<i>RALA</i>	Faux-sens	A2T	51/115	Inconnu	rs148748965	0,0008/4	AA=0/ AG=16/ GG=6487	Non	Non
RAF24024LB	M	8	1639745	1639745	A	G	<i>DLGAP2</i>	Faux-sens	M837V	29/61	Inconnu	Non		Non	Oui	Oui
		14	23866188	23866188	C	T	<i>MYH6</i>	Faux-sens	G718R	14/24	Inconnu	Non		Non	Non	Oui
RAF25025CV	M	7	91727479	91727479	A	T	<i>AKAP9</i>	Faux-sens	D3555V	17/37	Inconnu	rs139046510	0,0006/3	TT=0/ TA=11/ AA=6490	Non	Oui
		16	58752439	58752439	C	T	<i>GOT2</i>	Faux-sens	D197N	45/94	Inconnu	rs149988435	0,0004/2	TT=0/ TC=15/ CC=6483	Non	Oui
		22	41895859	41895859	C	T	<i>ACO2</i>	Faux-sens	R56C	13/38	Inconnu	Non		Non	Non	Non
RAF27027EB	M	3	113513839	113513839	C	T	<i>ATP6V1A</i>	Faux-sens, site d'épissage	A370V	31/59	Inconnu	Non		Non	Non	Oui
RAF30030BD	M	1	173455435	173455436	---	CTCT	<i>PRDX6</i>	Décalage de la phase de lecture		81/82	Inconnu	Non		Non	Non	Non
		X	135750262	135750262	C	T	<i>ARHGEF6</i>	Faux-sens	V753M	24/24	Inconnu	Non		Non	Non	Oui
TAF04004NR	F	22	36685292	36685292	G	A	<i>MYH9</i>	Faux-sens	R1466W	23/46	Inconnu	rs139134727	0,0004/2	AA=0/ AG=43/ GG=6460	Non	Oui

Les données de la partie gauche du tableau sont les SNV identifiés par l'analyse. Pour chaque mutation nous avons regardé si elle était retrouvée dans les bases de données dbSNP & 1 000 genomes et EVS. Si la mutation était retrouvée, nous avons indiqué la fréquence à laquelle elle était retrouvée dans la population générale. Nous avons utilisé la base de données SFARI Gene (Mise à jour Septembre 2014) pour voir si les SNV observés chez nos patients ont déjà été retrouvés impliqués dans l'autisme. Nous avons utilisé la même base de données pour voir si des CNV étaient retrouvés dans les gènes mutés. Le caractère hérité/de novo a été évalué par séquençage Sanger.

SNV rares hérités :

Sur les 72 variations retrouvées, 38 SNV répartis chez 33 patients sont situés dans 28 gènes pour lesquels seuls des CNV ont été décrits dans l'autisme. Nous avons identifié 29 variations héritées (74,4%) et 10 variations dont l'origine parentale reste à établir (25,6%).

Par exemple, nous avons observé des mutations dans deux gènes de la famille des kinases guanylate associée à la membrane (MAGUK) : *DLG1* [MIM601014] chez le sujet TAF05 (Figure 34C) et *DLG2* [MIM603583] chez le sujet TAF16. Les deux mutations sont des mutations faux-sens, la mutation dans le gène *DLG1* entraîne le changement d'une arginine en histidine en position 552 (hg19 g.Chr3:196817888C>T, c.1655G>A, p.Arg552His) et la mutation dans le gène *DLG2* entraîne le changement d'un acide glutamique en lysine en position 45 (hg19 g.Chr11:84996317C>T, c.133G>A, p.Glu45Lys).

Le gène *DLG1* code une protéine qui contient plusieurs domaines d'échafaudage, qui va avoir un rôle dans la synaptogenèse (Sans *et al.*, 2001). Le gène *DLG2* code une protéine qui va former des hétérodimères avec des membres des MAGUK au niveau de la région post-synaptique. Les complexes formés vont permettre le regroupement des récepteurs, des canaux ioniques et des protéines de signalisation associées à la membrane post-synaptique (Kin *et al.*, 1996). Des CNV impliquant ces gènes ont été trouvés dans la population autistique (Quintero-Rivera *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2014; Autism Genome Project Consortium, 2007; Egger *et al.*, 2014), dans la DI, la schizophrénie et dans le syndrome micro-délétionnel 3q29 pour le gène *DLG1* (Willatt *et al.*, 2005; Mulle *et al.*, 2010).

Une mutation faux-sens (hg19 g.ChrX:135750262C>T, c.2257G>A, p.Val753Met) dans le gène *ARHGEF6* [MIM300267] localisé sur le chromosome X a été détectée chez le sujet RAF30 (Figure 34B). Chez ce même patient, une insertion de quatre bases dans le gène *PRDX6* [MIM602316] (hg19 g.Chr1:173455435_173455436insCTCT, c.441_442insCTCT, p.Tyr149Serfs*11) a également été observée. Le gène *ARHGEF6* code une protéine qui intervient dans la voie des Rho GTPase (Kutsche *et al.*, 2000). Aucun SNV n'est rapporté dans la littérature dans l'autisme, néanmoins des CNV ont été mis en évidence (Pinto *et al.*, 2010) et ce gène est candidat dans les déficiences intellectuelles liées à l'X (Kutsche *et al.*, 2000; Ramakers *et al.*, 2012)

Nous observons aussi des variations dans des nouveaux gènes candidats dans l'autisme. Par exemple chez le sujet TAF03 (Figure 34B) une variation nucléotidique faux-

sens a été identifiée dans le gène *SLITRK2* [MIM300561] (hg19 g.ChrX:144905819C>T, c.1876C>T, p.Leu626Phe). Ce gène code une protéine neuronale transmembranaire de la famille des SLITRK, qui affecte la croissance des neurites (Aruga et Mikoshiba, 2003). Cette mutation faux-sens est héritée de sa mère, selon un mode de transmission lié au chromosome X. Des variants ont été observés chez des patients schizophrènes (Piton *et al.*, 2011) ou dyslexiques (Huc-Chabrolle *et al.*, 2013).

En conclusion, nous avons également confirmé l'implication de SNV candidats pour l'autisme. En effet, 18 variations situées dans 14 gènes ont pu être identifiées chez 16 patients. La majorité de ces variants sont hérités (85%) et 5% d'entre elles sont *de novo*.

Mutations récurrentes identiques :

- Délétion *de novo* de quatre bases (TTTC) dans le gène *UPF3B* [MIM300298] (hg19 g.ChrX:118975169_118975172delTTTC, c.674_677delGAAA, p.Arg225Lysfs*22) chez le sujet TAF35 (Figure 34C).

- De manière similaire, les deux sujets de la famille BAF16 portent une mutation localisée dans le gène *HOMER1* [MIM604798] (hg19 g.Chr5:78749817G>A, c.290C>T, p.Ser97Leu) (Figure 34C) qui est déjà décrite par Kelleher et collaborateurs chez deux frères atteint d'autisme non syndromique (Kelleher *et al.*, 2012). Dans chaque famille, la mutation est héritée d'un parent sain (Figure 34C). Le gène *HOMER1* code une protéine d'échafaudage qui régule la fonction des récepteurs métabotropiques (Brakeman *et al.*, 1997). La protéine interagit avec une variété de protéines de la PSD, incluant les récepteurs métabotropiques et les protéines de la famille des SHANK. Le variant p.Ser97Leu est localisé dans le domaine Ena/VASP homology 1 (EVH1) qui permet à la protéine de se lier avec mGluR1, mGluR5 et Shank3 (Kelleher *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2000).

Gènes récurrents :

Pour les autres gènes nous avons identifié de nouvelles mutations qui à ce jour n'étaient pas encore répertoriées dans l'autisme. Par exemple, nous avons observé une mutation faux-sens, d'origine paternelle, dans le gène *KLC2* (hg19 g.Chr11:66033394C>T, c.1513C>T, p.Arg505Cys). Au sein de la cohorte on observe une récurrence au niveau de ce gène, en effet on a aussi observé une duplication de ce gène chez un patient.

Nous avons aussi identifié une nouvelle mutation faux-sens dans le gène *NLGN4X* [MIM300427] (hg19 ChrX:5821672G>C, c.1047C>G, p.Ile349Met) chez le sujet TAF30 (Figure 34B). Cette mutation est héritée de sa mère qui est atteinte d'une sévère dyslexie. Elle entraîne la modification d'une isoleucine, qui est hautement conservée chez les vertébrés, *C. elegans*, *D. rerio* et *X. tropicalis*, en méthionine en position 349.

Plusieurs SNV ont été trouvés dans un même gène, c'est le cas du gène *DLGAP2* [MIM605438] avec quatre variations différentes, du gène *MYH6* [MIM160710] *MYH11* [MIM160745] et *SIPAIL1* portant chacun trois variations, et du gène *ACO2* [MIM100850], *AKAP9* [MIM604001], *ATP2B4* [MIM108732], *FLNC* [MIM102565] et *MAGI2* [MIM608950] ayant deux variations.

SNV et modèles double-hit :

Pour certains patients, nous avons constaté la possibilité d'un modèle génétique faisant interagir au moins deux SNV candidats, chacun hérité d'un parent sain.

Ainsi, dans le cas de la famille BAF09 (Figure 33A, Figure 34C), nous avons observé deux SNV localisés respectivement dans le gène *MAGI1* [MIM602625] et *DLGAP2* chez notre patient. La mutation dans le gène *MAGI1* (hg19 g.Chr3:65464362C>G, c.662G>C, p.Arg221Pro) est héritée de sa mère et la mutation dans le gène *DLGAP2* (hg19 g.Chr8:1626694G>C, c.2363G>C, p.Gly788Ala) est héritée de son père et est partagée avec son frère sain.

La protéine *MAGI1* participe à la mise en place du complexe d'échafaudage au niveau des jonctions cellulaires (Laura *et al.*, 2002), tandis que la protéine *DLGAP2* agit dans l'organisation synaptique et la signalisation dans les cellules neuronales (Ranta *et al.*, 2000). Ces deux protéines interagissent directement au niveau de la PSD (Figure 33B; Alié et Manuel, 2010). Ainsi, alors que l'expression isolée de chaque variant rare n'aurait pas d'effet puisque retrouvé chez un parent et un frère sain, la co-expression spécifique des deux variants chez notre patient serait associée à l'autisme.

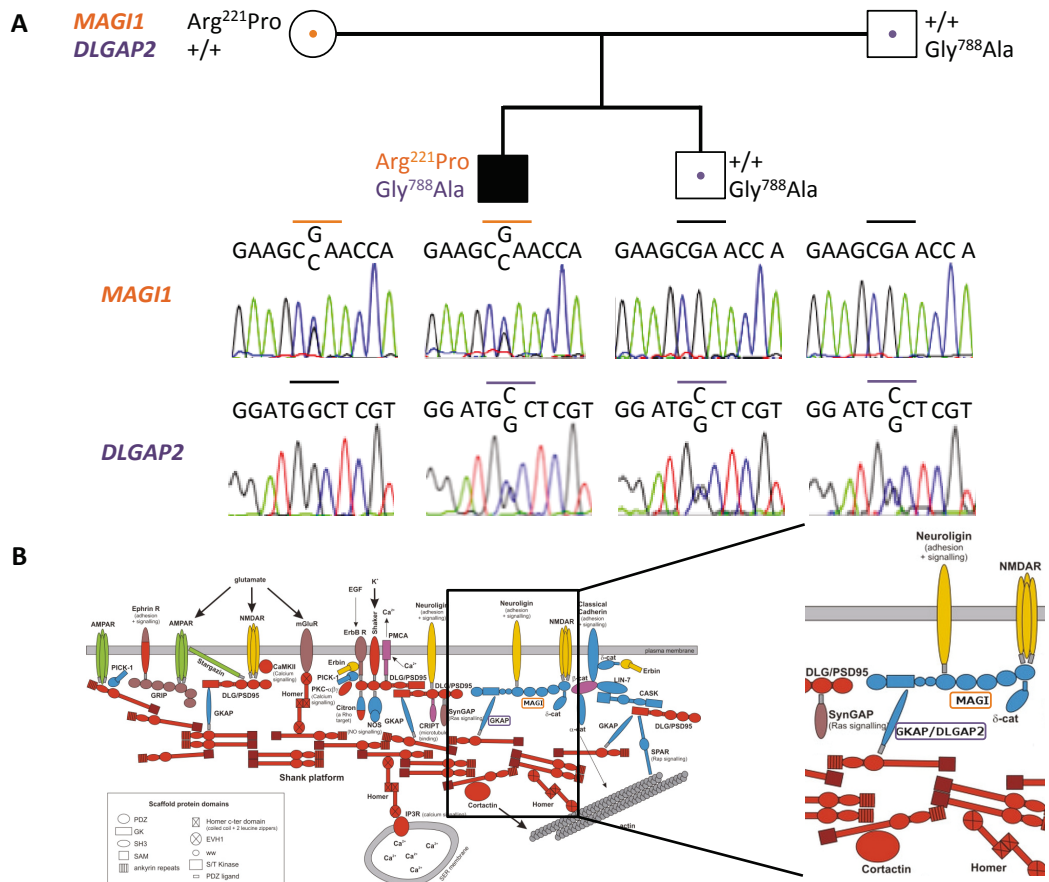


Figure 33 : Modèle génétique double-hit *MAGI1-DLGAP2* dans la famille BAF09

A : Arbre génétique de la famille BAF09 incluant un patient avec autisme (Carré noir) avec la ségrégation de la mutation dans le gène *MAGI1* (en orange) et dans le gène *DLGAP2* (en violet). B : Représentation schématique d'une partie du complexe d'échafaudage post-synaptique. Les protéines *MAGI1* et *DLGAP2* interagissent directement (D'après Alié et Manuel, 2010)

I.3 : Modèle génétique double-hit CNV + SNV

À côté de la mise en évidence de CNV ou de SNV candidats, nous avons également pu caractériser la présence simultanée de CNV et de SNV rares chez un même patient, soulignant encore une fois l'implication de mécanismes génétiques à plusieurs hits.

- Le patient RAF28 (Figure 34C) porte une duplication *de novo* au niveau de l'exon 8 du gène *GRM5*, qui est probablement associé à un impact délétère significatif. Ce sujet est également porteur de deux mutations faux-sens héritées, la première d'origine maternelle est située dans le gène *GAP43* [MIM162060] (hg19 g.Chr3:115395293A>C, c.572A>C, p.Lys191Thr), la deuxième d'origine paternelle est localisée dans le gène *SHANK1* [MIM604999] (hg19 g.Chr19:51207413C>G, c.1186G>C, p.Gly396Arg).

Ainsi, la co-expression des trois variations, de degré de pathogénicité variable, contribue probablement au tableau clinique retrouvé chez ce patient.

- Un deuxième exemple concerne la patiente TAF23 (Figure 34C) chez laquelle nous avons identifié deux SNV dans des gènes du complexe NRC/MASC et une délétion *de novo* localisée en 7q34. La première variation est une mutation faux-sens dans le gène *AKPA9* (hg19 g.Chr7:91623942A>G, c.584A>G, p.Glu195Gly) héritée du père. La deuxième variation, d'origine maternelle, est une mutation non-sens, dans le gène *DSGI* [MIM125670] (hg19 g.Chr18:28935271C>T, c.3112C>T, p.Arg1038*). À cela s'ajoute la délétion *de novo* qui entraîne l'haploinsuffisance des gènes, *PRSSI*, *TRY6* et *PRSS2*. La base de données SFARI Gene indique que des délétions de cette région 7q34, et impliquant le gène *PRSS2* (Prasad *et al.*, 2012), sont retrouvées chez des patients autistes (Girirajan *et al.*, 2013A).

- Enfin un dernier exemple similaire a été caractérisé chez le sujet TAF05 (Figure 34C) chez lequel la combinaison d'une mutation faux-sens (Tableau 7), d'origine maternelle, dans le gène *DLG1* (hg19 g.Chr3:196817888C>T, c.1655G>A, p.Arg552His) et une délétion transmise par son père au niveau du gène *SLC18A1* [MIM193002] (Tableau 6) a été identifiée. Le CNV entraîne la délétion des derniers exons (5 ou 6 en fonction de l'isoforme) du gène qui code un transporteur de monoamines, qui sont des neurotransmetteurs dérivés d'acides aminés (Peter *et al.*, 1993). On observe qu'une duplication complète et des SNV du gène *SLC18A1* ont été retrouvés dans l'autisme, la DI et du RD (Kaminsky *et al.*, 2001; Lohoff *et al.*, 2006; Richards *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2010)

Au final, les résultats de notre étude génétique nous ont permis de souligner que les gènes du complexe NRC/MASC et de la PSD sont des cibles privilégiées dans l'autisme.

Chapitre I : Caractérisation de CNV et SNV candidats

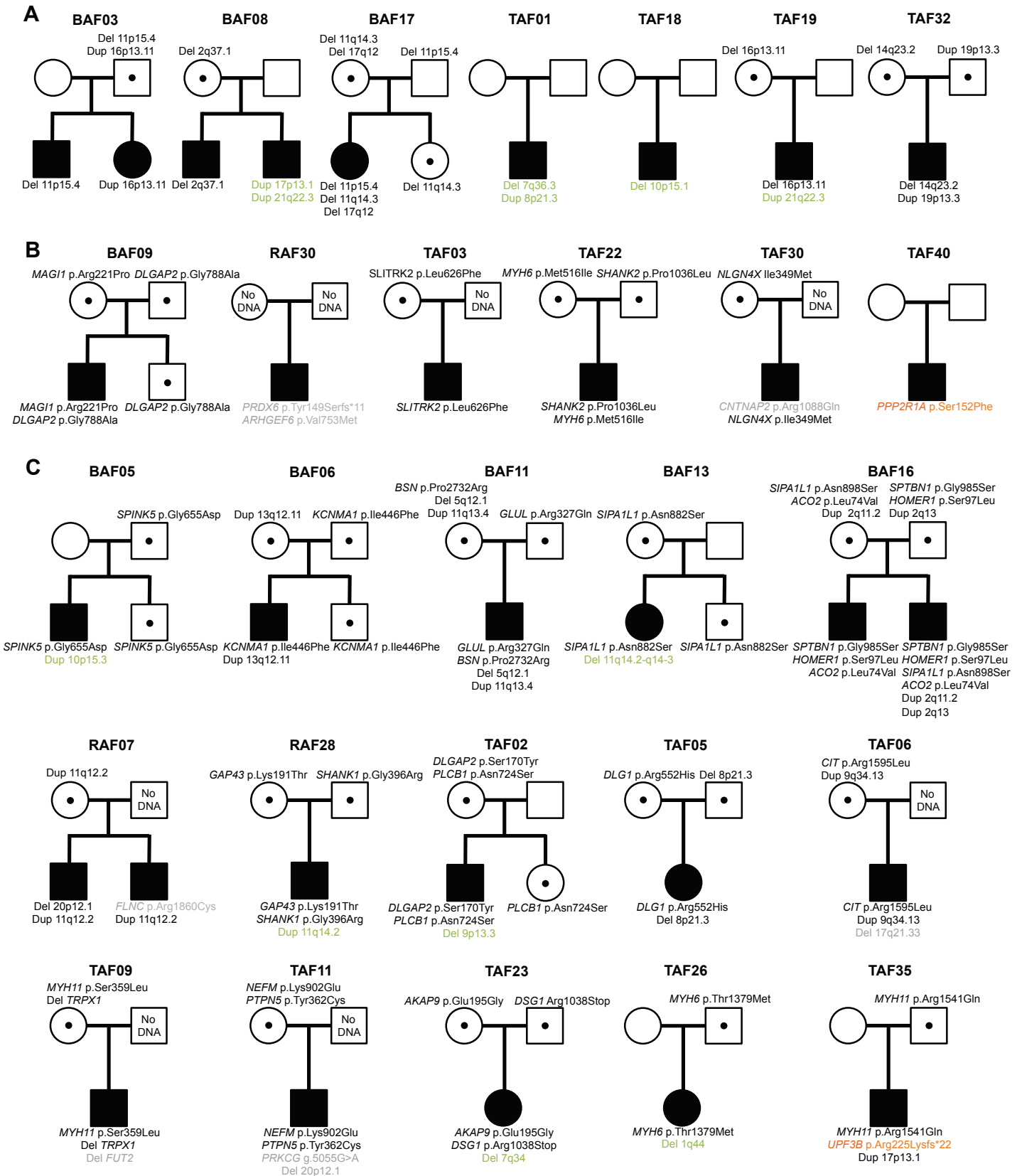


Figure 34 : Synthèse des résultats de l'analyse génétique

Représentation des familles avec les résultats les plus significatifs. Les carrés représentent les garçons et les ronds les filles, quand ils sont en noir cela indique que l'individu est atteint d'autisme. En A représentation des familles portant seulement des CNV, en B les familles n'ayant que des SNV et en C les familles ayant une association de CNV et SNV.

I.4 : Article 1

(Manuscrit soumis, Journal of Medical Genetics)

A recurrent *UPF3B* mutation, previously described in FG syndrome, identified in a patient with autism with no intellectual disability

Servane Alirol,^{1,2} Annick Toutain,^{1,2,3} Romuald Blanc,^{1,2,4} Christine Foulon,⁵ Rose-Anne Thépault,^{1,2} Sophie Blesson,³ Martine Raynaud,^{1,2,3} Nathalie Ronce,^{1,2,3} Christian R Andres,^{1,2,6} Sylviane Marouillat,^{1,2} Magali Bataille-Jallet,⁴ Isabelle Carteau-Martin,⁴ Marie Gomot,^{1,2,4} Eric Lemonnier,⁷ Dominique Champion,^{8,9,10} Valérie Gissot,⁵ Frédérique Bonnet-Brilhault,^{1,2,4} Frédéric Laumonnier.^{1,2,3}

1. INSERM, U930, Tours, France
2. University François-Rabelais, UMR “Imaging and Brain”, Tours, France
3. Centre Hospitalier Régional Universitaire, Service de Génétique, Tours, France
4. Centre Hospitalier Régional Universitaire, Service de pédopsychiatrie et d’explorations fonctionnelles, Tours, France
5. INSERM, Centre hospitalier regional universitaire, CIC 1415, Tours, France
6. Centre Hospitalier Régional Universitaire, Service de Biochimie et de biologie moléculaire, Tours, France
7. Centre hospitalier universitaire, Centre expert autism, Limoges, France
8. INSERM, U1079, Rouen, France
9. University of Rouen, Rouen, France
10. Centre hospitalier regional universitaire, Rouen, France

Corresponding author:

Dr Frédéric Laumonnier

Address: INSERM UMR930; Faculty of Medicine; 10 Bd Tonnellé; 37032 Tours cedex; France

Email: frederic.laumonnier@univ-tours.fr

Phone: +33 (0) 247366062

Key words: autism spectrum disorder; *UPF3B*; recurrent mutation; nonsense-mediated mRNA decay; FG syndrome

Word count: 1,041 including abstract

Mutations in the *UPF3B* gene have been described in various neurodevelopmental disorders including X-linked intellectual disability (ID), autism spectrum disorder (ASD) as well as schizophrenia. Within the framework of a sequencing study of more than 200 genes in patients with ASD, we identified the first case of a *de novo* frameshift mutation in *UPF3B* in a patient with autism without ID. Strikingly, this truncating variant has been previously reported in a family with FG syndrome and leads to protein loss-of-function. Our findings highlight *UPF3B* as a major candidate gene in ASD and suggest that this recurrent mutation might not be solely related to FG syndrome.

We initially recruited, through a translational clinical research project (ClinicalTrials NCT01770548 « Neurophysiological Molecular and Developmental Analysis of the Glutamate Synapse in Autism »), a patient with ASD who was the third child of healthy non-consanguineous French parents. His mother was 30 years old and his father 31 at the time of his birth. He had no family history of autism spectrum disorder but had one maternal cousin who suffered from schizophrenia. He was born at term with birth weight at 3180 g, height at 49.5 cm, and head circumference at 34.5 cm. He had developmental motor delay with axial hypotonia at 8 months and walking at 24 months. He had babbling during the first year of life but the first words appeared at 5 years associated with jargon and echolalia and first sentences at 7 with stereotypic sentences. Communication disorder was observed since the first year of life with lack of pointing, poor eye contact. Stereotypic movements appeared at 2 years with restricted interests and sensory particularities. He had no social interactions at school and was admitted at 7 in a specialized school where he learned reading and writing. At 14 he presented potomania. The same year he had ear surgery (mastoidectomy procedure) for cholesteatoma. At 18 he developed generalized anxiety disorder associated with mood disorder and obsessive compulsive disorder.

Clinical evaluation was conducted at 35 years. He met DSM-V criteria for autistic disorder.[1] His Autism Diagnostic Interview scores (based on “ever” scores) were 24 in the social domain (cutoff = 10), 17 in communication (non verbal) domain (cutoff = 7), and 9 in the repetitive/restrictive behaviors domain (cutoff = 3). Developmental abnormalities were identified before 36 months ADOS score module 3 was 16. Intellectual development was evaluated with WAIS III with Verbal IQ at 79 and Performance IQ at 68.

Physical examination revealed normal growth parameters (68.5 kg, 173.5 cm and 57.5 cm for head circumference) with no obvious dysmorphic features. He had a long face with a narrow and high nasal bridge, slightly protruding eyes and rings under his eyes. He had mild thoracic

kyphosis with sloping shoulders, poor muscles and hypotonic abdominal wall. Electroencephalogram at 15 years old was normal. Computed cerebral tomography showed no abnormalities (**Table 1**).

	Sporadic ASD case	FG syndrome Family	
	(Present study)	Brother 1	Brother 2
		(Tarpey et al. [3])	
Height > 97 th centile	No	No	No
Slender build	No	Yes	Yes
Head circumference > 97 th centile	No	Yes	Yes
Poor musculature	Yes	Yes	Yes
Dysmorphic features	No	Yes	Yes
Long, thin face	Yes	Yes	Yes
Maxillary hypoplasia	No	Yes	Yes
High arched palate	No	No	No
High nasal bridge	Yes	No	No
Pectus	ND	Yes	Yes
Hypotonia	No	No	Yes
Constipation	ND	Yes	Yes
Corpus callosum dysgenesis	No	Yes	Yes
Electroencephalography	Normal	ND	ND
Autism spectrum disorder	Yes	"Autistic features" in 1 brother	
DSM5 criteria	Yes	No	No
ADI scores	Yes	No	No
Intellectual Disability level (IQ)	Subnormal vIQ=79; pIQ=68	Severe (IQ=28)	Mild (IQ=56)
Behavioral problems	Anxiety disorder	Not reported	aggressivity

Table 1. Summary of clinical features in affected males from families with p.Arg225Lysfs*22 mutation

Standard karyotype was 46 XY, Fragile X syndrome *FMRI* mutation, 22q11.2 and 22qter microdeletions and 15q11-q13 microduplications were excluded. High-resolution array

Comparative Genomic Hybridization study (CGH 1M array, Agilent) did not detect any chromosomal rearrangement on patient's genomic DNA.

We next performed a targeted exon capture and next generation sequencing of 216 genes encoding proteins found at excitatory synapses, 179 of them belonging to the NMDA receptor multi-protein complex.[2] We identified a four-nucleotide deletion in exon 7 of the *UPF3B* gene (hg19 g.ChrX:118975169_118975172delTTTC), leading to a frameshift in the mRNA coding sequence and to a premature stop codon (p.Arg225Lysfs*22) (**Figure 1A**). The analysis of parents' genomic DNA revealed that the mutation appeared *de novo*. Strikingly, this sequence variation has been previously characterized in a family including male patients with a clinical diagnosis of FG syndrome.[3] Functional analyses revealed that the mutation led to an abnormal mRNA harbouring a premature stop codon and subject to degradation by the nonsense-mediated mRNA decay pathway.[3] No UPF3B protein expression was further detected, indicating that the mutation caused a loss-of-function of *UPF3B* in cells of FG syndrome patients.[3] Quantitative RT-PCR experiments on total RNA extracted from peripheral blood of our patient with ASD confirmed that *UPF3B* mRNA carried the frameshift mutation leading to a premature stop codon (**Figure 1B**). Lastly, Western blot analyses performed on lymphoblastoid cell lines revealed that the mutation was associated with the loss of UPF3B protein expression, as expected (**Figure 1C**).

To date more than 10 families have been reported to carry pathogenic UPF3B mutations associated with a large phenotypic spectrum of neurodevelopmental disorders.[3-7] Here we report the first characterization of a recurrent truncating mutation in this gene in one individual with ASD but without ID. His clinical picture is extremely different from the phenotype of the affected males from the FG syndrome family, which suggests that the Arg225Lysfs*22 mutation would not cause the entire phenotypic panel of FG syndrome *per se*. No clinical signs of FG syndrome were found in the patient with ASD, neither macrocephaly, nor corpus callosum dysgenesis that were reported by Tarpey et al in both male patients (**Table 1**).

Interestingly, a recent meta-analysis reported several recurrent *de novo* missense mutations in the *ALG13*, *CUX2*, *DUSP15* and *KCNQ3* genes identified in various exome studies on cohorts with various neurodevelopmental phenotypes such as ID, ASD, epileptic encephalopathy and schizophrenia.[8] However, there is evidence that the genetic background (co-expression of other *de novo* and/or rare gene variations) on which these mutations occur

substantially influences the phenotypic outcome.[9] Consequently, it is possible that the presence of additional rare and disruptive variants in the male patients with FG syndrome could contribute to the phenotypic variation and would be associated with the clinical spectrum of FG syndrome.

Accumulating evidence indicate that the UPF3B protein is likely to play a major role in neurodevelopment and synapse formation.[4,10] The observation of *UPF3B* loss-of-function mutations in various neurodevelopmental disorders suggests that the corresponding protein and the Nonsense Mediated mRNA decay (NMD) machinery are required for the regulation of the early formation of signalling pathways and circuits involved in cognitive and memory processes during the development of the central nervous system. The increasing number of subjects with ASD and *UPF3B* mutations confirms that this gene should be considered as one major candidate for ASD in male individuals. Further detailed phenotype-genotype correlations will certainly help into understanding *UPF3B* associated genetic disorders.

Acknowledgements

We warmly thank the patient and his family for their collaboration to this project, as well as the technical platform “PPF Analyses des systèmes biologiques” of the University François-Rabelais for providing access to NGS and CGH-array facilities. We thank our collaborators Pr Jozef Gecz and Dr Lachlan Jolly (Adelaide University) for their kind gift for the Sheep UPF3B antibody.

Competing interests

The authors declare non-competing interest

Funding

This study received fundings from INSERM and DGOS (“Translational Clinical Research” National Grant) to FBB, FL and VG, from Association pour le Développement de la Neurogénétique (to FBB and FL), from European Union (FP7 Gencodys project N°241995 to FL and PhD fellowship to SA), and from Fondation de France (to FL and FBB, grant n°2012-33662).

References

- 1 American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. Washington, DC: American Psychiatric Association 2013.
- 2 Laumonnier F, Cuthbert PC, Grant SGN. The role of neuronal complexes in human X-linked brain diseases. *Am J Hum Genet* 2007;80:205-20.
- 3 Tarpey PS, Raymond FL, Nguyen LS, et al. Mutations in UPF3B, a member of the nonsense-mediated mRNA decay complex, cause syndromic and nonsyndromic mental retardation. *Nat Genet* 2007;39:1127-33.
- 4 Laumonnier F, Shoubbridge C, Antar C, et al. Mutations of the UPF3B gene, which encodes a protein widely expressed in neurons, are associated with nonspecific mental retardation with or without autism. *Mol Psychiatry* 2010;15:767-76.
- 5 Xu X, Zhang L, Tong P, et al. Exome sequencing identifies UPF3B as the causative gene for a Chinese non-syndrome mental retardation pedigree. *Clin Genet* 2013;83:560-4.
- 6 Lynch SA, Nguyen LS, Ng LY, et al. Broadening the phenotype associated with mutations in UPF3B: two further cases with renal dysplasia and variable developmental delay. *Eur J Med Genet* 2012;55:476-9.
- 7 Addington AM, Gauthier J, Piton A, et al. A novel frameshift mutation in UPF3B identified in brothers affected with childhood onset schizophrenia and autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry* 2011;16:238-9.
- 8 Hoischen A, Krumm N, Eichler EE. Prioritization of neurodevelopmental disease genes by discovery of new mutations. *Nat Neurosci* 2014;17:764-72.
- 9 Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med* 2012;367:1321-31.
- 10 Jolly LA, Homan CC, Jacob R, et al. The UPF3B gene, implicated in intellectual disability, autism, ADHD and childhood onset schizophrenia regulates neural progenitor cell behaviour and neuronal outgrowth. *Hum Mol Genet* 2013;22:4673-87.

Figure legends

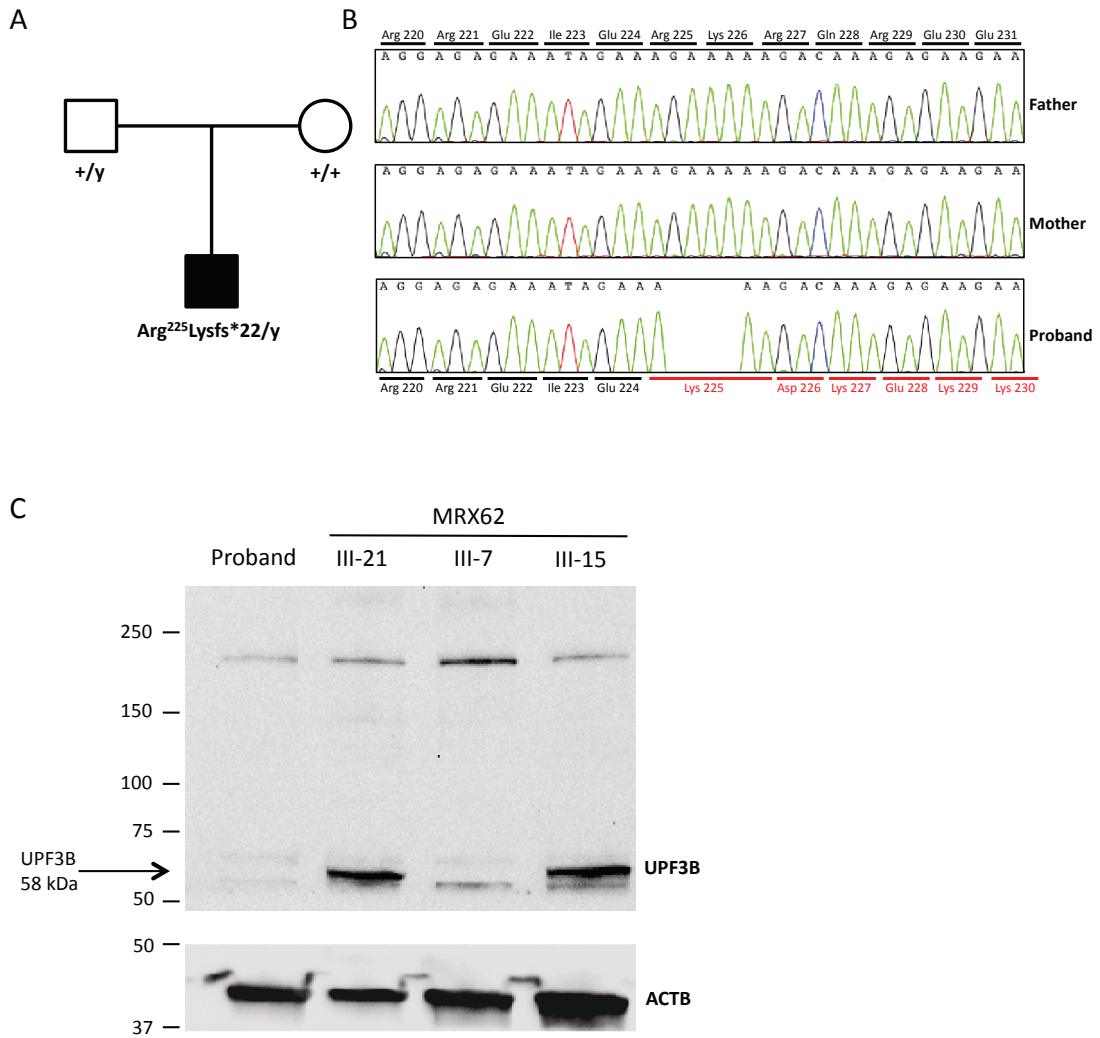
Figure 1: Identification of a *de novo* p.Arg225Lysfs*22 in UPF3B in a patient with autism and subnormal IQ.

(A) Family tree and segregation analysis of the mutation in the family (the other healthy siblings have not been tested).

(B) Sequencing data of exon 7 revealing the *UPF3B* mutation status for the proband and his parents.

(C) Western blot analysis realized on protein lysates (30 µg) extracted from lymphoblastoid cell lines from the proband, and from members from MRX62 family with a known truncating *UPF3B* mutation, as positive controls (III-7 is an affected mutated male subject ; III-15 is a healthy non mutated male subject ; III-21 is a heterozygous carrier healthy female reative).[4] The sheep *UPF3B*_913 antibody was used as previously described,[3,10] and a control protein blot using the monoclonal mouse anti-beta-Actin (ACTB)-peroxidase antibody A3854 (Sigma) is also shown (lower panel).

Figure 1 : Identification of a *de novo* p.Arg225Lysfs*22 in UPF3B in a patient with autism and subnormal IQ.



Chapitre II : Autisme, DI : modèles génétiques distincts

II.1 : Résumé de l'étude

La majorité des gènes impliqués dans l'autisme sont aussi retrouvés dans d'autres troubles neurodéveloppementaux et cela même au sein d'une même famille possédant une même mutation (Moraine *et al.*, 2009). Ainsi, des mutations dans le gène *NLGN4X*, sont décrites dans l'autisme, la DI, les TDAH, le RD et le syndrome de Tourette (Jamain *et al.*, 2003; Laumonnier *et al.*, 2004; Lawson-Yuen *et al.*, 2008; Willemsen *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013). Cette variabilité phénotypique, même au sein d'individus atteints dans une même famille, n'est cependant pas expliquée. Nous avons supposé que cette différence est due à un effet combinatoire de différentes mutations (ou SNV) dans le cadre d'un modèle multi-hit. Nous avons ré-analysé deux familles chez lesquelles une mutation dans le gène *NLGN4X* avait été identifiée dans le laboratoire, et était présente chez des individus ayant de l'autisme et/ou une DI (Laumonnier *et al.*, 2004; Daoud *et al.*, 2009).

La première famille (famille T118) comprend des sujets masculins atteints d'autisme (un sujet) ou de DI et porteurs d'une délétion de deux bases entraînant un décalage de phase de lecture dans le gène *NLGN4X* (hg19 g.ChrX:5821465-5821433delCT, c.1253-1254delAG, p.Glu418Aspfs*12). Cette mutation est transmise à chaque patient par leur mère saine, en accord avec un mode de transmission lié au chromosome X (Laumonnier *et al.*, 2004).

La deuxième famille inclut un garçon avec un autisme sévère avec une DI profonde et une régression associée à une mutation *de novo* dans la séquence promotrice du gène *NLGN4X* (hg19 g.ChrX6146223C>T) conduisant à une surexpression anormale du gène (Daoud *et al.*, 2009).

Nous avons réalisé une étude d'exome chez les deux patients autistes de chaque famille et un des membres de la première famille ayant une DI isolée. Pour réaliser la librairie et l'enrichissement nous avons utilisé le kit "SureSelectXT Human all Exon V5" (Agilent Technologie). Le séquençage de l'exome a été effectué avec le kit TruSeq SBS kit v5 sur une Genome Analyzer IIX (Illumina®) (Imaxio, Clermont-Ferrand).

Pour la famille T118, nous avons comparé les variations observées entre le patient autiste et un apparenté ayant une DI isolée pour ne filtrer que les variations retrouvées chez le patient. Nous avons alors observé une délétion d'une base dans le gène *GLRB* [MIM138492], causant un décalage de phase de lecture (hg19, g.Chr4:158057628_158057628delG,

c.305_305delG, p.Arg102Lysfs*6). Cette mutation transmise par sa mère n'est pas retrouvée ailleurs dans la famille. La combinaison de la mutation, à l'état hémizygote, dans le gène *NLGN4X* et la mutation, à l'état hétérozygote, dans le gène *GLRB* est donc spécifique à l'autisme. Le gène *GLRB* code la sous-unité β du récepteur à la glycine. Cette protéine est exprimée dans la région post-synaptique des synapses inhibitrices et s'associe avec la gephyrine et la collybistine qui interagissent avec la protéine NLGN4X (Hoon *et al.*, 2011). Ainsi la co-expression de ces deux mutations au niveau de la synapse inhibitrice durant le neurodéveloppement pourrait conduire à un réseau protéique altéré et affectant la structure et la fonction de la synapse.

Dans la deuxième famille, nous avons identifié une mutation rare, d'origine paternelle, dans le gène *ANK3* [MIM600465] (hg19 g.Chr10:61846456G>A, c.3727C>T, p.Arg1243Cys). La mutation est prédite délétère par les quatre sites de prédiction protéique que nous avons utilisé pour la capture d'exon ciblée (SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2 et Mutation Taster) et est absente des bases de données dbSNP, ESP et 1 000 Genomes. La mutation identifiée se situe dans le domaine fonctionnel ZU5 de la protéine ANK3. Ce domaine est aussi retrouvé dans les membres de la familles des Ankyrines (ANK1 et 2) et il représente un module d'interaction (Yasunaga *et al.*, 2012). On observe que l'Arginine en position 1 243 est fortement conservée au sein de la famille des Ankirines, mais aussi chez les vertébrés, la drosophile et *C. elegans* (Wang *et al.*, 2012). Le gène *ANK3* code la protéine Ankyrine-G dont on a récemment découvert le rôle dans des maladies neurodéveloppementales tel que la DI, la schizophrénie et les troubles bipolaires (Bi *et al.*, 2012; Iqbal *et al.*, 2013). Cela suggère que la co-expression de la mutation faux-sens, héritée, avec la mutation *de novo* dans le promoteur du gène *NLGN4X* est susceptible de contribuer au phénotype observé chez notre patient. La protéine ANK3 est une protéine d'échafaudage qui permettrait la formation du segment initial de l'axone dans les neurones. Récemment Smith et collaborateurs ont démontré que la protéine est aussi présente dans les dendrites et les épines des neurones glutamatergique et est impliquée dans la transmission synaptique médiée par les récepteurs AMPA et dans la maintenance de la morphologie des épines (Smith *et al.*, 2014). De plus, des expériences de co-immunoprécipitations ont mis en évidence une interaction entre ANK3 et le récepteur GRIA1, et par conséquent ANK3 s'associe à la NLGN4X par l'intermédiaire de la protéine PSD95 et du complexe de protéines transmembranaires régulatrices du récepteur AMPA (TARP). Durak et collaborateurs ont également récemment démontré qu'ANK3 régule la neurogenèse en favorisant la prolifération des cellules

neuronaux progénitrices via la modulation de la voie de signalisation WNT (Durak *et al.*, 2014). Ces résultats mettent en évidence la possibilité que la co-expression de la mutation dans le gène *ANK3* et de la mutation dans le promoteur du gène *NLGN4X* entraîne une altération du réseau protéique post-synaptique de la synapse excitatrice du patient.

Cette étude nous a permis d'identifier deux cas ayant un multi-hit, ce qui nous montre l'importance de ce modèle pour expliquer l'autisme, mais aussi les autres troubles neurodéveloppementaux et neuropsychiatriques. Nous avons également constaté l'implication d'un modèle génétique combinatoire permettant de distinguer, au sein d'une même famille, les sujets avec DI de celui ayant un autisme alors même que la mutation "majoritaire" est identique.

Enfin, l'analyse en électroencéphalographie de l'activité cérébrale des sujets des deux familles nous a permis de montrer que les mutations chez les patients autistes affectent des protéines interagissant au niveau des structures synaptiques et sont spécifiquement associées à un modèle électrophysiologique atypique ciblant la neurotransmission glutamate/GABA.

II.2 : Article 2

Article en révision favorable à *Molecular Psychiatry* (2 mars 2015)

GABA/Glutamate synaptic pathways targeted by integrative genomic and electrophysiological explorations distinguish autism from intellectual disability

Frédérique Bonnet-Brilhault,^{1,2,3,7} Servane Alirol,^{1,2,7} Romuald Blanc,^{1,2,3} Sébastien Bazaud,^{1,2} Sylviane Marouillat,^{1,2} Rose-Anne Thépault,^{1,2} Christian R. Andres,^{1,2,4} Éric Lemonnier,⁵ Catherine Barthélémy,^{1,2,3} Martine Raynaud,^{1,2,6} Annick Toutain,^{1,2,6} Marie Gomot,^{1,2} Frédéric Laumonier^{1,2,6}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U930, Tours, 37032, France

² UMR « Imaging and Brain », Université François-Rabelais, Tours, 37032, France

³ Centre Hospitalier Régional Universitaire, Service de pédopsychiatrie et d'explorations fonctionnelles, Tours, 37044, France

⁴ Centre Hospitalier Régional Universitaire, Service de Biochimie et de Biologie moléculaire, Tours, 37044, France

⁵ Centre Hospitalier Universitaire, Centre Expert Autisme, Limoges, 87042, France

⁶ Centre Hospitalier Régional Universitaire, Service de Génétique, Tours, 37044, France

⁷**Joint first authorship**

* Corresponding author: Dr Frédéric Laumonier, PhD

UMR « Imagerie et cerveau » Inserm U930 – Université François-Rabelais, Faculté de médecine, 10 boulevard Tonnellé, 37032 Tours cedex, France.

Phone: +33 247366062, Fax : +33 247366185.

E-mail address: frederic.laumonier@univ-tours.fr

Running title: NLGN4X multi-hit genetic model specific to autism

Abstract

Phenotypic and genetic heterogeneity is predominant in autism spectrum disorders (ASD), for which the molecular and pathophysiological bases are still unclear. Significant co-morbidity and genetic overlap between ASD and other neurodevelopmental troubles are also well established. However little is known about the frequent observation of a wide phenotypic spectrum, even within multiplex families, associated with deleterious mutations affecting a unique gene.

We performed a clinical, neurophysiological (*in vivo* electro-encephalography - Auditory Evoked Related Potentials) and genetic (whole-exome sequencing) follow-up analysis of 2 families with known deleterious *NLGN4X* gene mutations (either truncating or overexpressing) present in individuals with ASD and/or with intellectual disability (ID). Complete phenotypic evaluation of the pedigrees showed in the ASD cases common specific autistic behavioural features and neurophysiological pattern (abnormal MisMatch Negativity in response to auditory change) that were absent in healthy parents as well as in members with isolated ID. Whole-exome sequencing identified in ASD patients from each family, a second rare inherited genetic variant, affecting either the *GRLB* or the *ANK3* genes which encode *NLGN4X* interacting proteins expressed respectively in inhibitory or in excitatory synapses. The *GRLB* and *ANK3* mutations were absent in relatives with ID as well as in controls databases.

In summary, our findings provide evidence of a double-hit genetic model focused on excitatory/inhibitory synapses in ASD, not found in isolated ID and associated with an atypical *in vivo* neurophysiological pattern linked to predictive coding.

Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) represents a heterogeneous group of neurodevelopmental disorders characterized by an impaired social–communication function and by restricted, repetitive pattern of behaviour or interests (1). Although ASD is strongly heritable, the basis of the heritability remains mostly unexplained. Over the past decade, large-scale sequencing and genome-wide microarrays studies have made substantial advances into the genetic etiology of ASD, through the characterization of several hundreds of candidate genes indicating a strong genetic heterogeneity level (2-12). Most of these genes are also involved in other neurodevelopmental disorders, in particular intellectual disability (ID), and provide evidence for the alteration of common molecular functional pathways such as chromatin remodeling, synaptic function, and Wnt signaling during development (4,5). Several genetic models have been proposed in ASD, (Mendelian or polygenic) with the probable contribution of common and/or rare genetic variants (2,7), and recent targeted or whole-exome sequencing (WES) studies pointed out the significant impact of *de novo* mutations in ASD (8-12).

The phenotypic heterogeneity of ASD, particularly when regarding the severity of ASD, which may be associated with ID is also frequently reported even between patients from the same family with an identical mutation (7). However in most cases the genotype/phenotype correlations remain poorly explained and the associated molecular mechanisms are unclear.

The identification of truncating mutations in the *NLGN4X* gene [MIM300427] has significantly contributed to the emergence of the hypothesis of synaptic dysfunction in ASD. However it is still unknown how *NLGN4X* mutations can give rise to a wide range of phenotype of ASD, and/or cognitive impairment.

Beside phenotypic heterogeneity a potential electrophysiological endophenotype has been identified in the auditory modality in ASD. The Mismatch response recorded to any changes

occurring in a repetitive sequence of stimuli (Mismatch Negativity - MMN) has been proposed as an electrophysiological index related to predictive coding in autism (13), and was found specific to ASD, fairly heritable and reliable throughout development (14,15). Moreover the MMN has been found associated with autistic behaviours (14,15) and this again supports the validity of such an electrophysiological endophenotype as a possible mediator of gene/behaviour relationships.

Based on animal studies, an explanatory model of the MMN has been proposed involving both GABAergic and glutamatergic neurotransmission (13,16). Several studies in both control (17,18) and schizophrenic patients (19) have then demonstrated that NMDA antagonists selectively modulate the MMN response, without changing the other Auditory Evoked related Potentials (AEPs) sensory responses. NMDA receptors antagonists in parallel modify some aspects of the behaviour (induce social withdrawal) and cognition (reduce arousal level, working memory and executive functions) (20).

Finally glutamate has been implicated in behaviours associated with novelty (21) and is known to modulate the MMN electrophysiological response to change (22). This AEP response is thus particularly appropriate to study *in vivo* activity of the glutamate/GABA pathways in psychiatric population. Interestingly, several studies indicated that *NLGN4X* protein is expressed at both excitatory and inhibitory synapses (23,24).

One of the aims of our study was to understand the phenotypic variability associated with *NLGN4X* mutations by combining clinical, whole-exome resequencing and *in vivo* neurophysiological approaches. We thus re-assessed clinical, neuropsychological, *in vivo* neurophysiological (Event Related Potentials) data from 2 families with previously described deleterious *NLGN4X* mutations in individuals with ASD and/or ID (25,26), and performed a WES study. The purpose of our study was to characterize what distinguishes their phenotypes

from a molecular, cellular and cognitive standpoint.

Materials/Subjects and methods

Subjects and families

Family 1 includes affected males with ID or ASD and presents a classical X-linked inheritance model involving a frameshift *NLGN4X* gene (NM_020742) mutation (hg19, g.ChrX:5821465_5821466delCT, c.1253_1254delAG) inherited from their respective healthy mothers and encoding a truncated protein (p.Glu418Aspfs*12) (**25**). Family 2 includes a boy with severe autism, ID and regression associated with a *de novo* mutation in the *NLGN4X* gene promoter sequence (hg19, g.ChrX:6146223C->T) leading to abnormal gene overexpression (**26**). Written informed consent was obtained from both families and the genetic study was performed on genomic DNAs included in the samples collection for biological studies of the University Hospital of Tours that was approved by the Bio-ethical committee of the French ministry of Research (reference number DC-2008-308). Behavioural and neuropsychological data were re-assessed for both ASD cases from each family, and for 3 male subjects and one female obligate carrier belonging to family 1 (**25,26**).

Electroencephalography recordings

Auditory stimulus sequences consisting of 1000 Hz standard tones and 1100 Hz deviant tones (probability of occurrence: $p = 0.15$) delivered in random order, with the constraint that each deviant tone was preceded by at least 3 standard tones, were applied in affected and non-affected individuals of family 1 and patient of family 2 (**Figure 1A**). All tones had an intensity of 70 dB SPL and duration of 50 ms (5 ms rise/fall). A block of 1,000 stimuli was presented binaurally through headphones with a constant stimulus onset asynchrony (SOA) of 700 ms. Subjects watched a silent movie on a TV screen during the recording session that

lasted 15 minutes.

The electrodes were placed as previously described (14). EEG was recorded from 28 Ag/AgCl electrodes referenced to the nose. The EEG and EOG were amplified with an analog bandpass filter (0.5 - 70 Hz; slope 6 dB/octave) and digitized at a sampling rate of 256 Hz. The ERPs to deviant tones included at least 120 responses for each subject. MMN was measured in the difference waveforms obtained by subtracting the responses to the standard tones from responses to the deviant stimuli. MMN peak amplitude and latency were measured in each subject by locating the most negative deflection within a ± 30 ms latency window around 230 ms.

Genetic analyses

High-resolution array-Comparative Genomic Hybridization (aCGH) was carried out using Sureprint G3 1x1M microarrays (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) (hg19 assembly). WES study was performed on genomic DNA from 2 affected males from family 1 (patient III-1 with ASD, and relative II-5 with isolated ID), and on the sporadic case with severe ASD from family 2. We used the “SureSelectXT Human all Exon V5” kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) for exons capture and enrichment. The libraries were sequenced (TruSeq SBS kit v5 – Illumina®, San Diego, CA) on a Genome Analyzer IIX (Illumina®, San Diego, CA) with a paired end sequencing protocol. The reads were aligned with CASAVA v1.8 using hg19 reference genome (UCSC). More than 90% of targeted bases displayed at least 20X coverage. The sequence variations of interest were further validated by classical PCR followed by Sanger sequencing.

Results

Clinical findings and developmental trajectories

Phenotypic re-evaluation of the pedigrees has evidenced in the two ASD patients (individuals III-1 from family 1 and II-1 from family 2) and from both families common autistic behavioral features but different developmental trajectories and cognitive profiles (**Table 1**). Thus developmental history of case II-2 is marked by a regression both in language and cognitive abilities after 24 months with early signs of autism with eye contact loss at 12 months. At the opposite case III.1 presented language delay with first sentences at 5 years old, eye contact loss at 24 months but with a positive outcome after 6 years old with no regression. Cognitive profiles revealed typical cognitive heterogeneity for case III-1 with a preserved non- verbal IQ superior to verbal IQ and a severe ID for case II-1.

Furthermore the ASD case (III-1) of family 1 had a different cognitive profile from the other affected relatives although having the same *NLGN4X* mutation. Male patients presented mild ID or subnormal cognitive profile and ASD mother obligate carrier has a normal cognitive profile. Interestingly although developmental trajectories and cognitive profile were different between both ASD cases with different autism severity evidenced by CARS scores, their autistic profiles were similar in term of autistic core symptoms evaluated by Factor 1 items of BSE-R scale.

Atypical neurophysiological pattern detected in ASD patients and not in ID/healthy relatives

In the auditory modality, the Mismatch response recorded to any changes occurring in a repetitive sequence of stimuli (Mismatch Negativity, MMN) is a potential electrophysiological endophenotype in ASD (**14**). We applied this *in vivo* neurophysiological approach in affected and non-affected individuals of family 1 and patient of family 2. Very

interestingly, we found that the MMN pattern in the 2 families was affected only in probands with ASD, whereas it appeared normal in all other family members, whether they were healthy or with ID (**Figure 1B**). Both ASD patients presented significantly shortened MMN latencies compared to age-matched control groups (patient family 1 (III-1): 152 ms; patient family 2 (II-1): 138 ms) and an Fz/mean C3-C4 amplitude ratio below the normative value of 1 (Patient family 1: 0.4; Patient family 2: 0.6), which corroborates the atypical topographic distribution of the MMN.

Altogether, our clinical and electrophysiological findings suggest that specific neurophysiological pathways are involved in both ASD patients and are not linked by the sole impact of the *NLGN4X* mutation. The phenotypic variability regarding either ASD status or cognitive profiles observed in families that include patients having a similar deleterious mutation in a candidate gene would be caused by the combinatory effect of another factor, possibly genetic and including at least a second mutation in another gene, thus supporting a “two” or “multi-hit” model, as previously hypothesized (7).

Identification of rare inherited variants in *NLGN4X* synaptic partners in ASD patients

To validate the hypothesis of a significant role of additional genetic variations in ASD patients, a high-resolution genetic analysis including CNV mapping and WES study was performed on DNA extracted from peripheral blood lymphocytes from patients of both families. While high-resolution aCGH analyses did not identify any possibly pathogenic CNV (data not shown), the WES analysis detected single nucleotide variations (SNVs) only present in patients with ASD. In family1, a comparative WES was performed in 2 affected boys with either non-syndromic ID (II-3), or ASD (III-1) (**Figure 2A**), thus filtering genetic variations only present in patient III-1. We identified a heterozygous truncating mutation in the *GLRB*

gene [MIM138492] (NM_000824) (hg19, g.Chr4:158057628_158057628delG, c.305_305delG, p.Arg102Lysfs*6) in subject III-1, that was inherited from his unaffected mother (II-5) (**Figure 2A**). This frameshift mutation was absent in the other affected (with ID) and unaffected family members, indicating that the combination of a hemizygous *NLGN4X* mutation with a heterozygous truncating *GRLB* variation is specific to ASD in family 1. The p.Arg102Lysfs*6 variation in *GRLB* was absent in controls databases representing more than 7,500 individuals (1000 genomes project, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP) databases), whereas only 1 truncating SNV was found in 4,294 tested European American individuals from ESP (**27**), suggesting that such mutations in *GRLB* are rare. Homozygous and compound heterozygous mutations in *GRLB* are reported in patients with hyperekplexia [MIM614619], a rare neuromotor disorder associated with apnoeas, learning difficulties and speech delay (**28,29**). Consequently heterozygous mutations in *GRLB* would not be considered as pathogenic *per se*.

However, the *GRLB* gene encodes the β sub-unit of the postsynaptic glycinergic receptor (GlyR) expressed at inhibitory synapses, which directly interacts with gephyrin and collybistin proteins that both bind *NLGN4X* protein (**Figure 2C**) (**24**). Consequently, the synergistic effect of both mutations in these postsynaptic receptors during neurodevelopment might have led to an altered protein network involving *GRLB* and *NLGN4X* and probably affecting inhibitory synapse structure and function, and detected by *in vivo* brain electrophysiological analyses.

Similarly, the WES analysis in family 2 identified a rare non synonymous heterozygous mutation in the *ANK3* gene [MIM600465] (NM_020987)(hg19, g.Chr10:61846456G>A,c.3727C>T,p.Arg1243Cys) transmitted by the patient's father (**Figure 2B**). This missense variant was indicated deleterious by four prediction tools used for evaluating disease-causing potential of sequence alterations, *i.e.* SIFT (score 0.00, cut-

off 0.05), PROVEAN (score -7.5, cut-off -2.5), Polyphen-2 (probability 1), and Mutation taster (probability 0.999) (**30-33**), and was absent in dbSNP, ESP and 1000 genomes databases. The p.Arg1243Cys mutation is localized within the ZU5 functional domain of ANK3 that is also found in the other Ankyrin family members (ANK1 and 2) and that represents a protein interaction module (**34**). The Arginine 1243 is highly conserved in the ankyrins ANK1, ANK2 and through vertebrates, *Drosophila* and *C elegans* (**35**) (**Figure 3**). The *ANK3* gene encodes the Ankyrin-G protein and has been recently targeted in neurodevelopmental disorders including ID, schizophrenia and bipolar disorder (**36,37**). These data suggest that the co-expression of the inherited *ANK3* missense variation with the *de novo NLGN4X* promoter mutation is likely to contribute to the ASD phenotype. While ANK3 was initially involved as a scaffolding protein in the formation of the axon initial segment in neurons, Smith and co-workers demonstrated very recently that ANK3 protein is also present in dendrites and in spines of excitatory glutamatergic neurons, and is involved in AMPAR-mediated synaptic transmission and in maintenance of spine morphology (**38**). Furthermore, co-immunoprecipitation experiments indicated that ANK3 interacts with the AMPA receptor GRIA1, and consequently associates with NLGN4X protein through PSD95 (also called DLG4) and Transmembrane AMPA Regulatory Proteins (TARPs - such as stargazin which mediates the interaction between AMPARs and PSD95) binding (**Figure 2C**) (**38**). Durak et al. (2014) also provided evidence that ANK3 regulates neurogenesis by promoting neural progenitor proliferation through Wnt signaling pathway modulation (**39**). These findings highlight the possibility of an alteration of the excitatory postsynaptic protein network caused by NLGN4X/ANK3 mutations co-expressed in patient's cells.

Discussion

To date, it is estimated that more than 400 genes would be involved in ASD, as highlighted by recent large-scale sequencing studies in cohorts of ASD patients (3,4,40). Significant overlap is also found between ASD, ID and schizophrenia genes, at both CNV and SNV levels, either *de novo* or rare (41,42). For example, *de novo* mutations in the *SCN2A* gene have been identified in several exome studies involving patients with ASD, ID, Schizophrenia and epilepsy, as well as recurrent identical *de novo* mutations in the *ALG13*, *KCNQ3*, *SCN1A*, *DUSP15* genes (43). However it is yet unclear how similar or identical pathogenic mutations within a unique gene can lead to various phenotypes and impact differently on brain cognition.

Very recently, Bernier et al. (2014) described a genotype-first approach (44) applied to ASD and *CHD8* [MIM610528] gene mutations, and reported the isolation of a subtype of autism with macrocephaly, distinct faces and gastro-intestinal (GI) complaints from 15 individuals with ASD and or ID. However, according to the available clinical descriptions, 11/15 subjects had ID with variable severity and 3/15 did not have any GI problems, which already suggested variability in this so defined subtype. Consequently, one cannot exclude that supplementary factors (genetic or environmental) would modulate such clinical variability. As another example, mutations in the *UPF3B* [MIM300298] gene were reported in syndromic (FG syndrome) or non-syndromic X-linked ID, and in ASD without ID in more than 10 families published to date, also suggesting a significant phenotypic heterogeneity (45) that might be modulated by other interacting factors.

In their very recent study, Iossifov and colleagues proposed that the gene communality in neurodevelopmental disorders appeared to involve only the joint class of affected males with lower IQ and females, and that could be explained by *i*) diagnostic conflation (i.e. a geneticist would first indicate ID instead of ASD, whereas a child psychiatrist would diagnose ASD

first), *ii*) pleiotropic effect of the same mutation (initial hypothesis for family 1), *iii*) different consequences for different mutations in the same gene (as shown for families 1 and 2), and *iv*) varying genetic or environmental background (40).

Our findings are in favour of the hypothesis that the phenotypic heterogeneity and the comorbidity between ASD and ID present in our families would be explained by the expression of combinatory genetic events associating a *NLGN4X* gene variant (either rare or *de novo*) with a rare inherited mutation in a gene encoding a synaptic interacting protein, supporting a “two-hit“ genetic model. Furthermore, the MMN response previously modeled as reflecting activity of the GABA/Glutamate synapses (13) was found affected exclusively in the 2 patients with ASD. The fact that these two unrelated ASD patients share core features of autistic symptoms and a specific neurophysiological pattern suggests that the combined effect of two mutations might alter GABA/Glutamate mediated neurophysiological networks involved in change detection and affected in ASD.

Consequently, our integrative genetic and neurophysiological approach suggests that ID and ASD might involve distinct neurodevelopmental mechanisms, even if the major *NLGN4X* mutation in family 1 is identical in individuals whether they have ID or ASD. Very interestingly, a recent transcriptomic and bioinformatic study has proposed that specific molecular pathways are involved in autism, particularly targeting cortical layers and glutamate projection neurons, and would be partially distinct from those involved in ID, which would be in line with our findings (46).

When looking at the neurodevelopmental expression pattern, the RNA sequencing data from BrainSpan developmental transcriptome project (47,48), which summarizes gene expression from human early fetal to late adult stages, indicated that *NLGN4X*, *GRLB* and *ANK3* genes displayed a converging highest expression time frame at 1 year of age, in cortex, hippocampus, striatum, and cerebellum (Supplementary information). This spatio-temporal

window is also displayed by the *DLG4* and *GPHN* genes, which respectively encode postsynaptic excitatory and inhibitory markers, suggesting a critical period for synaptogenesis events and neuronal connectivity. Interestingly, the early signs of autism symptoms are clinically observed since this period.

In summary, we observed a combinatory multi-hit genetic model associated with ASD. The mutations in the autistic patients affect proteins interacting at synaptic structures, and are specifically associated with an atypical electrophysiological pattern targeting glutamate/GABA neurotransmission.

Besides finding novel candidate genes for ASD through genome-wide sequencing in large cohorts characterized however by a large phenotypic heterogeneity, it is very likely that the combination of clinical, genetic and neurophysiological expertise will allow a better characterization of biomarkers and genetic interplays specific to ASD, and ultimately to a better understanding of the associated defective neurodevelopmental processes.

Acknowledgements

We would like to thank the patients and their respective family for their collaboration in this project. We thank the Department “PPF Analyses des systèmes biologiques” of the University of Tours for providing technical support for sequencing experimental procedures. This study received funding from INSERM, University François-Rabelais of Tours, EU FP7 GENCODYS project (to FL, grant n°241995), Fondation de France (to FL and FBB, grant n°2012-33662), and from Association for the development of neurogenetics (ADN).

Conflict of interest

No competing financial interests

Supplementary information

Supplementary information is available at *Molecular Psychiatry*'s website

References

1. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th ed.* American Psychiatric Press: Washington, DC, USA, 2013.
2. Berg JM, Geschwind DH. Autism genetics: searching for specificity and convergence. *Genome Biol* 2012; **13**: 247.
3. Huguet G, Ey E, Bourgeron T. The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *Annu Rev Hum Genomics Hum Genet* 2013; **14**: 191-213.
4. De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Ercument Cicek A *et al.* Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* 2014; **515**: 209-215.
5. Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res* 2011; **1380**: 42-77.
6. Krumm N, O'Roak BJ, Shendure J, Eichler EE. A de novo convergence of autism genetics and molecular neuroscience. *Trends Neurosci* 2014; **37**: 95-105.
7. Moraine C, Bonnet-Brilhault F, Laumonnier F, Gomot M. Could autism with mental retardation result from digenism and frequent de novo mutations? *World J Biol Psychiatry* 2009; **10**: 1030-1036.
8. Awadalla P, Gauthier J, Myers RA, Casals F, Hamdan FF, Griffing AR *et al.* Direct measure of the de novo mutation rate in autism and schizophrenia cohorts. *Am J Hum Genet* 2010; **87**: 316-324.
9. Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, Murdoch JD, Raubeson MJ, Willsey AJ *et al.* De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* 2012; **485**: 237-241.

10. Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'ayan A, Samocha KE, Sabo A *et al.* Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* 2012; **485**: 242-245.
11. O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP *et al.* Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 2012; **485**: 246-250.
12. Iossifov I, Ronemus M, Levy D, Wang Z, Hakker I, Rosenbaum J *et al.* De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 2012; **74**: 285-289.
13. Wacongne C, Changeux JP, Dehaene S. A neuronal model of predictive coding accounting for the mismatch negativity. *J Neurosci* 2012; **32**: 3665-3678.
14. Gomot M, Blanc R, Clery H, Roux S, Barthelemy C, Bruneau N. Candidate electrophysiological endophenotypes of hyper-reactivity to change in autism. *J Autism Dev Disord* 2011; **41**: 705-714.
15. Gomot M, Giard MH, Adrien JL, Barthelemy C, Bruneau N. Hypersensitivity to acoustic change in children with autism: electrophysiological evidence of left frontal cortex dysfunctioning. *Psychophysiology* 2002; **39**: 577-584.
16. Schroeder CE, Javitt DC, Steinschneider M, Mehta AD, Givre SJ, Vaughan HG Jr *et al.* N-methyl-D-aspartate-enhancement of phasic responses in primate neocortex. *Exp Brain Res* 1997; **114**: 271-278.
17. Kreitschmann-Andermahr I, Rosburg T, Demme U, Gaser E, Nowak H, Sauer H. Effect of ketamine on the neuromagnetic mismatch field in healthy humans. *Brain Res Cogn Brain Res* 2001; **12**: 109-116.
18. Korostenskaja M, Nikulin VV, Kicić D, Nikulina AV, Kähkönen S. Effects of NMDA receptor antagonist memantine on mismatch negativity. *Brain Res Bull* 2007; **72**: 275-283.

19. Lahti AC, Weiler MA, Tamara Michaelidis BA, Parwani A, Tamminga CA. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* 2001; **25**: 455-467.
20. Krystal JH, Bennett A, Abi-Saab D, Belger A, Karper LP, D'Souza DC *et al.* Dissociation of ketamine effects on rule acquisition and rule implementation: possible relevance to NMDA receptor contributions to executive cognitive functions. *Biol Psychiatry* 2000; **47**: 137-143.
21. Gallinat J, Kunz D, Lang UE, Neu P, Kassim N, Kienast T *et al.* Association between cerebral glutamate and human behaviour: the sensation seeking personality trait. *Neuroimage* 2007; **34**: 671-678.
22. Umbricht D, Koller R, Vollenweider FX, Schmid L. Mismatch negativity predicts psychotic experiences induced by NMDA receptor antagonist in healthy volunteers. *Biol Psychiatry* 2002; **51**: 400-406.
23. Graf ER, Zhang X, Jin SX, Linhoff MW, Craig AM. Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 2004; **119**: 1013-1026.
24. Hoon M, Soykan T, Falkenburger B, Hammer M, Patrizi A, Schmidt KF *et al.* Neuroligin-4 is localized to glycinergic postsynapses and regulates inhibition in the retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 3053-3058.
25. Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP *et al.* (2004). X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet* 2004; **74**: 552-557.
26. Daoud H, Bonnet-Brilhault F, Védrine S, Demattéi MV, Vourc'h P, Bayou N *et al.* Autism and nonsyndromic mental retardation associated with a de novo mutation in the NLGN4X gene promoter causing an increased expression level. *Biol Psychiatry* 2009; **66**: 906-910.

27. Fu W, O'Connor TD, Jun G, Kang HM, Abecasis G, Leal SM *et al.* Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants. *Nature* 2013; **493**: 216-220.
28. Chung SK, Bode A, Cushion TD, Thomas RH, Hunt C, Wood SE *et al.* GLRB is the third major gene of effect in hyperekplexia. *Hum Mol Genet* 2013; **22**: 927-940.
29. Thomas RH, Chung SK, Wood SE, Cushion TD, Drew CJ, Hammond CL *et al.* Genotype-phenotype correlations in hyperekplexia: apnoeas, learning difficulties and speech delay. *Brain* 2013; **136**: 3085-3095.
30. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE* 2012; **7**: e46688.
31. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 2001; **11**: 863–874.
32. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010; **7**: 248-249.
33. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* 2010; **7**: 575-576.
34. Yasunaga M, Ipsaro JJ, Mondragón A. Structurally similar but functionally diverse ZU5 domains in human erythrocyte ankyrin. *J Mol Biol* 2012; **417**: 336-350.
35. Wang C, Yu C, Ye F, Wei Z, Zhang M. Structure of the ZU5-ZU5-UPA-DD tandem of ankyrin-B reveals interaction surfaces necessary for ankyrin function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 4822-4827.
36. Bi C, Wu J, Jiang T, Liu Q, Cai W, Yu P *et al.* Mutations of ANK3 identified by exome sequencing are associated with autism susceptibility. *Hum Mutat* 2012; **33**: 1635–1638.
37. Iqbal Z, Vandeweyer G, van der Voet M, Waryah AM, Zahoor MY, Besseling JA *et al.*

- Homozygous and heterozygous disruptions of ANK3: at the crossroads of neurodevelopmental and psychiatric disorders. *Hum Mol Genet* 2013; **22**: 1960–1970.
38. Smith KR, Kopeikina KJ, Fawcett-Patel JM, Leaderbrand K, Gao R, Schürmann B *et al.* Psychiatric Risk Factor ANK3/Ankyrin-G Nanodomains Regulate the Structure and Function of Glutamatergic Synapses. *Neuron* 2014; **84**: 399-415.
39. Durak O, de Anda FC, Singh KK, Leussis MP, Petryshen TL, Sklar P *et al.* Ankyrin-G regulates neurogenesis and Wnt signaling by altering the subcellular localization of β -catenin. *Mol Psychiatry* 2014, e-pub ahead of print 13 May 2014; doi:10.1038/mp.2014.42.
40. Iossifov I, O’Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D *et al.* The contribution of *de novo* coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* 2014; **515**: 216-221.
41. Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL, Legallic S, Goldenberg A, Drouin-Garraud V *et al.* Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Arch Gen Psychiatry* 2009; **66**: 947-956.
42. Stessman HA, Bernier R, Eichler EE. Genotype-First Approach to Defining the Subtypes of a Complex Disease. *Cell* 2014; **156**: 872-877.
43. Hoischen A, Krumm N, Eichler EE. Prioritization of neurodevelopmental disease genes by discovery of new mutations. *Nat Neurosci* 2014; **17**: 764-772.
44. Bernier R, Golzio C, Xiong B, Stessman HA, Coe BP, Penn O *et al.* Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell* 2014; **158**: 263-76.
45. Laumonnier F, Nguyen LS, Jolly L, Raynaud M, Gecz J. UPF3B gene and nonsense-mediated mRNA decay in autism spectrum disorders. In Patel VB *et al.* (eds). *Comprehensive guide to Autism*. Springer Science+Business Media: New York, USA, 2014, pp 1663-1678.

46. Parikshak NN, Luo R, Zhang A, Won H, Lowe JK, Chandran V *et al.* Integrative functional genomic analyses implicate specific molecular pathways and circuits in autism. *Cell* 2013; **155**: 1008-1021.
47. Kang HJ, Kawasawa YI, Cheng F, Zhu Y, Xu X, Li M *et al.* Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* 2011; **478**: 483-489.
48. Miller JA, Ding S, Sunkin SM, Smith KA, Ng L, Szafer A *et al.* Transcriptional landscape of the prenatal human brain. *Nature* 2014; **508**: 199-206.

Figures titles and legends

Figure 1: Electro-EncephaloGraphy (EEG) recordings

A- Previous study in patients with autism showed that the MMN pattern was atypical in two ways when compared to non ASD individuals (15). First it was characterized by shorter latency compared to subjects from an age-matched control database (left picture). Second atypical response topography was recorded, characterized by a bilateral distribution of the negativity (in red) instead of the usual fronto-central MMN (right picture).

B- MMN scalp potential maps recorded in both families. The MMN distribution characteristic of ASD was recorded in both probands with autism. None of the ID patients or healthy subjects from family 1 displayed such an atypical MMN pattern.

Figure 2: Families trees and combination of mutations in postsynaptic interacting proteins.

A- Pedigree of family 1 including male patients with non-syndromic ID (black square) or ASD (shaded square) and displaying the repartition of the *NLGN4X* frameshift mutation as well as the presence of the *GLRB* mutation in the ASD subject (III-1) and in his mother (II-7).

B- Pedigree of family 2 including the male ASD patient carrying a *de novo NLGN4X* promoter mutation and a missense mutation in the *ANK3* gene inherited from his healthy father.

C- Schematic representation of the synaptic structure depicting the level of interaction between *NLGN4X* and *GLRB* proteins at inhibitory synapses, and between *NLGN4X* and *ANK3* at excitatory synapses.

Figure 3: Conservation analysis of the ANK3 p.Arg1243Cys mutation

Evidence for high conservation level of the Arginine 1243. The predicted secondary structures are indicated as described in (32). The Arginine 1243 (labeled in red character) is embedded in a fully conserved β sheet. The non-conserved amino-acid sequences are shaded in black.

Protein sequence Uniprot accession numbers used for alignment:

Q12955 : ANK3 *Homo sapiens* ; P16157 : ANK1 *Homo sapiens* ; Q01484 : ANK2 *Homo sapiens* ; G3QMX5 : ANK3 *Gorilla gorilla* ; H2Q1Y0 : ANK3 *Pan troglodytes* ; G7N2F0 : ANK3 *Macaca mulatta* ; H2NAT9 : ANK3 *Pongo abelii* ; G1L9X1 : ANK3 *Ailuropoda melanoleuca* ; F1PJ98 : ANK3 *Canis familiaris* ; M3XEN9 : ANK3 *Felis catus* ; G3TQ10 : F1RG02 : ANK3 *Sus scrofa* ; E1BNC9 : ANK3 *Bos taurus* ; G1SJX5 : ANK3 *Oryctolagus cuniculus* ; F6ZXD3 : ANK3 *Equus caballus* ; ANK3 *Loxodonta africana* ; G5E8K5 : ANK3 *Mus musculus* ; O70511 : ANK3 *Rattus norvegicus* ; F1NNX7 : ANK3 *Gallus gallus* ; R0LRA1 : ANK3 *Anas platyrhynchos* ; F1QNB1 : ANK3 *Danio rerio* ; G5ECZ1 : ANK *Caenorhabditis elegans* ; A8JNM7 : ANK2 *Drosophila melanogaster*.

Web resources

The URLs for data presented herein are as follows:

1000 Genomes, <http://browser.1000genomes.org/index.html>

Exome Variant server, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>

BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.omim.org/>

MutationTaster, <http://www.mutationtaster.org>

PolyPhen-2, www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2/

SIFT, <http://sift.jcvi.org/>

RefSeq, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>

UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/>

BrainSpan, <http://www.brainspan.org>

Table 1. Clinical findings and developmental trajectories

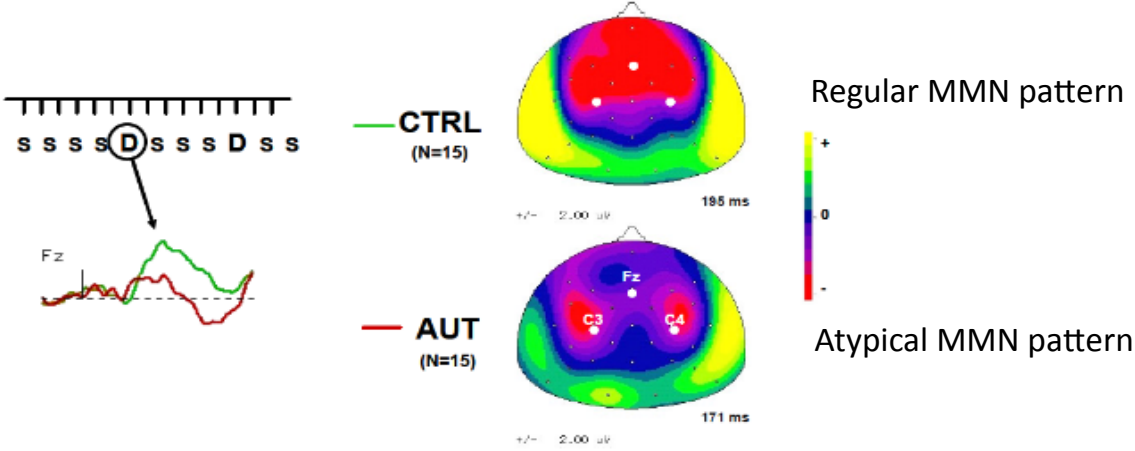
	FAMILY 2 ASD case NLGN4X promoter + ANK3	FAMILY 1 ASD case NLGN4X + GLRB	FAMILY 1 ID relative (II-8) NLGN4X fs	FAMILY 1 ID relative (II-3) NLGN4X fs	FAMILY 1 ID relative (II-5) NLGN4X fs
Developmental trajectories (in months, m.)	Loss of eye contact: 12 m. Walking age: 15 m. First words: 15 m. Language regression: 24 m. Lack of cognitive development after 30 m.	Eye contact present until 24 m. Walking age: 20 m. First words: 24 m. Autistic social and behav. symptoms: 24 m. 1st sentences : 5 years, no language regression Positive outcome	No ASD No language delay	No ASD No language delay	No ASD No language delay
ADI-R scores					
. Social Interaction (cut-off 10)	27	13	N/D	N/D	N/D
. Communication and Language (cut-off 7)	14	13	N/D	N/D	N/D
. Restricted and Repetitive behaviors (cut-off 3)	7	4	N/D	N/D	N/D
Onset before 36 months	3	3	N/D	N/D	N/D
Autistic Behavioural profiles (BSE-R scale)	SOC VOI GES ATT	SOC VOI GES ATT	N/A	N/A	N/A
Factor 1, items score>2					
CARS	40	30	N/A	N/A	N/A
Cognitive Profiles	EDEI-R - Global Developmental Quotient : 16- Motor Coordination Quotient: 14- Language Quotient: 14	Weschler - Global IQ: N/A - Non Verbal IQ : 88 - Verbal IQ : 37	Weschler - Global IQ : 72 - Non Verbal IQ : 63 - Verbal IQ :79	Weschler 63 60 70	Weschler 77 75 82
EEG	spikes	Normal	N/A	N/A	N/A
MRI	Normal	Morphometric : normal	N/A	N.A	N/A
MMN pattern	Atypical	Atypical	Typical	Typical	Typical

Age at evaluation: Family 1, ASD case (III-1): 8.5 years; Family 2, ASD case (II-1): 12 years

SOC: Social Interaction difficulties; **VOI:** Does not try to communicate using voice or speech; **GES:** Gestures and mimic expression difficulties; **ATT:** Loss of initiative, reduced spontaneous activity; **CARS:** Childhood Autism Rating Scale; **EEG:** ElectroEncephaloGraphy; **IQ:** Intellectual Quotient; **MRI:** Magnetic Resonance Imaging; **MMN:** MisMatch Negativity; **N/D:** Not Determined; **N/A:** Not Available

Figure 1: Electro-EncephaloGraphy (EEG) recordings

A



B

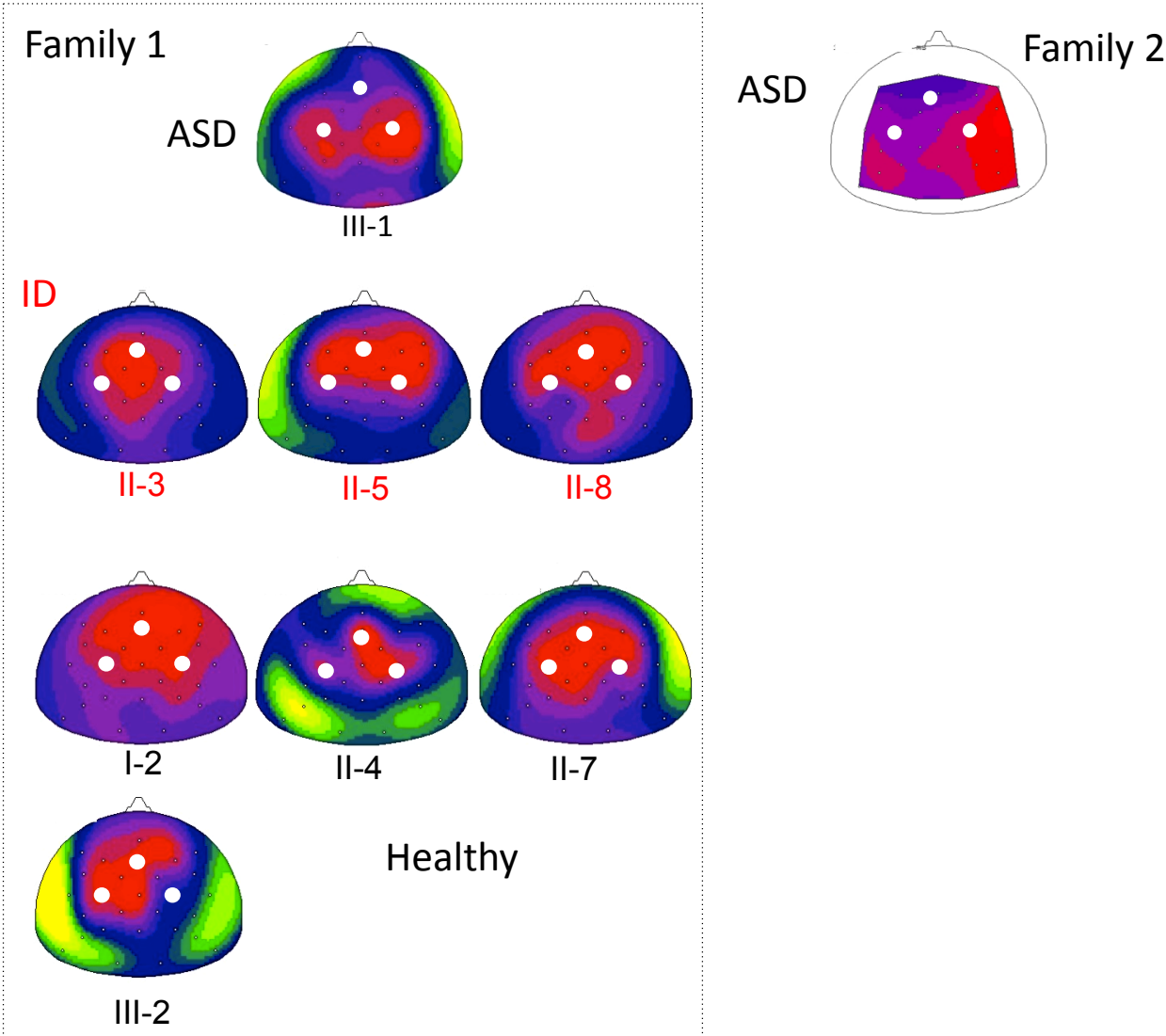


Figure 2: Families trees and combination of mutations in postsynaptic interacting proteins.

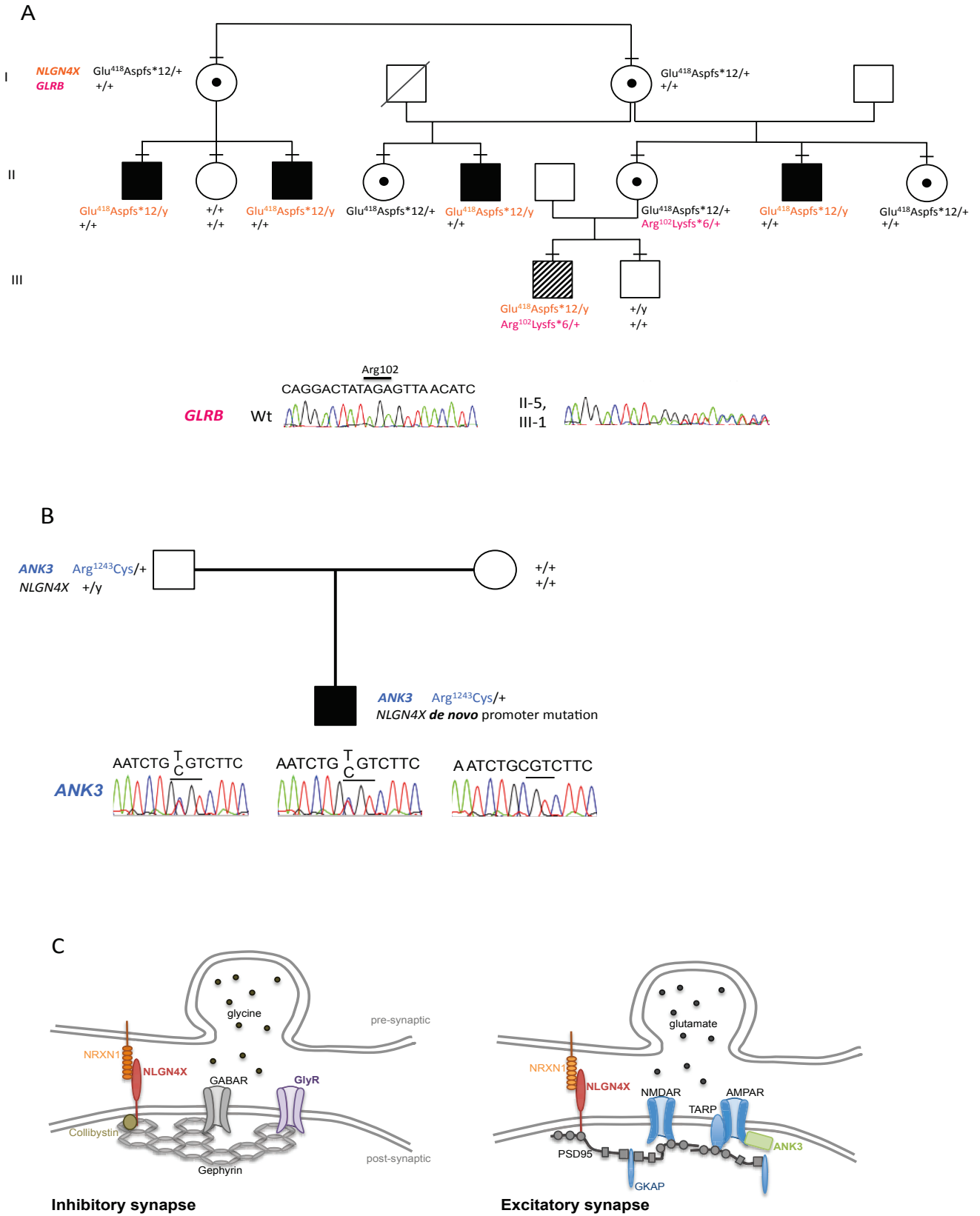
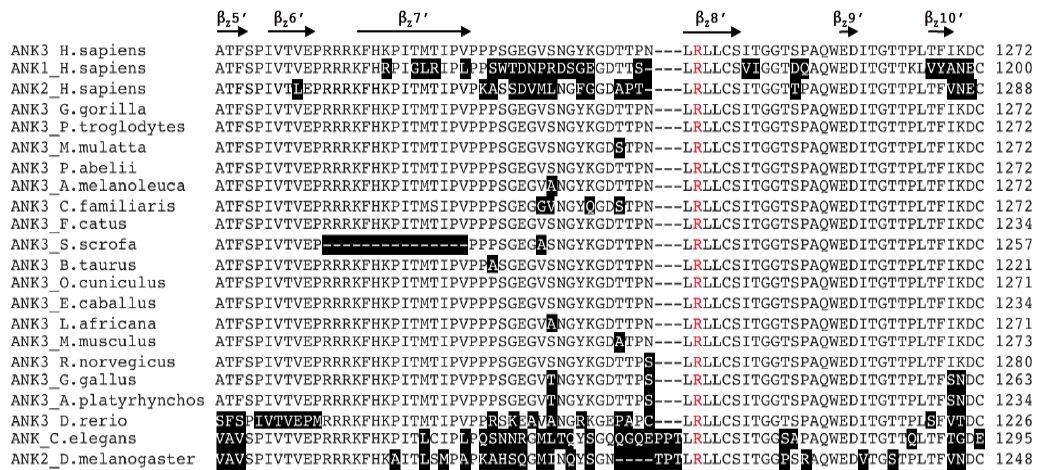


Figure 3: Conservation analysis of the ANK3 p.Arg1243Cys mutation



Supplementary Information

Human neurodevelopmental expression profiling of NLGN4X, ANK3 and GLRB mRNAs as well as postsynaptic excitatory (DLG4) and inhibitory (GPHN) markers

Developmental stages: Prenatal 35 pcw (Post-conception weeks, 37 pcw; Postnatal 4 months, 10 months, 1 year, 2 years, 3 years, 4 years

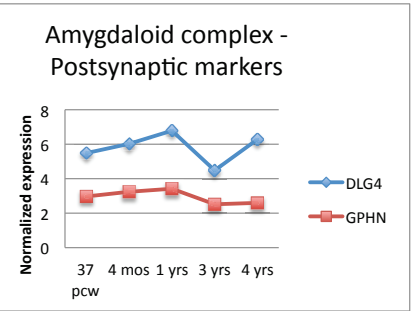
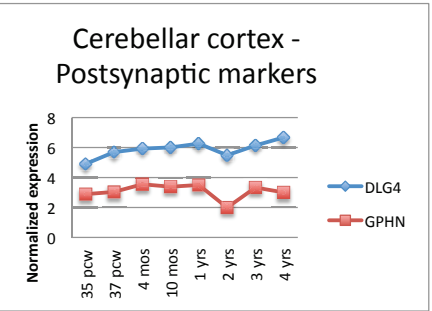
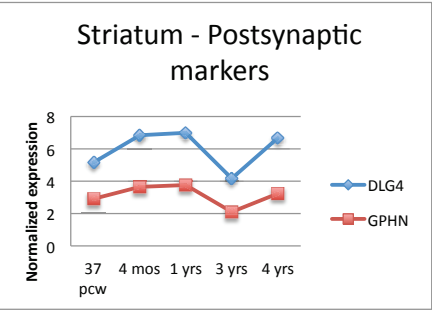
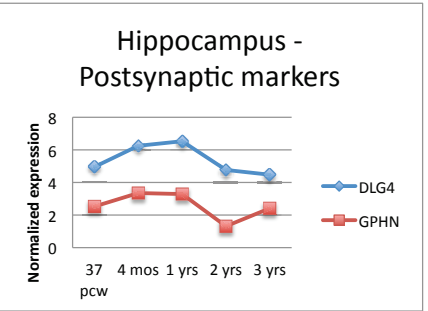
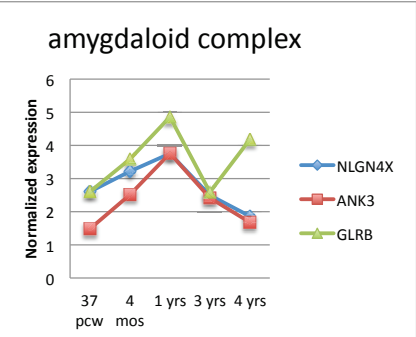
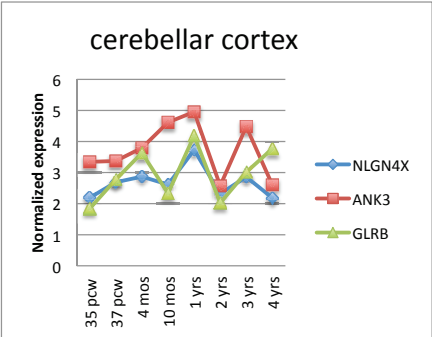
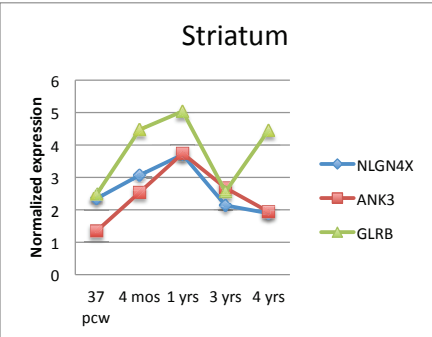
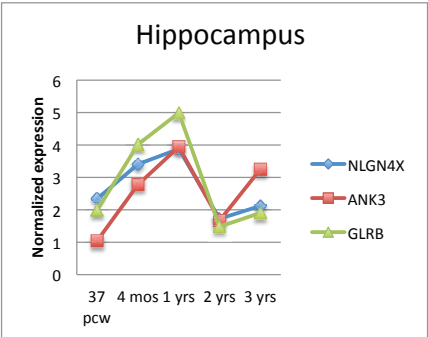
©2014 Allen Institute for Brain Science. BrainSpan Atlas of the Developing Human Brain [Internet]. Available from: <http://brainspan.org/>

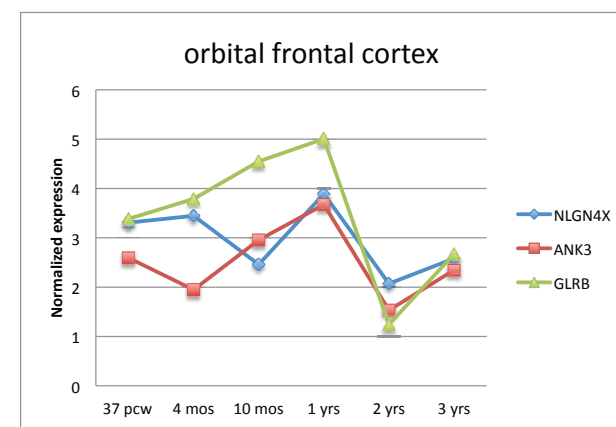
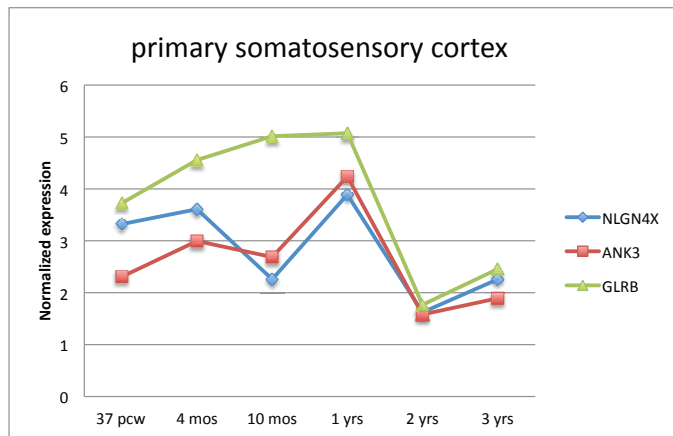
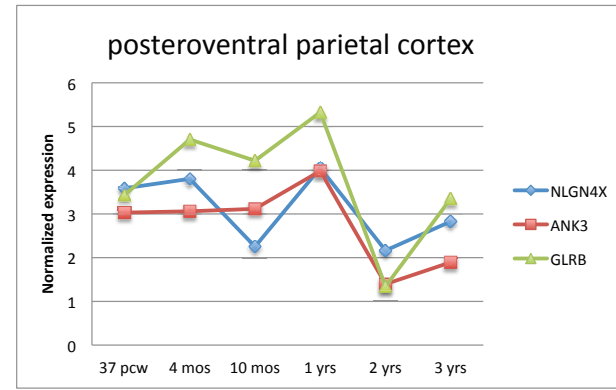
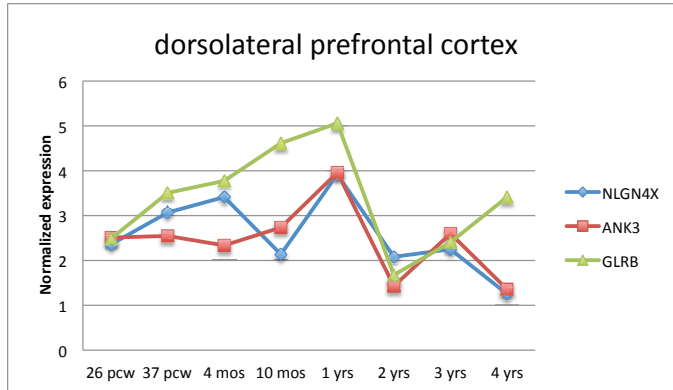
structure_name	donor_age	Normalized expression values				
		NLGN4X	ANK3	GLRB	DLG4	GPHN
primary auditory cortex (core)	25 pcw	2,8299	2,2624	2,8654	5,2342	2,845
primary auditory cortex (core)	37 pcw	3,8351	3,0227	3,5423	6,5086	3,2458
primary auditory cortex (core)	4 mos	3,367	2,2055	3,8965	5,9471	3,275
primary auditory cortex (core)	1 yrs	3,7589	4,0611	5,1062	7,0799	3,4024
primary auditory cortex (core)	3 yrs	2,60365	2,0383	3,00855	5,5762	2,67075
		NLGN4X	ANK3	GLRB	DLG4	GPHN
amygdaloid complex	37 pcw	2,6063	1,4858	2,6048	5,4828	2,9702
amygdaloid complex	4 mos	3,2184	2,51386667	3,5859	6,0241	3,23826667
amygdaloid complex	1 yrs	3,7541	3,7612	4,8575	6,7863	3,4187
amygdaloid complex	3 yrs	2,49595	2,41595	2,5913	4,4779	2,51515
amygdaloid complex	4 yrs	1,8646	1,6806	4,1763	6,2778	2,596
		NLGN4X	ANK3	GLRB	DLG4	GPHN
cerebellar cortex	35 pcw	2,1925	3,3439	1,8452	4,9103	2,8908
cerebellar cortex	37 pcw	2,6906	3,3732	2,7766	5,6941	3,0386
cerebellar cortex	4 mos	2,87	3,79485	3,6338	5,9274	3,5515
cerebellar cortex	10 mos	2,6154	4,6167	2,3326	6,0094	3,3839
cerebellar cortex	1 yrs	3,728	4,9561	4,186	6,2622	3,4973
cerebellar cortex	2 yrs	2,3197	2,5742	2,0236	5,4865	1,9886
cerebellar cortex	3 yrs	2,85895	4,47845	3,0136	6,13485	3,32945
cerebellar cortex	4 yrs	2,1859	2,6049	3,7695	6,6751	3,0036
		NLGN4X	ANK3	GLRB	DLG4	GPHN
dorsolateral prefrontal cortex	26 pcw	2,3614	2,5111	2,4886	4,6499	2,4771
dorsolateral prefrontal cortex	37 pcw	3,0688	2,5468	3,5064	6,7155	3,1727
dorsolateral prefrontal cortex	4 mos	3,4139	2,3353	3,7751	6,4561	3,39785
dorsolateral prefrontal cortex	10 mos	2,1392	2,7348	4,6159	7,4493	3,357
dorsolateral prefrontal cortex	1 yrs	3,9204	3,9586	5,0607	7,305	3,6954
dorsolateral prefrontal cortex	2 yrs	2,0826	1,4303	1,6763	5,46	1,8514
dorsolateral prefrontal cortex	3 yrs	2,2506	2,5989	2,4057	5,4183	2,4047
dorsolateral prefrontal cortex	4 yrs	1,256	1,3589	3,4125	6,295	2,026
		NLGN4X	ANK3	GLRB	DLG4	GPHN
hippocampus (hippocampal formation)	37 pcw	2,3407	1,0447	1,9896	4,9556	2,5233
hippocampus (hippocampal formation)	4 mos	3,4087	2,77805	4,0176	6,2527	3,3486
hippocampus (hippocampal formation)	1 yrs	3,8751	3,9463	4,9916	6,5306	3,285
hippocampus (hippocampal formation)	2 yrs	1,7242	1,6679	1,4821	4,7688	1,3136
hippocampus (hippocampal formation)	3 yrs	2,1193	3,2503	1,9032	4,4749	2,4147

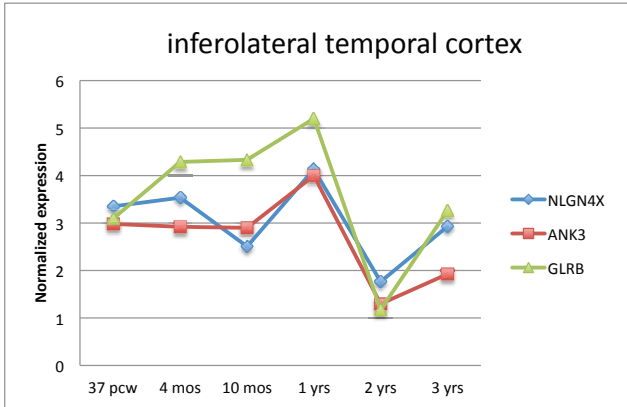
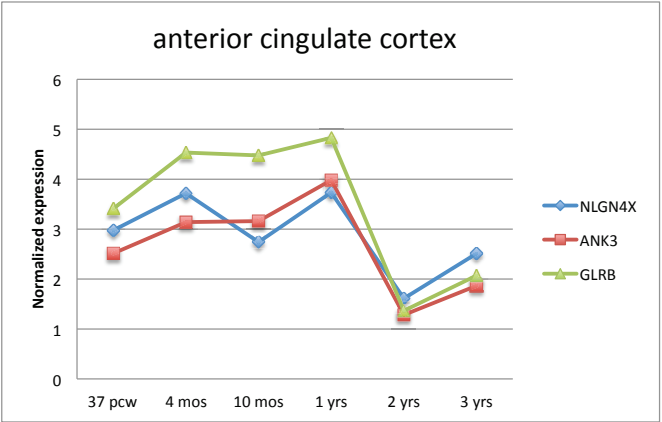
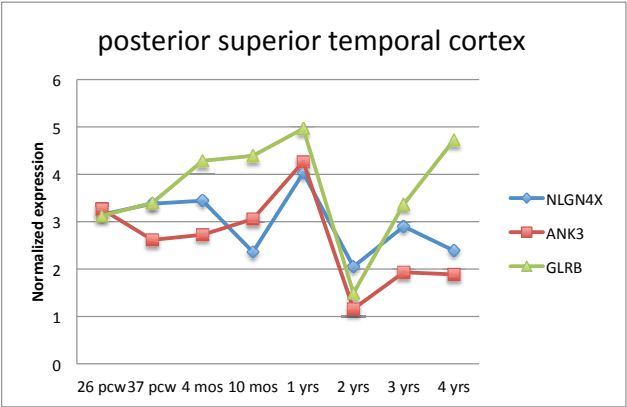
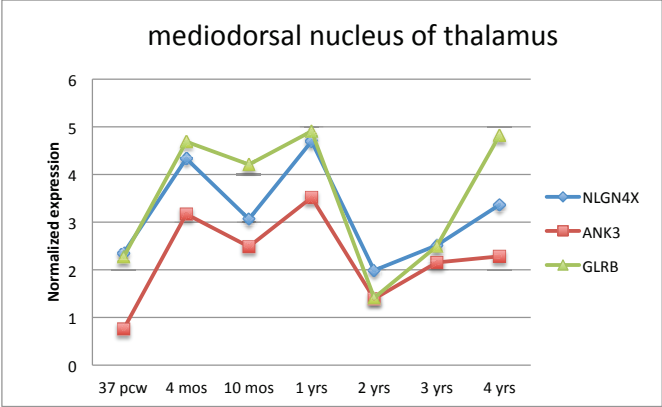
Chapitre II : Autisme, DI : modèles génétiques distincts

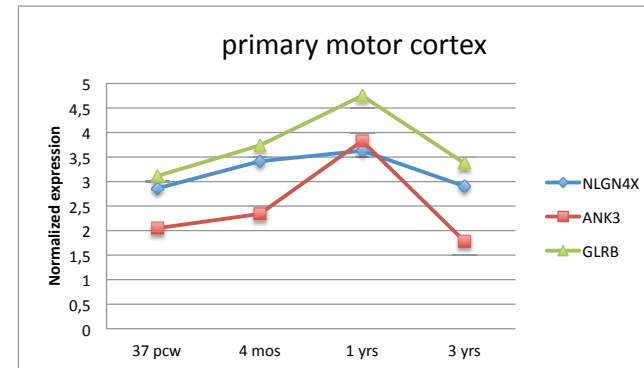
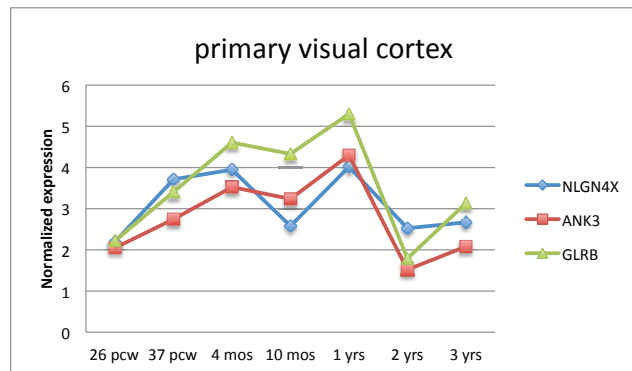
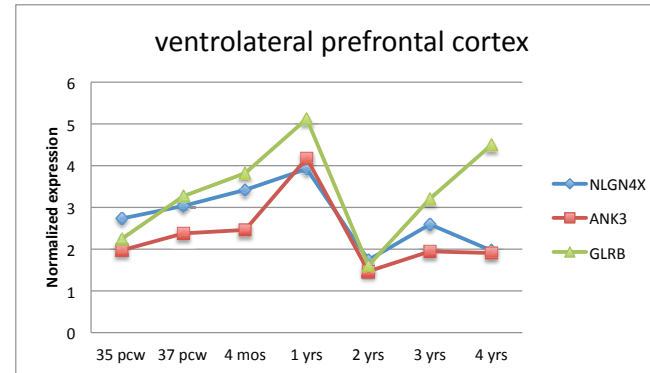
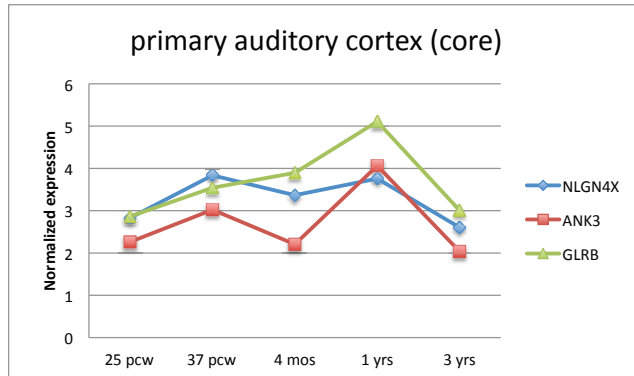
	<i>NLGN4X</i>	<i>ANK3</i>	<i>GLRB</i>	<i>DLG4</i>	<i>GPHN</i>	
posteroventral (inferior) parietal cortex	37 pcw	3,5871	3,0305	3,433	6,63	3,1244
posteroventral (inferior) parietal cortex	4 mos	3,8025	3,0597	4,7037	7,1234	3,5271
posteroventral (inferior) parietal cortex	10 mos	2,2527	3,1172	4,218	7,3159	3,024
posteroventral (inferior) parietal cortex	1 yrs	4,0517	3,9834	5,3256	7,1007	3,839
posteroventral (inferior) parietal cortex	2 yrs	2,1634	1,395	1,3428	4,6468	1,4033
posteroventral (inferior) parietal cortex	3 yrs	2,82755	1,89425	3,3502	5,12195	2,85385
	<i>NLGN4X</i>	<i>ANK3</i>	<i>GLRB</i>	<i>DLG4</i>	<i>GPHN</i>	
inferolateral temporal cortex (area TEv, area 20)	37 pcw	3,3525	2,9802	3,0952	6,7713	3,0853
inferolateral temporal cortex (area TEv, area 20)	4 mos	3,53313333	2,9207	4,28656667	6,54863333	3,56306667
inferolateral temporal cortex (area TEv, area 20)	10 mos	2,5055	2,8986	4,3309	7,5265	3,1454
inferolateral temporal cortex (area TEv, area 20)	1 yrs	4,1289	3,996	5,2001	6,9469	3,7364
inferolateral temporal cortex (area TEv, area 20)	2 yrs	1,7646	1,2976	1,1768	4,951	1,2812
inferolateral temporal cortex (area TEv, area 20)	3 yrs	2,9283	1,9256	3,2599	5,69955	2,8218
	<i>NLGN4X</i>	<i>ANK3</i>	<i>GLRB</i>	<i>DLG4</i>	<i>GPHN</i>	
primary motor cortex (area M1, area 4)	37 pcw	2,8627	2,0506	3,1156	5,914	3,0511
primary motor cortex (area M1, area 4)	4 mos	3,4136	2,34205	3,73755	6,1789	3,2425
primary motor cortex (area M1, area 4)	1 yrs	3,6287	3,8282	4,7483	7,0561	3,22
primary motor cortex (area M1, area 4)	3 yrs	2,905	1,7833	3,37415	5,51785	2,7225
	<i>NLGN4X</i>	<i>ANK3</i>	<i>GLRB</i>	<i>DLG4</i>	<i>GPHN</i>	
mediodorsal nucleus of thalamus	37 pcw	2,3505	0,7604	2,2718	4,1399	2,7907
mediodorsal nucleus of thalamus	4 mos	4,33345	3,16845	4,6874	6,5705	3,0122
mediodorsal nucleus of thalamus	10 mos	3,0646	2,4864	4,2085	6,9213	2,6425
mediodorsal nucleus of thalamus	1 yrs	4,6965	3,5163	4,9084	6,2495	3,1521
mediodorsal nucleus of thalamus	2 yrs	1,9883	1,3928	1,4128	3,174	1,4689
mediodorsal nucleus of thalamus	3 yrs	2,5146	2,1542	2,496	5,3173	2,4672
mediodorsal nucleus of thalamus	4 yrs	3,3636	2,2833	4,8189	6,0732	3,0668
	<i>NLGN4X</i>	<i>ANK3</i>	<i>GLRB</i>	<i>DLG4</i>	<i>GPHN</i>	
anterior (rostral) cingulate (medial prefrontal) cortex	37 pcw	2,9783	2,5141	3,412	6,3494	3,0391
anterior (rostral) cingulate (medial prefrontal) cortex	4 mos	3,71835	3,1413	4,53285	7,0544	3,7503
anterior (rostral) cingulate (medial prefrontal) cortex	10 mos	2,7412	3,1607	4,4763	7,3591	3,4878
anterior (rostral) cingulate (medial prefrontal) cortex	1 yrs	3,7351	3,9807	4,8296	6,9294	3,3298
anterior (rostral) cingulate (medial prefrontal) cortex	2 yrs	1,6118	1,2823	1,3658	4,7609	1,1156
anterior (rostral) cingulate (medial prefrontal) cortex	3 yrs	2,5099	1,8664	2,0705	4,9189	2,7936
	<i>NLGN4X</i>	<i>ANK3</i>	<i>GLRB</i>	<i>DLG4</i>	<i>GPHN</i>	
orbital frontal cortex	37 pcw	3,3078	2,5944	3,3847	6,511	3,262
orbital frontal cortex	4 mos	3,44695	1,9478	3,7897	6,2127	3,3624
orbital frontal cortex	10 mos	2,4589	2,9543	4,5486	7,239	3,3089
orbital frontal cortex	1 yrs	3,8897	3,6735	5,0076	7,1216	3,6563
orbital frontal cortex	2 yrs	2,0713	1,5325	1,2437	4,712	1,239
orbital frontal cortex	3 yrs	2,5809	2,3466	2,6725	5,5886	2,7176

	<i>NLGN4X</i>	<i>ANK3</i>	<i>GLRB</i>	<i>DLG4</i>	<i>GPHN</i>	
primary somatosensory cortex (area S1, areas 3,1,2)	37 pcw	3,3221	2,3084	3,7271	6,1583	3,252
primary somatosensory cortex (area S1, areas 3,1,2)	4 mos	3,6088	2,9957	4,5567	7,1209	3,5184
primary somatosensory cortex (area S1, areas 3,1,2)	10 mos	2,2587	2,6875	5,0157	7,2687	3,1168
primary somatosensory cortex (area S1, areas 3,1,2)	1 yrs	3,8885	4,2372	5,0713	7,1792	3,5658
primary somatosensory cortex (area S1, areas 3,1,2)	2 yrs	1,6216	1,5804	1,7676	4,8912	1,5838
primary somatosensory cortex (area S1, areas 3,1,2)	3 yrs	2,2583	1,8924	2,4563	4,956	2,6817
		<i>NLGN4X</i>	<i>ANK3</i>	<i>GLRB</i>	<i>DLG4</i>	<i>GPHN</i>
posterior (caudal) superior temporal cortex (area 22c)	26 pcw	3,1502	3,2636	3,124	5,539	3,2208
posterior (caudal) superior temporal cortex (area 22c)	37 pcw	3,3792	2,615	3,3974	6,7698	3,2314
posterior (caudal) superior temporal cortex (area 22c)	4 mos	3,44343333	2,7244	4,2846	6,52406667	3,51783333
posterior (caudal) superior temporal cortex (area 22c)	10 mos	2,3592	3,0562	4,3913	7,4059	3,274
posterior (caudal) superior temporal cortex (area 22c)	1 yrs	4,0294	4,2641	4,9632	7,0552	3,5883
posterior (caudal) superior temporal cortex (area 22c)	2 yrs	2,0495	1,1588	1,4909	4,6935	1,4756
posterior (caudal) superior temporal cortex (area 22c)	3 yrs	2,899	1,93155	3,3671	5,67725	2,8135
posterior (caudal) superior temporal cortex (area 22c)	4 yrs	2,3865	1,8877	4,7277	6,3635	2,7676
		<i>NLGN4X</i>	<i>ANK3</i>	<i>GLRB</i>	<i>DLG4</i>	<i>GPHN</i>
striatum	37 pcw	2,3493	1,3491	2,4834	5,1653	2,9149
striatum	4 mos	3,07025	2,5391	4,4732	6,84465	3,6499
striatum	1 yrs	3,705	3,7425	5,039	6,9937	3,7632
striatum	3 yrs	2,1364	2,6754	2,5607	4,1686	2,1015
striatum	4 yrs	1,8931	1,9426	4,4527	6,6672	3,2356
		<i>NLGN4X</i>	<i>ANK3</i>	<i>GLRB</i>	<i>DLG4</i>	<i>GPHN</i>
primary visual cortex (striate cortex, area V1/17)	26 pcw	2,201	2,0494	2,223	4,0482	2,3859
primary visual cortex (striate cortex, area V1/17)	37 pcw	3,7122	2,7457	3,4071	6,5007	3,3646
primary visual cortex (striate cortex, area V1/17)	4 mos	3,94795	3,52535	4,6045	7,26075	3,6919
primary visual cortex (striate cortex, area V1/17)	10 mos	2,5787	3,2385	4,3315	7,8986	3,2872
primary visual cortex (striate cortex, area V1/17)	1 yrs	4,0176	4,2974	5,3007	6,877	3,5846
primary visual cortex (striate cortex, area V1/17)	2 yrs	2,5244	1,5174	1,7913	4,8078	1,3896
primary visual cortex (striate cortex, area V1/17)	3 yrs	2,66765	2,07905	3,12905	5,1204	2,66435
		<i>NLGN4X</i>	<i>ANK3</i>	<i>GLRB</i>	<i>DLG4</i>	<i>GPHN</i>
ventrolateral prefrontal cortex	35 pcw	2,7332	1,9737	2,2497	5,942	2,9133
ventrolateral prefrontal cortex	37 pcw	3,0374	2,3771	3,2696	6,4416	2,9351
ventrolateral prefrontal cortex	4 mos	3,42005	2,46185	3,81855	6,5366	3,3563
ventrolateral prefrontal cortex	1 yrs	3,922	4,176	5,1227	7,0037	3,4982
ventrolateral prefrontal cortex	2 yrs	1,7395	1,4687	1,6051	5,3217	1,6495
ventrolateral prefrontal cortex	3 yrs	2,5925	1,9471	3,2062	5,3309	2,68765
ventrolateral prefrontal cortex	4 yrs	1,9662	1,9074	4,4967	5,9866	2,6411









Discussion

Lors de ce travail de thèse nous avons réalisé une étude génétique globale du complexe NRC/MASC sur une cohorte de 96 patients atteints d'autisme. L'objectif était d'évaluer la contribution de variations génomiques et nucléotidiques impliquant des gènes codant le protéome post-synaptique lié au récepteur NMDA. Nous avons réalisé une étude pangénomique en CGH array à haute résolution pour la détection de CNV, couplée à la recherche de SNV dans les gènes du complexe NRC/MASC à l'aide de la stratégie de capture ciblée d'exons et de séquençage à haut-débit. Ce travail nous a ainsi permis de caractériser un nombre important de variants candidats *de novo* ou rares avec une probabilité significative de présenter un caractère délétère ou pathogène.

Bien que l'autisme soit un des troubles neurodéveloppementaux les plus héréditaires, son origine génétique est loin d'être élucidée. Depuis quelques années, on observe une évolution extrêmement rapide et une résolution toujours croissante des nouvelles techniques d'étude de génomes (séquençage à haut-débit d'exome et de génome entier, CGH array). Ces améliorations ont permis l'accumulation d'une grande quantité de données génétiques dont l'analyse n'en est encore qu'à ses débuts. Il est donc essentiel d'essayer de comprendre le degré d'implication et de causalité des variants identifiés dans cette pathologie génétique complexe.

Le premier niveau d'analyse du variant est le caractère hérité/*de novo*. Lorsque le variant est *de novo*, le ou les gènes candidats vont alors être considérés plus fréquemment comme candidats dans la pathologie (Figure 35, Partie de gauche), en particulier si les parents ne présentent aucun signe évocateur ou endophénotype lié à l'autisme.

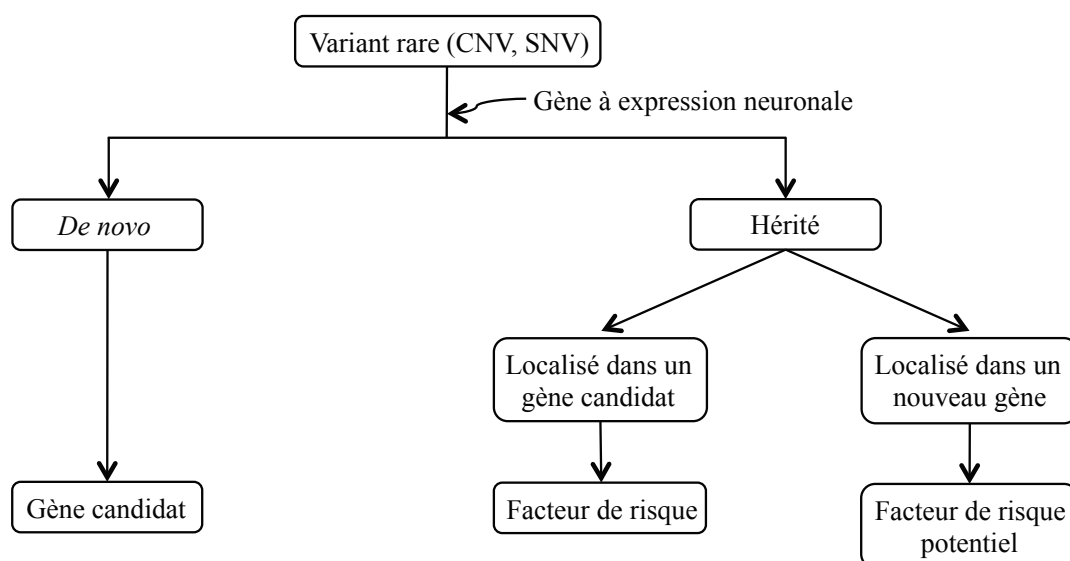


Figure 35 : Schéma d'analyse de l'implication des variants rares

Discussion

En revanche quand le variant est hérité d'un parent sain, la question de son niveau de pathogénicité se pose immédiatement. Lorsque le variant est inclu dans un gène déjà connu comme étant impliqué dans l'autisme ou dans un autre trouble neurodéveloppemental, celui-ci sera considéré comme un facteur de risque probable (Figure 35, Partie de droite). Cependant lorsque le variant est localisé dans un gène sans implication précise dans une pathologie du SNC, son interprétation est beaucoup plus compliquée à établir.

L'étude de l'expression de gène candidat dans le SNC durant son développement ainsi que l'évaluation de l'effet délétère de la mutation (CNV, SNV) constituent ensuite des étapes majeures pour définir son statut de facteur de risque voire de facteur causal.

Il est à noter que dans le cadre du modèle de transmission liée à l'X, qui inclut des garçons atteints et porteurs d'une mutation dans un gène localisé sur ce chromosome, cette variation est majoritairement transmise par leur mère porteuse hétérozygote et généralement asymptomatique.

Autisme et caractérisation de CNV candidats

Une des premières mises en évidences de CNV par CGH array dans l'autisme a été publiée en 2006 par Jacquemont et collaborateurs (Jacquemont *et al.*, 2006). Elle a été suivie de nombreuses études ultérieures qui ont pu localiser des remaniements génomiques sur la quasi totalité des chromosomes. Pour savoir si un CNV est pathogène, quatre points principaux sont à envisager :

- Où se situe le CNV dans le génome ?
- Quel type de CNV ?
- Est-il retrouvé dans la population générale ?
- *De novo* ou hérité ?

La localisation du CNV dans le génome est importante pour interpréter son caractère pathogène. En effet une délétion ou duplication d'une région contenant un ou des gènes présentera un intérêt plus important que dans le cas d'une zone sans gène (Figure 36A et B). La fonction du/des gène(s) présents dans le CNV constitue un autre critère de choix pour la sélection du CNV, et dans le cas de l'autisme, des maladies neuropsychiatriques et neurodéveloppementales, les gènes présentant une expression neuronale significative sont évidemment retenus.

Cependant les gènes ne représentent qu'une petite partie du génome et les séquences non codantes peuvent avoir un effet sur la transcription ou l'expression d'un gène (Figure 36C-E).

En effet la perte ou l'éloignement de séquences régulatrices de l'expression génique, de type enhancer ou du site de liaison aux facteurs de transcription, vont conduire à une modification de l'expression de celui-ci (Figure 36C-E; Feuk *et al.*, 2006; Hehir-Kwa *et al.*, 2013). Par exemple Bonnet et collaborateurs ont observé une duplication de 970 kb en amont du gène *GRIA3* chez un garçon avec DI et épilepsie (Bonnet *et al.*, 2012). D'autres nombreux exemples sont résumés dans la revue de Spielmann et Klopocki (Spielmann et Klopocki, 2013).

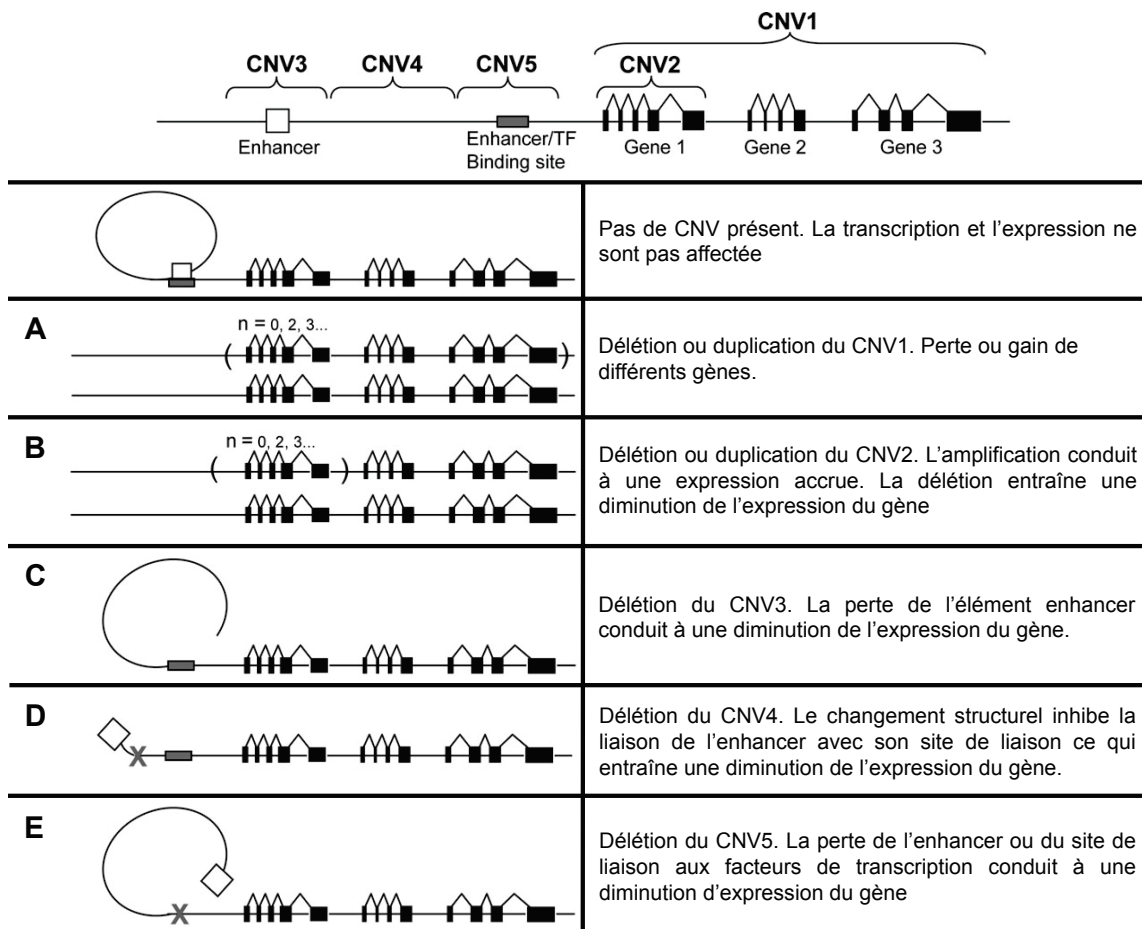


Figure 36 : Influence des CNV dans le dosage et l'expression des gènes

Il y a un certain nombre de mécanismes par lesquels un CNV pourrait potentiellement avoir un effet sur l'expression et la transcription de gènes. Il est possible d'observer un CNV impliquant plusieurs gènes (A) ou un seul gène (B). Les gains ou les pertes affectant les éléments régulateurs ou régions promotrices peuvent aussi contribuer à une expression différente des gènes. Cela peut impliquer soit la perte d'un élément de régulation de la transcription (C et E) ou la perte ou le gain d'une séquence qui va entraîner une modification de la structure de la chromatine empêchant l'accès aux facteurs de transcription (E). (D'après Feuk *et al.*, 2006)

Dans notre étude nous avons fait le choix de ne pas analyser les CNV intergéniques, étant donné la difficulté de prédire leurs effets sur la fonction d'un gène concerné par le remaniement génomique (définition des CNV de type "VOUS" Variant Of Unknown

Discussion

Significancy). Cependant pour les patients chez lesquels aucun CNV candidat n'a été retenu, il serait intéressant de ré-analyser en particulier certains CNV localisés dans des régions régulatrices d'expression génique. La base de données du projet ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements), qui a pour but d'identifier tous les éléments fonctionnels du génome humain, a récemment établi une liste très exhaustive de ces sites (Kavanagh *et al.*, 2013).

Il est conceptuellement plus simple d'évoquer qu'une délétion d'un ou plusieurs gènes est susceptible d'avoir un effet pathogène que la duplication d'un gène (Cooper *et al.*, 2011; Hehir-Kwa *et al.*, 2013).

Les conséquences fonctionnelles d'une délétion affectant un gène sont potentiellement plus importantes que celle d'un variant nucléotidique ponctuel. Par exemple, elle va pouvoir entraîner une perte de fonction partielle ou totale du gène concerné, ou une modification de son expression *via* un effet sur les régions régulatrices du gène (Figure 36; Feuk *et al.*, 2006; Hehir-Kwa *et al.*, 2013) ou même créer une protéine de fusion.

L'impact d'une duplication sera beaucoup plus difficile à déterminer. En fonction du mécanisme qui en est à l'origine et l'endroit où elle s'est insérée, la duplication pourra avoir les mêmes effets qu'une délétion (décalage de la phase de lecture, apparition de séquence codante en intragénique), entraîner un gain de fonction (augmentation de l'expression du gène) ou une modification du profil d'expression (le gène dupliqué se trouve inséré sous le contrôle de nouvelles séquences régulatrices). Mais elle peut aussi n'avoir aucune conséquence si elle s'insère dans un endroit dans le génome exempt de séquences codantes ou régulatrices. Il est enfin délicat de prédire la position d'une duplication donnée car les puces utilisées pour détecter les CNV ne donnent aucune information quant à la localisation du matériel amplifié.

Dans notre étude nous avons recherché des CNV sans nous intéresser aux variations structurales équilibrées (Figure 12A). Ces variations qui ne sont pas détectées en CGH array peuvent néanmoins avoir des conséquences fonctionnelles comme ça peut être le cas chez les patients avec autisme portant une translocations équilibrées (Liao *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2013). Il serait donc intéressant de déterminer chez les patients pour lesquels nous n'avons pas obtenu de résultats la présence éventuelle d'une variation structurale équilibrée associée au phénotype. À ce jour, la technique classique pour détecter les translocations est le caryotype associé à la FISH. Cependant les techniques de séquençage à haut-débit, en particulier de "whole genome", permettent également de détecter ce type de remaniements (Shaffler *et al.*, 2012).

Est-ce que le CNV est retrouvé dans la population générale ?

Dans notre étude nous avons décidé de ne considérer que des CNV rares, c'est-à-dire absents ou présents à moins de 1% dans la population générale. Pour répondre à cette question nous avons utilisé la base de données DGV (Database of Genomic Variant) qui regroupe tous les CNV retrouvés chez des populations contrôles.

De novo ou hérité ?

Pour tous les CNV candidats identifiés en CGH array, une PCR quantitative (qPCR) a été systématiquement effectuée afin de vérifier leur présence réelle. En effet, Pinto et collaborateurs ont mis en lumière des problèmes de reproductibilité des résultats au sein de 11 plateformes de détection de CNV (Pinto *et al.*, 2011). Les faux-positifs ne sont pas rares et il est donc indispensable de tester tous les patients sur la même plateforme, d'utiliser la même méthodologie d'analyse, et de vérifier la présence du CNV détecté par une autre technique (qPCR, FISH, MLPA...). Nous avons initialement sélectionné 141 CNV que nous avons testés en qPCR chez nos patients et chez les membres de leur famille. Sur les 141 CNV testés nous avons 76 délétions et 65 duplications. Nous avons retrouvé 70 CNV (49,6%) dans lesquels nous avons 35 délétions et 35 duplications. Ce fort taux de faux-positif peut s'expliquer par la qualité de certaines puces. En effet pour quelques puces on observait que des critères d'évaluations majeurs (par exemple le DerivatedLR Spread) n'étaient pas "excellent" ou "good". Pour ces puces nous avons quand même testé des CNV qui passaient nos critères de sélections, la plus part du temps ces CNV n'étaient alors pas retrouvés en qPCR.

En même temps que la présence du CNV était vérifiée, nous avons aussi analysé le mode de transmission. Sur les 70 CNV retrouvés en qPCR, 13 sont *de novo* (18,6%), 38 sont hérités (54,3%) et 19 dont on ne connaît pas l'origine (27,1%), c'est-à-dire que l'ADN d'au moins un parent n'était pas disponible.

En général, les CNV *de novo* sont analysés préférentiellement. Environ 2 à 7% des patients autistes portent un CNV *de novo* (Hehir-Kwa *et al.*, 2013).

Concernant les CNV hérités, une étude effectuée sur la population islandaise par Stefansson et collaborateurs a montré que des CNV dont on sait qu'ils sont impliqués dans l'autisme et la schizophrénie sont retrouvés chez des personnes dites saines et présentant un phénotype intermédiaire (Stefansson *et al.*, 2014). Les auteurs proposent que la différence

Discussion

entre le patient et le contrôleur porteur du CNV soit due à une expressivité variable du CNV et non à un manque de pénétrance.

D'autres hypothèses peuvent être posées, par exemple si les gènes qui sont impliqués dans le CNV sont soumis à l'empreinte parentale (Figure 37A) comme dans le cas du syndrome d'Angelman et de Prader-Willi, selon que la variation se trouve sur l'allèle maternel ou paternel (Pour plus d'information voir la partie I.4.2.4 de l'introduction). La base de données Geneimprint (www.geneimprint.com) permet de connaître les gènes qui sont ou peuvent être sous empreinte parentale.

Le CNV peut parfois sembler être hérité d'un parent apparemment en bonne santé, alors qu'avec des tests complémentaires on révèle que le parent est en fait mosaïque pour le CNV identifié chez l'enfant (Figure 37B). Selon pourcentage de mosaïcisme, le phénotype va varier de normal à (légèrement) atteint. Par exemple Kousoulidou et collaborateurs ont observé une délétion dans le gène *TCF4* chez un patient avec un syndrome de Pitt Hopkins qui est hérité de son père qui a une mosaïque pour le CNV (Kousoulidou *et al.*, 2013).

Cela peut aussi être dû à l'association de deux CNV dans la même région, dans le cadre d'un mode de transmission autosomique récessif (Figure 37C). En effet les deux parents possèderaient le CNV à l'état hétérozygote qui serait retrouvé de façon homozygote chez le patient. Il y a aussi la possibilité qu'un des parents possède le même CNV que le patient et que l'autre parent soit porteur d'un SNV dans le même gène candidat, et l'enfant aurait ainsi une seule copie d'un gène mais qui serait moins fonctionnelle à cause de la mutation (Figure 37D; Hochstenbach *et al.*, 2012). Paciorkowski et collaborateurs ont par exemple observé chez différents patients une délétion en 16p13.11, incluant notamment le gène *NDE1*, associée avec une mutation dans l'allèle non délété du gène *NDE1* (Paciorkowski *et al.*, 2013)

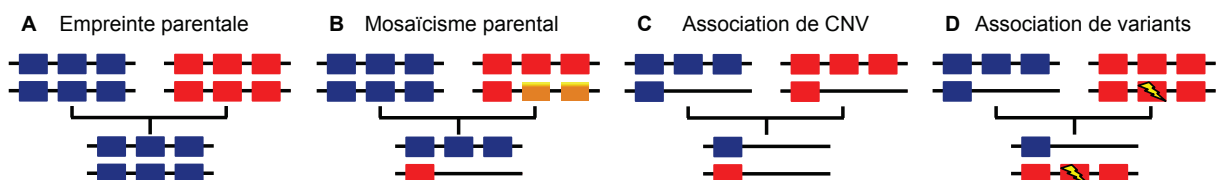


Figure 37 : Représentation schématique de différents modèles qui peuvent expliquer l'impact des CNV.

Pour expliquer la transmission d'un CNV d'un parent à l'enfant sans que les parents ne soient atteints. (A) les gènes compris dans le CNV peuvent être soumis à empreinte parentale. (B) Le CNV peut être à l'état mosaïque chez le parent porteur (C et D) ou le phénotype peut-être dû à une association de CNV au même locus (C) ou l'association d'un CNV avec un SNV au même locus (D) (D'après Hehir-Kwa *et al.*, 2013)

La dernière hypothèse est celle du multi-hit dans lequel l'association de plusieurs variants induirait le phénotype (Girirajan *et al.*, 2010). Dans notre cohorte nous avons trouvé plusieurs situations présentant un modèle probable de multi-hit. Par exemple c'est le cas pour la famille TAF32 (Figure 34A) où on a détecté un CNV dans le gène *GPHN* hérité de la mère et un CNV dans le gène *ANKRD24* hérité du père. Prises individuellement, les deux variations n'ont pas d'effet délétère chez chacun des deux parents alors que leur présence commune chez le patient est associée à l'autisme.

On peut aussi observer ce modèle avec les variations nucléotidiques. C'est le cas du patient BAF09 (Figure 34B) qui porte un premier variant dans le gène *MAGI1* hérité de sa mère et un second variant dans le gène *DLGAP2* hérité de son père et partagé avec son frère sain. Les deux variants exprimés seuls n'auraient pas d'impact au niveau neuronal, mais associés ensemble ils induiraient l'autisme.

Caractérisation de SNV candidats dans l'autisme

Dans le contexte du séquençage à haut-débit et de l'acquisition d'une très grande quantité de données, l'enjeu majeur est maintenant de déterminer quels sont parmi tous les variants obtenus ceux qui sont susceptibles d'être impliqués dans l'apparition de l'autisme. Pour y répondre on se pose quatre questions :

Où se situe le SNV dans le génome ? Quel type de SNV ? Est-ce que la variation est retrouvée dans la population générale ? *De novo* ou hérité ?

Les types de SNV présentant un intérêt majeur sont les insertions/délétions (indels) et les mutations non-sens, qui sont les candidats associés à une conséquence délétère potentiellement supérieure. Les indels, qui vont généralement induire un décalage de phase de lecture si les bases ajoutées/délétées ne sont pas un multiple de 3, et les mutations non-sens vont aboutir à la formation d'un codon stop prématuré dans la séquence de l'ARN messager et par conséquent entrainer soit la dégradation de ces ARNm aberrants par la voie du Nonsense-Mediated mRNA decay (NMD) ou bien permettre la production d'une protéine tronquée quand le codon stop prématuré est localisé dans le dernier exon codant. Ce mécanisme physiologique de surveillance des ARNm est essentiel pour la cellule (pour revue, Popp *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2014) et il implique notamment la participation de la protéine UPF3B dont la perte de fonction est associée aux TSA et à la DI en particulier (Laumonnier *et al.*, 2010).

Discussion

Dans un second temps nous nous intéressons aux mutations faux-sens pour lesquelles l'effet délétère nécessite l'utilisation d'outils bioinformatiques pour l'analyse *in silico*. Ces logiciels s'appuient sur la conservation des séquences, les propriétés physico-chimiques des acides aminés et les données concernant la structure protéique, si elles sont disponibles (Cooper et Shendure, 2011).

Dans cette étude nous avons eu recours à 4 sites de prédiction pour déterminer le caractère pathogène d'un SNV. Nous avons utilisé SIFT et Provean, qui tiennent compte des alignements de séquences et des propriétés des acides aminés, PolyPhen-2, qui intègre en plus les informations structurales et Mutation Taster, qui intègre toutes les données et qui donne en plus des informations sur des SNV synonymes et non codants, comme par exemple les sites d'épissage.

Sur les 72 variations sélectionnées, nous avons identifié trois indels (deux qui induisent un décalage de phase de lecture, et une délétion de 3 bases qui entraîne la perte d'un acide aminé), une mutation non-sens, et une mutation au niveau d'un site d'épissage. Sur les 67 variations non synonymes que nous avons gardé, 40 (59,7%) sont prédites délétères par les 4 sites, 24 (35,8%) par 3 sites, et 3 (4,5%) par 2 sites. Les programmes n'aboutissent pas forcément aux mêmes conclusions (Tableau 8), et il est donc intéressant de tester plusieurs sites afin d'avoir une meilleure idée du caractère pathogène ou non du SNV. Sur les 67 variants, Mutation Taster est le seul à les annoter toutes délétères, SIFT en indique 61, alors que Polyphen-2 n'en retient que 56 et Provean va jusqu'à 54. Peu de différence de prédiction est observée entre Mutation Taster et SIFT et entre Polyphen-2 et Provean (Tableau 8).

Tableau 8 : Concordance des sites de prédiction

	Provean	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster
Provean				
SIFT	51			
PolyPhen-2	43	50		
Mutation Taster	54	61	56	

Les chiffres correspondent aux nombres de fois où les sites de prédiction sont en accord.

Il reste un dernier type de mutation, celles qui sont silencieuses, c'est-à-dire qui n'induisent pas de changement au niveau protéique. Comme pour les mutations faux-sens, il existe des outils *in silico*, qui peuvent aussi être utilisés pour les variations dans les régions non codantes. Dans le principe ils vont estimer les taux observés des changements évolutifs et comparer ces estimations aux taux attendus pour les positions neutres. Les positions qui ont subi le moins de substitutions reçoivent les scores les plus hauts, qui sont un indicatif de

l'augmentation de la probabilité et/ou de l'intensité de la contrainte (Cooper et Shendure, 2011).

Dans notre étude nous avons décidé de nous concentrer sur les indels, les mutations non-sens et faux-sens. Même si les sites de prédictions sont un bon indicateur pour indiquer l'effet d'une mutation dans un gène, des tests fonctionnels consistant à évaluer par transfection de plasmides d'expression incluant la forme normale ou muté du gène candidat, et effectués sur cultures cellulaires neuronales permettraient d'observer l'impact de l'expression de la mutation candidate sur la morphologie cellulaire.

Pour les patients chez lesquels nous n'avons pas trouvé de mutation, il serait intéressant de regarder les mutations synonymes qui pourraient avoir un effet sur la structure de l'ADN et donc induire un changement d'expression du gène. Néanmoins, il faut admettre que la limite majeure de notre approche de capture ciblée d'exons des 216 gènes ne nous permet pas d'analyser le reste de l'exome, dans lequel d'autres variants délétères peuvent être retrouvés.

Est ce que la variation est retrouvée dans la population générale ?

Les mêmes considérations sont à prendre en compte, mais dans le cas des SNV nous avons utilisé d'autres bases de données (EVS, 1000 Genomes et dbSNP) qui regroupent les SNV retrouvés dans la population générale.

De novo ou hérité ?

La même démarche que celle décrite pour les CNV peut être utilisée pour les SNV. En ce qui concerne le modèle du multi-hit pour les SNV, il serait intéressant de regarder l'expression combinée des deux variations dans des modèles cellulaires, voire animaux.

Vers une convergence génétique des troubles neurodéveloppementaux?

Lors de cette étude nous avons identifié des CNV et des SNV dans des gènes impliqués dans l'autisme, comme le gène *DLGAP2*, des gènes impliqués dans l'autisme et dans d'autres pathologies neurodéveloppementales, comme le gène *GPHN* où l'on retrouve des variations chez des patients atteints d'autisme, d'épilepsie, de DI ou encore de schizophrénie (Prasad *et al.*, 2012; Lionel *et al.*, 2013; Dejanovic *et al.*, 2014). Nous avons aussi observé des variations dans des gènes qui ne sont pas connus comme étant impliqués dans l'autisme, mais dans d'autres pathologies, comme pour le gène *SLITRK2*, dont des variations sont retrouvées chez des patients avec schizophrénie (Pinto *et al.*, 2011). Des variations dans ce gène pourraient

Discussion

alors conduire soit à de la schizophrénie soit à de l'autisme. Enfin nous avons détecté des variations dans des gènes qui ne sont pas associés à des pathologies neurodéveloppementales ou neuropsychiatrique.

La base de données SFARI Gene (mise à jour Décembre 2014) indique qu'une partie des 667 gènes répertoriés sont impliquée dans d'autres pathologies (Tableau 9). Par exemple 183 gènes (27,4%) impliqués dans l'autisme sont retrouvés dans la DI. D'autres gènes sont associés à plusieurs troubles neurodéveloppementaux, comme le gène *NTRK3* qui en plus de l'autisme est aussi associé aux TDAH, aux troubles bipolaires, à l'épilepsie, à la DI, aux troubles dépressifs majeurs, aux troubles obsessionnels compulsifs et à la schizophrénie (Chakrabarti *et al.*, 2009; Muiños-Gimeno *et al.*, 2009; De Ligt *et al.*, 2012; Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013). Ce n'est pas le seul gène que l'on retrouve impliqué dans au moins sept pathologies, il y a aussi *ANK3*, *ASTN2*, *CACNA1C*, *CNTNAP2*, *GRIN2A*, *GRIN2B* et *IMMP2L*.

Tableau 9 : Pourcentage de gènes retrouvés impliqués dans l'autisme et une autre pathologie

	TDAH	TB	RD	EP	DI	TDM	TOC	SCZ	TS
TSA	9,45	3,75	15,89	19,79	27,44	1,50	1,95	12,14	1,20

Données obtenues à partir de la base de données SFARI Gene (Mise à jour Décembre 2014)

TSA: Trouble du spectre autistique; TDAH: Trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité; TB : Trouble bipolaire; RD : Retard de développement; EP : Épilepsie; DI : Déficience intellectuelle; TDM : Trouble Dépressif Majeur; TOC : Trouble Obsessionnel Compulsif; SCZ : Schizophrénie; TS : Syndrome de Tourette.

La littérature met en évidence une co-morbidité génétique importante pour l'autisme et les autres pathologies neurodéveloppementales. En 2009 Guilmatre et collaborateurs ont montré une récurrence de CNV identiques ou concernant de mêmes gènes (hérités ou *de novo*) au sein de l'autisme, la DI et la schizophrénie (Guilmatre *et al.*, 2009). Hoischen et collaborateurs ont récemment montré cette récurrence avec les mutations *de novo*, et plus particulièrement les mutations perturbatrices, au sein de l'autisme, de la DI, de l'épilepsie et la schizophrénie (Hoischen *et al.*, 2014). Krumm et collaborateurs ont publié une synthèse sur les mutations génétiques *de novo* dans l'autisme et la DI, et illustrent la convergence génétique entre ces 2 troubles neurodéveloppementaux (Krumm *et al.*, 2014). Ainsi, en effectuant une méta-analyse sur les différentes études d'exome dans les TSA et la DI, ils ont pu dégager au moins 14 gènes chez lesquels des mutations récurrentes *de novo* et délétères

étaient identifiées, et parmi lesquels ils proposent 5 gènes majeurs : *CHD8*, *SCN2A*, *GRIN2B*, *DYRK1A* et *SYNGAP1*. Cette co-morbidité génétique n'est cependant pas nouvelle entre l'autisme et la DI puisqu'environ la moitié des gènes impliqués dans les DI liées au chromosome X sont également retrouvés altérés chez des sujets avec TSA (Betancur, 2011; van Bokhoven, 2011), avec en particulier *NLGN3* et *NLGN4X*, initialement considérés comme les premiers gènes candidats spécifique de l'autisme (Jamain *et al.*, 2003).

Il est ainsi peu probable de suggérer qu'il existe des gènes spécifiquement impliqués dans l'autisme. Il existe néanmoins de nombreux facteurs ou gènes de susceptibilité à l'autisme non retrouvés dans d'autres troubles neurodéveloppementaux. De même, les gènes impliqués, par exemple, dans la DI ne sont pas nécessairement associés à l'autisme. Cela peut être dû au fait que les gènes candidats dans l'autisme ne seraient pas forcément systématiquement analysés dans les troubles neurodéveloppementaux, ou bien que seuls les variants génétiques d'impact délétère fort sont présents de manière plus large, sans distinction de pathologie.

En outre, il apparaît que les voies physiopathologiques communes et/ou convergentes sont impliquées dans les maladies neurodéveloppementales. La connaissance de l'interaction à l'échelle moléculaire entre les protéines candidates a permis le développement de réseaux d'interaction protéine-protéine particulièrement affectés par les mutations retrouvées dans les TSA et la DI en particulier (Krumm *et al.*, 2014). Les études d'exomes et de bio-informatique ont ainsi dégagé des voies interconnectées impliquant le protéome postsynaptique (*SYNGAP1*, *DLG4*, *NLGN*, etc..), la voie WNT (*CTNNB1*) et les fonctions de remodelage de la chromatine (*CHD8*). Des altérations fonctionnelles causées par les mutations génétiques affectent le développement normal du système nerveux central. Néanmoins, l'impact différentiel d'une mutation génétique causant un TSA et/ou une DI n'est actuellement pas encore bien expliqué.

Différentes hypothèses ont été récemment décrites (Iossifov *et al.*, 2014) :

- La présence de diagnostics cliniques différents. Par exemple, chez un sujet autiste et avec une DI, le pédopsychiatre indiquerait l'autisme comme conclusion diagnostique principale, alors que la DI avec des troubles autistiques associés serait principalement évoquée par le généticien clinicien. L'interaction entre pédopsychiatres et généticiens cliniciens est donc essentielle pour relier leur évaluation clinique.

Discussion

- Une expressivité variable de la mutation, qui va pouvoir induire plusieurs phénotypes. C'est ce qu'on observe avec le cas de la mutation dans le gène *UPF3B* (hg19 g.ChrX:118975169_118975172delTTTC) identifiée chez un autiste sans dysmorphie et avec un QI de 75, alors que Tarpey et collaborateurs avaient décrit cette mutation chez deux frères avec DI syndromique (Tarpey *et al.*, 2007).

- Des conséquences différentes pour différentes mutations dans un même gène. Par exemple, on observe ce phénomène dans le cas des mutations dans le gène *NLGN4X* : dans la famille multiplexe T118, la mutation (hg19, g.ChrX:5821465_5821466delCT) est associée à la DI ou à l'autisme, alors que dans la famille du cas sporadique, la mutation *de novo* (hg19, g.ChrX:6146223C->T) est associée à un autisme et une DI sévères.

- Le fond génétique de l'individu porteur de la mutation. En effet Huguet et collaborateurs ont observé une variabilité génétique du gène *PRRT2*, qui est candidat dans le CNV 16p11.2, dans les populations à travers le monde (Huguet *et al.*, 2014). De plus lors des études cas-témoins, il est crucial de recruter des sujets de la même ethnie pour éviter les biais de stratification.

- L'épigénétique va avoir également une influence, car des gènes peuvent être soumis à empreinte. En fonction de l'allèle muté, le même phénotype peut varier en fonction de l'origine parentale, comme dans le syndrome d'Angelman et de Prader-Willi (Peters *et al.*, 2004; Veltman *et al.*, 2005).

Les ARN non codants vont aussi pouvoir jouer un rôle dans les maladies neuronales. Par exemples les microRNA agissent comme des régulateurs post-transcriptionnels de l'expression de gènes et vont avoir un rôle lors de certains stades de développement et de maturation neuronale (Manakov *et al.*, 2009; Olde Loohuis *et al.*, 2012; Barry, 2014)

- L'implication d'autres facteurs génétiques. Le fait de se diriger vers un syndrome plutôt qu'un autre pourrait être dû à une seconde variation génétique dans le génome du patient. C'est ce qu'on observe dans le cas de la famille multiplexe avec une mutation dans le gène *NLGN4X* (hg19 g.ChrX:5821465-5821433delCT). Cette mutation seule conduit à de la DI et lorsqu'elle est associée à une seconde mutation, ici une mutation dans le gène *GLRB* (hg19, g.Chr4:158057628_158057628delG), on observe de l'autisme.

- L'interaction avec l'environnement. Par exemple l'exposition *in utero* avec certains tératogènes va augmenter le risque de développer des TSA (Dufour-Rainfray *et al.*, 2011). On sait aussi que l'activation du système immunitaire maternel lors de la grossesse va influencer le niveau des cytokines dans le placenta. Cette modification va pouvoir influencer le développement neuronal du fœtus (Depino, 2013).

Conclusion

Durant le développement du cerveau, la connectivité synaptique est un processus majeur permettant la communication interneuronale et la mise en place des réseaux essentiels pour les voies physiologiques liées à la cognition, la mémoire et l'apprentissage. Cette connectivité est le résultat d'un équilibre subtil entre la synaptogenèse et le modelage de la synapse. Ainsi, les sous-unités NR2A/NR2B du récepteur NMDA sont différenciellement exprimées au cours du développement, et chacune a sa propre fonction. La sous-unité NR2B permettrait une meilleure plasticité neuronale, et donc induirait la synaptogenèse alors que la sous-unité NR2A agirait comme une force stabilisatrice dans la synapse, rendant les changements structuraux et fonctionnels plus difficiles. Une dérégulation de cet équilibre peut aboutir à des conséquences délétères pour le développement neuronal et donc conduire à des troubles neurodéveloppementaux ou neuropsychiatriques, comme l'autisme (Gambrell et Barria, 2011).

Lors de ce travail de thèse nous avons décidé de nous focaliser sur les gènes codant les protéines du complexe lié au récepteur NMDA (NRC/MASC). Nous avons ainsi identifié des mutations dans des gènes de ce complexe qui pourraient avoir des effets physiopathologiques au niveau protéique et donc avoir une influence sur le développement neuronal. Cependant il n'y a pas que le complexe NRC/MASC qui semble impliqué, on a aussi trouvé des variations (CNV et SNV) dans d'autres gènes mais qui ont une expression neuronale. Le complexe NRC/MASC est une cible privilégiée dans l'autisme, mais le protéome post-synaptique, au sens large, semble également concerné.

Cette étude génétique a permis l'identification de 13 CNV rares *de novo* et 2 mutations rares *de novo*. Contrairement à la littérature nous n'avons pas beaucoup observé de variations *de novo*. Mais nous avons observé un grand nombre de variants rares (38 CNV et 59 SNV) hérités. Il est néanmoins important de souligner que notre étude génétique de séquençage a porté sur une liste restreinte de 216 gènes, avec par conséquent l'impossibilité d'analyser des variants candidats situés dans d'autres gènes et dont une analyse d'exome aurait permis la détection.

Ce travail a également souligné la contribution de modèle génétique du multi-hit de variants rares dans l'autisme, dont l'importance a été préalablement suggérée par Girirajan et collaborateurs (Girirajan *et al.*, 2010). Ce mécanisme permet aussi de mieux comprendre comment un gène impliqué dans l'autisme peut également contribuer à d'autres troubles neurodéveloppementaux et neuropsychiatriques (Grant, 2013).

Bibliographie

- 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010; 467(7319): 1061-73.
- ABRAHAMS BS, GESCHWIND DH. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet*. 2008; 9(5): 341-55.
- ADDINGTON AM, GAUTHIER J, PITON A, HAMDAN FF, RAYMOND A, GOGTAY N, MILLER R, TOSSELL J, BAKALAR J, INOFF-GERMAIN G, GOCHMAN P, LONG R, RAPOPORT JL, ROULEAU GA. A novel frameshift mutation in UPF3B identified in brothers affected with childhood onset schizophrenia and autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry*. 2011; 16(3):238-9.
- ADESNIK H, LI G, DURING MJ, PLEASURE SJ, NICOLL RA. NMDA receptors inhibit synapse unsilencing during brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(14): 5597-602.
- ADZHUBEI IA, SCHMIDT S, PESHKIN L, RAMENSKY VE, GERASIMOVA A, BORK P, KONDRASHOV AS, SUNYAEV SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010; 7(4): 248-9.
- ADZHUBEI I, JORDAN DM, SUNYAEV SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013; Chapter 7: Unit7.20.
- ALEXANDER GM, GODWIN DW. Metabotropic glutamate receptors as a strategic target for the treatment of epilepsy. *Epilepsy Res*. 2006; 71(1): 1-22.
- ALIE A, MANUEL M. The backbone of the post-synaptic density originated in a unicellular ancestor of choanoflagellates and metazoans. *BMC Evol Biol*. 2010; 10:34.
- ALLEN DA. Autistic spectrum disorders: clinical presentation in preschool children. *J Child Neurol*. 1988; 3 Suppl: S48-56.
- AMAN MG, ARNOLD LE, MCDOUGLE CJ, VITIELLO B, SCAHILL L, DAVIES M, MCCracken JT, TIERNEY E, NASH PL, POSEY DJ, CHUANG S, MARTIN A, SHAH B, GONZALEZ NM, SWIEZY NB, RITZ L, KOENIG K, MCGOUGH J, GHUMAN JK, LINDSAY RL. Acute and long-term safety and tolerability of risperidone in children with autism. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2005; 15(6): 869-84.
- AMARAL DG, SCHUMANN CM, NORDAHL CW. Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci*. 2008; 31(3): 137-45.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR*. American Psychiatric Publishing: Arlington, Tex., 2000
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5*. American Psychiatric Publishing: Washington, D.C., 2013

Bibliographie

- AMIR RE, VAN DEN VEYVER IB, WAN M, TRAN CQ, FRANCKE U, ZOGHBI HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet.* 1999; 23(2): 185-8.
- AN JY, CRISTINO AS, ZHAO Q, EDSON J, WILLIAMS SM, RAVINE D, WRAY J, MARSHALL VM, HUNT A, WHITEHOUSE AJ, CLAUDIANOS C. Towards a molecular characterization of autism spectrum disorders: an exome sequencing and systems approach. *Transl Psychiatry.* 2014; 4: e394
- ANDARI E, DUHAMEL JR, ZALLA T, HERBRECHT E, LEBOYER M, SIRIGU A. Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(9): 4389-94.
- ANNEY R, KLEI L, PINTO D, REGAN R, CONROY J, MAGALHAES TR, CORREIA C, ABRAHAMS BS, SYKES N, PAGNAMENTA AT, ALMEIDA J, BACCHELLI E, BAILEY AJ, BAIRD G, BATTAGLIA A, BERNEY T, BOLSHAKOVA N, BÖLTE S, BOLTON PF, BOURGERON T, *et al.* A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(20): 4072-82.
- ANNEY R, KLEI L, PINTO D, ALMEIDA J, BACCHELLI E, BAIRD G, BOLSHAKOVA N, BÖLTE S, BOLTON PF, BOURGERON T, BRENNAN S, BRIAN J, CASEY J, CONROY J, CORREIA C, CORSELLO C, CRAWFORD EL, DE JONGE M, DELORME R, DUKETIS E, *et al.* Individual common variants exert weak effects on the risk for autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet.* 2012; 21(21): 4781-92.
- ANTSHEL KM, ANEJA A, STRUNGE L, PEEBLES J, FREMONT WP, STALLONE K, ABDULSABUR N, HIGGINS AM, SHPRINTZEN RJ, KATES WR. Autistic spectrum disorders in velocardio facial syndrome (22q11.2 deletion). *J Autism Dev Disord.* 2007; 37(9): 1776-86.
- ANWYL R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999; 29(1): 83-120.
- ARUGA J, MIKOSHIBA K. Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 24(1): 117-29.
- ASPERGER, H. Die "Autistischen Psychopathen" im Kindesalter. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten.* 1944: p. 76-136

- ATLADOTTIR, H.O., THORSEN, P., OSTERGAARD, L., SCHENDEL, D.E., LEMCKE, S., ABDALLAH, M., PARNER, E.T. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J. Autism Dev. Disord.* 2010; 40, 1423–1430.
- AUTISM GENOME PROJECT CONSORTIUM, SZATMARI P, PATERSON AD, ZWAIGENBAUM L, ROBERTS W, BRIAN J, LIU XQ, VINCENT JB, SKAUG JL, THOMPSON AP, SENMAN L, FEUK L, QIAN C, BRYSON SE, JONES MB, MARSHALL CR, SCHERER SW, VIELAND VJ, BARTLETT C, MANGIN LV, *et al.*. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet.* 2007; 39(3): 319-28.
- AWADALLA P, GAUTHIER J, MYERS RA, CASALS F, HAMDAN FF, GRIFFING AR, COTE M, HENRION E, SPIEGELMAN D, TARABEUX J, PITON A, YANG Y, BOYKO A, BUSTAMANTE C, XIONG L, RAPOPORT JL, ADDINGTON AM, DELISI JL, KREBS MO, JOOBER R, *et al.* Direct measure of the de novo mutation rate in autism and schizophrenia cohorts. *Am J Hum Genet.* 2010; 87(3): 316-24.
- BAILEY A, LE COUTEUR A, GOTTESMAN I, BOLTON P, SIMONOFF E, YUZDA E, RUTTER M. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med.* 1995; 25(1): 63-77.
- BANERJEE S, RIORDAN M, BHAT MA. Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8: 58.
- BARIBEAU DA, ANAGNOSTOU E. Social Communication is an Emerging Target for Pharmacotherapy in Autism Spectrum Disorder - A Review of the Literature on Potential Agents. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2014; 23(1): 20-30.
- BARNBY G, ABBOTT A, SYKES N, MORRIS A, WEEKS DE, MOTT R, LAMB J, BAILEY AJ, MONACO AP; INTERNATIONAL MOLECULAR GENETICS STUDY OF AUTISM CONSORTIUM. Candidate-gene screening and association analysis at the autism-susceptibility locus on chromosome 16p: evidence of association at GRIN2A and ABAT. *Am J Hum Genet.* 2005; 76(6): 950-66.
- BARON-COHEN S, SCOTT FJ, ALLISON C, WILLIAMS J, BOLTON P, MATTHEWS FE, BRAYNE C. Prevalence of autism-spectrum conditions: UK school-based population study. *Br J Psychiatry.* 2009; 194(6): 500-9. Erratum in: *Br J Psychiatry.* 2009; 195(2): 182
- BARRY G. Integrating the roles of long and small non-coding RNA in brain function and disease. *Mol Psychiatry.* 2014; 19(4): 410-6.
- BARTHELEMY C, ROUX S, ADRIEN JL, HAMEURY L, GUERIN P, GARREAU B, FERMANIAN J, LELORD G. Validation of the Revised Behavior Summarized Evaluation Scale. *J Autism Dev Disord.* 1997; 27:139-153

Bibliographie

- BARTZ JA, HOLLANDER E. Oxytocin and experimental therapeutics in autism spectrum disorders. *Prog Brain Res.* 2008; 170: 451-62.
- BASSELL GJ, GROSS C. Reducing glutamate signaling pays off in fragile X. *Nat Med.* 2008; 14(3): 249-50.
- BASU SN, KOLLU R, BANERJEE-BASU S. AutDB: a gene reference resource for autism research. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (Database issue)
- BAYES A, VAN DE LAGEMAAT LN, COLLINS MO, CRONING MD, WHITTLE IR, CHOUDHARY JS, GRANT SG. Characterization of the proteome, diseases and evolution of the human postsynaptic density. *Nat Neurosci.* 2011; 14(1): 19-21.
- BECKER EB, STOODLEY CJ. Autism spectrum disorder and the cerebellum. *Int Rev Neurobiol.* 2013; 113:1-34.
- BEGLOPOULOS V, MONTAG-SALLAZ M, ROHLMANN A, PIECHOTTA K, AHMAD M, MONTAG D, MISSLER M. Neurexophilin 3 is highly localized in cortical and cerebellar regions and is functionally important for sensorimotor gating and motor coordination. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(16): 7278-88.
- BEJANI A, O'NEILL J, KIM JA, FREW AJ, YEE VW, LY R, KITCHEN C, SALAMON N, MCCracken JT, TOGA AW, ALGER JR, LEVITT JG. Elevated glutamatergic compounds in pregenual anterior cingulate in pediatric autism spectrum disorder demonstrated by 1H MRS and 1H MRSI. *PLoS One.* 2012; 7(7): e38786.
- BEN-DAVID E, SHIFMAN S. Combined analysis of exome sequencing points toward a major role for transcription regulation during brain development in autism. *Mol Psychiatry.* 2013; 18(10): 1054-6.
- BÉNA F, BRUNO DL, ERIKSSON M, VAN RAVENSWAAIJ-ARTS C, STARK Z, DIJKHUIZEN T, GERKES E, GIMELLI S, GANESAMOORTHY D, THURESSON AC, LABALME A, TILL M, BILAN F, PASQUIER L, KITZIS A, DUBOURGM C, ROSSI M, BOTTANI A, GAGNEBIN M, SANLAVILLE D, *et al.* Molecular and clinical characterization of 25 individuals with exonic deletions of NRXN1 and comprehensive review of the literature. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2013; 162B(4): 388-403.
- BERG JM, GESCHWIND DH. Autism genetics: searching for specificity and convergence. *Genome Biol.* 2012; 13(7): 247.
- BERKEL S, MARSHALL CR, WEISS B, HOWE J, ROETH R, MOOG U, ENDRIS V, ROBERTS W, SZATMARI P, PINTO D, BONIN M, RIESS A, ENGELS H, SPRENGEL R, SCHERER SW, RAPPOLD GA. Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat Genet.* 2010; 42(6): 489-91.

- BERNARDET M, CRUSIO WE. Fmr1 KO mice as a possible model of autistic features. *ScientificWorldJournal*. 2006; 6:1164-76.
- BERNIER R, GOLZIO C, XIONG B, STESSMAN HA, COE BP, PENN O, WITHERSPOON K, GERDTS J, BAKER C, VULTO-VAN SILFHOUT AT, SCHUURS-HOEIJMAKERS JH, FICHERA M, BOSCO P, BUONO S, ALBERTI A, FAILLA P, PEETERS H, STEYAERT J, VISSERS LE, FRANCESCATTO L, *et al*. Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell*. 2014; 158(2): 263-76
- BETANCUR C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res*. 2011; 1380: 42-77.
- BETTELHEIM, B. *The Empty Fortress: Infantile Autism and the Birth of the self*. The Free Press New York 1967
- BHAKAR AL, DÖLEN G, BEAR MF. The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annu Rev Neurosci*. 2012; 35: 417-43.
- BI C, WU J, JIANG T, LIU Q, CAI W, YU P, CAI T, ZHAO M, JIANG YH, SUN ZS. Mutations of ANK3 identified by exome sequencing are associated with autism susceptibility. *Hum Mutat*. 2012; 33(12): 1635-8
- BISHOP DV. Development of the Children's Communication Checklist (CCC): a method for assessing qualitative aspects of communicative impairment in children. *J Child Psychol Psychiatry*. 1998; 39(6): 879-91
- BLEULER, E. *Dementia Praecox oder Gruppe der Schizophrenien*. Leipzig, Deuticke, 1911.
- BODFISH JW, SYMONS FJ, PARKER DE, LEWIS MH. Varieties of repetitive behavior in autism: comparisons to mental retardation. *J Autism Dev Disord*. 2000; 30(3): 237-43.
- BONNET C, MASUREL-PAULET A, KHAN AA, BERI-DEXHEIMER M, CALLIER P, MUGNERET F, PHILIPPE C, THAUVIN-ROBINET C, FAIVRE L, JONVEAUX P. Exploring the potential role of disease-causing mutation in a gene desert: duplication of noncoding elements 5' of GRIA3 is associated with GRIA3 silencing and X-linked intellectual disability. *Hum Mutat*. 2012; 33(2): 355-8.
- BRAKEMAN PR, LANAHAN AA, O'BRIEN R, ROCHE K, BARNES CA, HUGANIR RL, WORLEY PF. Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature*. 1997; 386(6622): 284-8.
- BRETT M, MCPHERSON J, ZANG ZJ, LAI A, TAN ES, NG I, ONG LC, CHAM B, TAN P, ROZEN S, TAN EC. Massively parallel sequencing of patients with intellectual disability,

Bibliographie

- congenital anomalies and/or autism spectrum disorders with a targeted gene panel. *PLoS One*. 2014; 9(4): e93409.
- BROMLEY RL, MAWER GE, BRIGGS M, CHEYNE C, CLAYTON-SMITH J, GARCÍA-FIÑANA M, KNEEN R, LUCAS SB, SHALLCROSS R, BAKER GA; LIVERPOOL AND MANCHESTER NEURODEVELOPMENT GROUP. The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013; 84(6): 637-43.
- BUFFINGTON SA, HUANG W, COSTA-MATTIOLI M. Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Annu Rev Neurosci*. 2014; 37:17-38.
- BURGOINE E, Wing L. Identical triplets with Asperger's syndrome. *Br J Psychiatry*. 1983; 143:261-5.
- CAMPBELL IM, YATSENKO SA, HIXSON P, REIMSCHISEL T, THOMAS M, WILSON W, DAYAL U, WHELESS JW, CRUNK A, CURRY C, PARKINSON N, FISHMAN L, RIVIELLO JJ, NOWACZYK MJ, ZEESMAN S, ROSENFELD JA, BEJJANI BA, SHAFFER LG, CHEUNG SW, LUPSKI JR, *et al*. Novel 9q34.11 gene deletions encompassing combinations of four Mendelian disease genes: STXBP1, SPTAN1, ENG, and TOR1A. *Genet Med*. 2012; 14(10): 868-76.
- CANITANO R. Epilepsy in autism spectrum disorders. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2007; 16(1): 61-6.
- CANITANO R. New experimental treatments for core social domain in autism spectrum disorders. *Front Pediatr*. 2014; 2: 61.
- CARLSSON ML. Hypothesis: is infantile autism a hypoglutamatergic disorder? Relevance of glutamate - serotonin interactions for pharmacotherapy. *J Neural Transm*. 1998; 105(4-5): 525-35.
- CARSON RP, VAN NIELEN DL, WINZENBURGER PA, ESS KC. Neuronal and glia abnormalities in Tsc1-deficient forebrain and partial rescue by rapamycin. *Neurobiol Dis*. 2012; 45(1): 369-80.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. *MMWR Surveill Summ*. 2014; 63(2): 1-21.
- CHAHROUR MH, YU TW, LIM ET, ATAMAN B, COULTER ME, HILL RS, STEVENS CR, SCHUBERT CR; ARRA AUTISM SEQUENCING COLLABORATION, GREENBERG ME, GABRIEL SB, WALSH CA. Whole-exome sequencing and homozygosity analysis

- implicate depolarization-regulated neuronal genes in autism. *PLoS Genet.* 2012; 8(4): e1002635.
- CHAKRABARTI B, DUDBRIDGE F, KENT L, WHEELWRIGHT S, HILL-CAWTHORNE G, ALLISON C, BANERJEE-BASU S, BARON-COHEN S. Genes related to sex steroids, neural growth, and social-emotional behavior are associated with autistic traits, empathy, and Asperger syndrome. *Autism Res.* 2009; 2(3): 157-77.
- CHAKRABARTI S, FOMBONNE E. Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *Am J Psychiatry.* 2005; 162(6): 1133-41
- CHANCE SA. The cortical microstructural basis of lateralized cognition: a review. *Front Psychol.* 2014; 5: 820.
- CHING H, PRINGSHEIM T. Aripiprazole for autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 May 16; 5:CD009043.
- CHOI Y, SIMS GE, MURPHY S, MILLER JR, CHAN AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One.* 2012; 7(10)
- CHRISTIAN SL, BRUNE CW, SUDI J, KUMAR RA, LIU S, KARAMOHAMED S, BADNER JA, MATSUI S, CONROY J, MCQUAID D, GERGEL J, HATCHWELL E, GILLIAM TC, GERSHON ES, NOWAK NJ, DOBYNS WB, COOK EH JR. Novel submicroscopic chromosomal abnormalities detected in autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry.* 2008; 63(12): 1111-7.
- CHUNG BH, TAO VQ, TSO WW. Copy number variation and autism: new insights and clinical implications. *J Formos Med Assoc.* 2014; 113(7): 400-8.
- COLLINGRIDGE GL, OLSEN RW, PETERS J, SPEDDING M. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology.* 2009; 56(1): 2-5.
- COLLINS MO, HUSI H, YU L, BRANDON JM, ANDERSON CN, BLACKSTOCK WP, CHOUDHARY JS, GRANT SG. Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J Neurochem.* 2006; 97.
- CONRAD DF, PINTO D, REDON R, FEUK L, GOKCUMEN O, ZHANG Y, AERTS J, ANDREWS TD, BARNES C, CAMPBELL P, FITZGERALD T, HU M, IHM CH, KRISTIANSOON K, MACARTHUR DG, MACDONALD JR, ONYIAH I, PANG AW, ROBSON S, STIRRUPS K, *et al.* Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature.* 2010; 464(7289): 704-12.
- CONSTANTINO JN, PRZYBECK T, FRIESEN D, TODD RD. Reciprocal social behavior in children with and without pervasive developmental disorders. *J Dev Behav Pediatr.* 2000; 21(1): 2-11.

Bibliographie

- COOPER GM, COE BP, GIRIRAJAN S, ROSENFELD JA, VU TH, BAKER C, WILLIAMS C, STALKER H, HAMID R, HANNIG V, ABDEL-HAMID H, BADER P, MCCrackEN E, NIYAZOV D, LEPPIG K, THIESE H, HUMMEL M, ALEXANDER N, GORSKI J, KUSSMANN J, *et al.* A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011; 43(9):838-46.
- COOPER GM, SHENDURE J. Needles in stacks of needles: finding disease-causal variants in a wealth of genomic data. *Nat Rev Genet.* 2011; 12(9): 628-40.
- COURCHESNE E, CARPER R, AKSHOOMOFF N. Evidence of brain overgrowth in the first year of life in autism. *JAMA.* 2003; 290(3): 337-44.
- COURCHESNE E, MOUTON PR, CALHOUN ME, SEMENDEFERI K, AHRENS-BARBEAU C, HALLET MJ, BARNES CC, PIERCE K. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA.* 2011; 306(18): 2001-10.
- CROSS-DISORDER GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet.* 2013; 381(9875): 1371-9.
- CURATOLO P, BOMBARDIERI R, JOZWIAK S. Tuberous sclerosis. *Lancet.* 2008; 372(9639): 657-68.
- DAOUD H, BONNET-BRILHAULT F, VEDRINE S, DEMATTEI MV, VOURC'H P, BAYOU N, ANDRES CR, BARTHELEMY C, LAUMONNIER F, BRIAULT S. Autism and nonsyndromic mental retardation associated with a de novo mutation in the NLGN4X gene promoter causing an increased expression level. *Biol Psychiatry.* 2009; 66(10): 906-10.
- DE LEERSNYDER H. Smith-Magenis syndrome. *Handb Clin Neurol.* 2013;111: 295-6.
- DE LIGT J, WILLEMSSEN MH, VAN BON BW, KLEEFSTRA T, YNTEMA HG, KROES T, VULTOVAN SILFHOUT AT, KOOLEN DA, DE VRIES P, GILISSEN C, DEL ROSARIO M, HOISCHEN A, SCHEFFER H, DE VRIES BB, BRUNNER HG, VELTMAN JA, VISSERS LE. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med.* 2012; 367(20): 1921-9.
- DE RUBEIS S, HE X, GOLDBERG AP, POULTNEY CS, SAMOCHA K, ERCUMENT CICEK A, KOU Y, LIU L, FROMER M, WALKER S, SINGH T, KLEI L, KOSMICKI J, FU SC, ALEKSIC B, BISCALDI M, BOLTON PF, BROWNFELD JM, CAI J, CAMPBELL NG, *et al.* Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature.* 2014 Oct 29.
- DEJANOVIC B, LAL D, CATARINO CB, ARJUNE S, BELAIDI AA, TRUCKS H, VOLLMAR C, SURGES R, KUNZ WS, MOTAMENY S, ALTMÜLLER J, KÖHLER A, NEUBAUER BA, EPICURE CONSORTIUM, NÜRNBERG P, NOACHTAR S, SCHWARZ G, SANDER T. Exonic

- microdeletions of the gephyrin gene impair GABAergic synaptic inhibition in patients with idiopathic generalized epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2014; 67: 88-96.
- DELORME R, EY E, TORO R, LEBOYER M, GILLBERG C, BOURGERON T. Progress toward treatments for synaptic defects in autism. *Nat Med.* 2013; 19(6): 685-94.
- DEMENTIEVA YA, VANCE DD, DONNELLY SL, ELSTON LA, WOLPERT CM, RAVAN SA, DELONG GR, ABRAMSON RK, WRIGHT HH, CUCCARO ML. Accelerated head growth in early development of individuals with autism. *Pediatr Neurol.* 2005; 32(2): 102-8.
- DEPINO AM. Peripheral and central inflammation in autism spectrum disorders. *Mol Cell Neurosci.* 2013; 53: 69-76.
- DEUTSCH SI, PEPE GJ, BURKET JA, WINEBARGER EE, HERNDON AL, BENSON AD. D-cycloserine improves sociability and spontaneous stereotypic behaviors in 4-week old mice. *Brain Res.* 2012; 1439: 96-107.
- DEVLIN B, MELHEM N, ROEDER K. Do common variants play a role in risk for autism? Evidence and theoretical musings. *Brain Res.* 2011; 1380: 78-84.
- DEVLIN B, SCHERER SW. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev.* 2012; 22(3): 229-37.
- DICHTER GS. Functional magnetic resonance imaging of autism spectrum disorders. *Dialogues Clin Neurosci.* 2012; 14(3): 319-51.
- DÖLEN G, OSTERWEIL E, RAO BS, SMITH GB, AUERBACH BD, CHATTARJI S, BEAR MF. Correction of fragile X syndrome in mice. *Neuron.* 2007; 56(6): 955-62.
- DUFOUR-RAINFRAY D, VOURC'H P, TOURLET S, GUILLOTEAU D, CHALON S, ANDRES CR. Fetal exposure to teratogens: evidence of genes involved in autism. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011; 35(5): 1254-65.
- DURAK O, DE ANDA FC, SINGH KK, LEUSSIS MP, PETRYSHEN TL, SKLAR P, TSAI LH. Ankyrin-G regulates neurogenesis and Wnt signaling by altering the subcellular localization of β -catenin. *Mol Psychiatry.* 2014 May 13.
- DURAND CM, BETANCUR C, BOECKERS TM, BOCKMANN J, CHASTE P, FAUCHEREAU F, NYGREN G, RASTAM M, GILLBERG IC, ANCKARSÄTER H, SPONHEIM E, GOUBRAN-BOTROS H, DELORME R, CHABANE N, MOUREN-SIMEONI MC, DE MAS P, BIETH E, ROGE B, HERON D, BURGLEN L, *et al.* Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet.* 2007; 39(1): 25-7.
- EBERT DH, GREENBERG ME. Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder. *Nature.* 2013; 493(7432): 327-37.

Bibliographie

- EGGER G, ROETZER KM, NOOR A, LIONEL AC, MAHMOOD H, SCHWARZBRAUN T, BORIGHT O, MIKHAILOV A, MARSHALL CR, WINDPASSINGER C, PETEK E, SCHERER SW, KASCHNITZ W, VINCENT JB. Identification of risk genes for autism spectrum disorder through copy number variation analysis in Austrian families. *Neurogenetics*. 2014; 15(2): 117-27.
- ELIA J, GLESSNER JT, WANG K, TAKAHASHI N, SHTIR CJ, HADLEY D, SLEIMAN PM, ZHANG H, KIM CE, ROBISON R, LYON GJ, FLORY JH, BRADFIELD JP, IMIELINSKI M, HOU C, FRACKELTON EC, CHIAVACCI RM, SAKURAI T, RABIN C, MIDDLETON FA, *et al*. Genome-wide copy number variation study associates metabotropic glutamate receptor gene networks with attention deficit hyperactivity disorder. *Nat Genet*. 2011; 44(1): 78-84.
- ENDELE S, ROSENBERGER G, GEIDER K, POPP B, TAMER C, STEFANOVA I, MILH M, KORTÜM F, FRITSCH A, PIENKA FK, HELLENBROICH Y, KALSCHUEUR VM, KOHLHASE J, MOOG U, RAPPOLD G, RAUCH A, ROPERS HH, VON SPICZAK S, TÖNNIES H, VILLENEUVE N, *et al*. Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nat Genet*. 2010; 42(11): 1021-6.
- EPI4K CONSORTIUM; EPILEPSY PHENOME/GENOME PROJECT. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*. 2013; 501(7466): 217-21.
- EVATT ML, DELONG MR, GRANT WB, CANNELL JJ, TANGPRICHA V. Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. *Neurology*. 2009; 73(12): 997.
- FARMER CA, AMAN MG. Aripiprazole for the treatment of irritability associated with autism. *Expert Opin Pharmacother*. 2011; 12(4): 635-40.
- FATEMI SH, HALT AR, REALMUTO G, EARLE J, KIST DA, THURAS P, MERZ A. Purkinje cell size is reduced in cerebellum of patients with autism. *Cell Mol Neurobiol*. 2002; 22(2): 171-5.
- FENG Y, WALSH CA. Mitotic spindle regulation by Nde1 controls cerebral cortical size. *Neuron*. 2004; 44(2): 279-93.
- FEUK L, MARSHALL CR, WINTLE RF, SCHERER SW. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet*. 2006; 15 Spec No 1:R57-66.
- FOLSTEIN S, RUTTER M. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry*. 1977; 18(4): 297-321.

- FOMBONNE E. The prevalence of autism. *Jama*. 2003; 289:87-89. A
- FOMBONNE E. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J Autism Dev Disord*. 2003; 33(4): 365-82. B
- FOMBONNE E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr Res*. 2009 65: 591-598
- FREITAG CM. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry*. 2007; 12(1): 2-22.
- FRITH, U. (ed). *Autism and Asperger Syndrome*. Cambridge University Press 1991.
- GAMBRILL AC, BARRIA A. NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(14): 5855-60.
- GARDENER H, SPIEGELMAN D, BUKA SL. Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2009; 195(1): 7-14.
- GARDENER H, SPIEGELMAN D, BUKA SL. Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. *Pediatrics*. 2011; 128(2): 344-55.
- GAUGLER T, KLEI L, SANDERS SJ, BODEA CA, GOLDBERG AP, LEE AB, MAHAJAN M, MANAA D, PAWITAN Y, REICHERT J, RIPKE S, SANDIN S, SKLAR P, SVANTESSON O, REICHENBERG A, HULTMAN CM, DEVLIN B, ROEDER K, BUXBAUM JD. Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nat Genet*. 2014; 46(8): 881-5.
- GERVAIS H, BELIN P, BODDAERT N, LEBOYER M, COEZ A, SFAELLO I, BARTHELEMY C, BRUNELLE F, SAMSON Y, ZILBOVICIUS M. Abnormal cortical voice processing in autism. *Nat Neurosci*. 2004; 7: 801-802
- GILMAN SR, IOSSIFOV I, LEVY D, RONEMUS M, WIGLER M, VITKUP D. Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. *Neuron*. 2011; 70(5): 898-907.
- GIRIRAJAN S, ROSENFELD JA, COOPER GM, ANTONACCI F, SISWARA P, ITSARA A, VIVES L, WALSH T, MCCARTHY SE, BAKER C, MEFFORD HC, KIDD JM, BROWNING SR, BROWNING BL, DICKEL DE, LEVY DL, BALLIF BC, PLATKY K, FARBER DM, GOWANS GC, *et al*. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet*. 2010; 42(3): 203-9.
- GIRIRAJAN S, ROSENFELD JA, COE BP, PARIKH S, FRIEDMAN N, GOLDSTEIN A, FILIPINK RA, MCCONNELL JS, ANGLE B, MESCHINO WS, NEZARATI MM, ASAMOAH A, JACKSON KE, GOWANS GC, MARTIN JA, CARMANY EP, STOCKTON DW, SCHNUR RE, PENNEY LS, MARTIN DM, *et al*. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med*. 2012; 367(14): 1321-31.

Bibliographie

- GIRIRAJAN S, JOHNSON RL, TASSONE F, BALCIUNIENE J, KATIYAR N, FOX K, BAKER C, SRIKANTH A, YEOH KH, KHOO SJ, NAUTH TB, HANSEN R, RITCHIE M, HERTZ-PICCIOTTO I, EICHLER EE, PESSAH IN, SELLECK SB. Global increases in both common and rare copy number load associated with autism. *Hum Mol Genet.* 2013; 22(14): 2870-80. A
- GIRIRAJAN S, DENNIS MY, BAKER C, MALIG M, COE BP, CAMPBELL CD, MARK K, VU TH, ALKAN C, CHENG Z, BIESECKER LG, BERNIER R, EICHLER EE. Refinement and discovery of new hotspots of copy-number variation associated with autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.* 2013; 92(2): 221-37. B
- GLESSNER JT, WANG K, CAI G, KORVATSKA O, KIM CE, WOOD S, ZHANG H, ESTES A, BRUNE CW, BRADFIELD JP, IMIELINSKI M, FRACKELTON EC, REICHERT J, CRAWFORD EL, MUNSON J, SLEIMAN PM, CHIAVACCI R, ANNAIAH K, THOMAS K, HOU C, *et al.* Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature.* 2009; 459(7246): 569-73.
- GRANT SG, MARSHALL MC, PAGE KL, CUMISKEY MA, ARMSTRONG JD. Synapse proteomics of multiprotein complexes: en route from genes to nervous system diseases. *Hum Mol Genet.* 2005; 14 Spec No. 2: R225-34.
- GRANT SG. SnapShot: Organizational principles of the postsynaptic proteome. *Neuron.* 2013; 80(2): 534.e1.
- GRZADZINSKI R, HUERTA M, LORD C. DSM-5 and autism spectrum disorders (ASDs): an opportunity for identifying ASD subtypes. *Mol Autism.* 2013; 4(1): 12.
- GUILMATRE A, DUBOURG C, MOSCA AL, LEGALLIC S, GOLDENBERG A, DROUIN-GARRAUD V, LAYET V, ROSIER A, BRIAULT S, BONNET-BRILHAULT F, LAUMONNIER F, ODENT S, LE VACON G, JOLY-HELAS G, DAVID V, BENDAVID C, PINOIT JM, HENRY C, IMPALLOMENI C, GERMANO E, *et al.* Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Arch Gen Psychiatry.* 2009; 66(9): 947-56.
- GUINCHAT V, THORSEN P, LAURENT C, CANS C, BODEAU N, COHEN D. Pre-, peri- and neonatal risk factors for autism. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2012; 91(3): 287-300.
- HAGERMAN R, HOEM G, HAGERMAN P. Fragile X and autism: Intertwined at the molecular level leading to targeted treatments. *Mol Autism.* 2010; 1(1): 12.
- HALL BJ, RIPLEY B, GHOSH A. NR2B signaling regulates the development of synaptic AMPA receptor current. *J Neurosci.* 2007; 27(49): 13446-56.

- HALLMAYER J, CLEVELAND S, TORRES A, PHILLIPS J, COHEN B, TORIGOE T, MILLER J, FEDELE A, COLLINS J, SMITH K, LOTSPEICH L, CROEN LA, OZONOFF S, LAJONCHERE C, GREYER JK, RISCH N. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry*. 2011; 68(11): 1095-102.
- HAMDAN FF, DAoud H, PITON A, GAUTHIER J, DOBRZENIECKA S, KREBS MO, JOOBER R, LACAILLE JC, NADEAU A, MILUNSKY JM, WANG Z, CARMANT L, MOTTRON L, BEAUCHAMP MH, ROULEAU GA, MICHAUD JL. De novo SYNGAP1 mutations in nonsyndromic intellectual disability and autism. *Biol Psychiatry*. 2011; 69(9): 898-901.
- HANNES FD, SHARP AJ, MEFFORD HC, DE RAVEL T, RUIVENKAMP CA, BREUNING MH, FRYNS JP, DEVRIENDT K, VAN BUGGENHOUT G, VOGELS A, STEWART H, HENNEKAM RC, COOPER GM, REGAN R, KNIGHT SJ, EICHLER EE, VERMEESCH JR. Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. *J Med Genet*. 2009; 46(4): 223-32.
- HAUSER WA, ANNEGERS JF, KURLAND LT. Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940-1980. *Epilepsia*. 1991; 32(4): 429-45.
- HAYES JL, TZIKA A, THYGESEN H, BERRI S, WOOD HM, HEWITT S, PENDLEBURY M, COATES A, WILLOUGHBY L, WATSON CM, RABBITS P, ROBERTS P, TAYLOR GR. Diagnosis of copy number variation by Illumina next generation sequencing is comparable in performance to oligonucleotide array comparative genomic hybridisation. *Genomics*. 2013; 102(3): 174-81.
- HEATH PR, SHAW PJ. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2002; 26(4): 438-58.
- HEHIR-KWA JY, PFUNDT R, VELTMAN JA, DE LEEUW N. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet*. 2013; 84(5): 415-21.
- HEIL KM, SCHAAF CP. The genetics of Autism Spectrum Disorders--a guide for clinicians. *Curr Psychiatry Rep*. 2013; 15(1): 334.
- HENDERSON C, WIJETUNGE L, KINOSHITA MN, SHUMWAY M, HAMMOND RS, POSTMA FR, BRYNCZKA C, RUSH R, THOMAS A, PAYLOR R, WARREN ST, VANDERKLISH PW, KIND PC, CARPENTER RL, BEAR MF, HEALY AM. Reversal of disease-related pathologies in the fragile X mouse model by selective activation of GABAB receptors with arbaclofen. *Sci Transl Med*. 2012; 4(152): 152ra128.
- HOCHMANN, J. *Histoire de l'autisme*. Ed. O. Jacob 2009

Bibliographie

- HOCHSTENBACH R, POOT M, NIJMAN IJ, RENKENS I, DURAN KJ, VAN'T SLOT R, VAN BINSBERGEN E, VAN DER ZWAAG B, VOGEL MJ, TERHAL PA, PLOOS VAN AMSTEL HK, KLOOSTERMAN WP, CUPPEN E. Discovery of variants unmasked by hemizygous deletions. *Eur J Hum Genet.* 2012; 20(7): 748-53.
- HOISCHEN A, KRUMM N, EICHLER EE. Prioritization of neurodevelopmental disease genes by discovery of new mutations. *Nat Neurosci.* 2014; 17(6): 764-72.
- HOLTMAAT A, SVOBODA K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10(9): 647-58.
- HOON M, SOYKAN T, FALKENBURGER B, HAMMER M, PATRIZI A, SCHMIDT KF, SASSOE-POGNETTO M, LÖWEL S, MOSER T, TASCHENBERGER H, BROSE N, VAROQUEAUX F. Neuroligin-4 is localized to glycinergic postsynapses and regulates inhibition in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(7): 3053-8.
- HSIAO EY, MCBRIDE SW, HSIEN S, SHARON G, HYDE ER, MCCUE T, CODELLI JA, CHOW J, REISMAN SE, PETROSINO JF, PATTERSON PH, MAZMANIAN SK. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell.* 2013; 155(7): 1451-63.
- HUANG G, SHIGESADA K, WEE HJ, LIU PP, OSATO M, ITO Y. Molecular basis for a dominant inactivation of RUNX1/AML1 by the leukemogenic inversion 16 chimera. *Blood.* 2004; 103(8): 3200-7.
- HUC-CHABROLLE M, CHARON C, GUILMATRE A, VOURC'H P, TRIPI G, BARTHEZ MA, SIZARET E, THEPAULT RA, LE GALLIC S, HAGER J, TOUTAIN A, RAYNAUD M, ANDRES C, CAMPION D, LAUMONNIER F, BONNET-BRILHAULT F. Xq27 FRAXA locus is a strong candidate for dyslexia: evidence from a genome-wide scan in French families. *Behav Genet.* 2013; 43(2):132-40.
- HUGUET G, EY E, BOURGERON T. The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013; 14: 191-213.
- HUGUET G, NAVA C, LEMIERE N, PATIN E, LAVAL G, EY E, BRICE A, LEBOYER M, SZEPETOWSKI P, GILLBERG C, DEPIENNE C, DELORME R, BOURGERON T. Heterogeneous pattern of selective pressure for PRRT2 in human populations, but no association with autism spectrum disorders. *PLoS One.* 2014; 9(3): e88600.
- IAFRATE AJ, FEUK L, RIVERA MN, LISTEWNIK ML, DONAHOE PK, QI Y, SCHERER SW, LEE C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet.* 2004; 36(9): 949-51.

- IMGSAC (International Molecular Genetic Study of Autism Consortium). A genome wide screen for autism: strong evidence for linkage to chromosomes 2q, 7q, and 16p. *Am J Hum Genet.* 2001; 69(3): 570-81.
- IOSSIFOV I, RONEMUS M, LEVY D, WANG Z, HAKKER I, ROSENBAUM J, YAMROM B, LEE YH, NARZISI G, LEOTTA A, KENDALL J, GRABOWSKA E, MA B, MARKS S, RODGERS L, STEPANSKY A, TROGE J, ANDREWS P, BEKRITSKY M, PRADHAN K, *et al.* De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron.* 2012; 74(2): 285-99.
- IOSSIFOV I, O'ROAK BJ, SANDERS SJ, RONEMUS M, KRUMM N, LEVY D, STESSMAN HA, WITHERSPOON KT, VIVES L, PATTERSON KE, SMITH JD, PAEPER B, NICKERSON DA, DEA J, DONG S, GONZALEZ LE, MANDELL JD, MANE SM, MURTHA MT, SULLIVAN CA, *et al.* The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature.* 2014 Oct 29; 515(7526): 216-21.
- IQBAL Z, VANDEWEYER G, VAN DER VOET M, WARYAH AM, ZAHOR MY, BESSELING JA, ROCA LT, VULTO-VAN SILFHOUT AT, NIJHOF B, KRAMER JM, VAN DER AA N, ANSAR M, PEETERS H, HELSMOORTELE C, GILISSEN C, VISSERS LE, VELTMAN JA, DE BROUWER AP, FRANK KOOY R, RIAZUDDIN *et al.* Homozygous and heterozygous disruptions of ANK3: at the crossroads of neurodevelopmental and psychiatric disorders. *Hum Mol Genet.* 2013; 22(10): 1960-70.
- ITSARA A, WU H, SMITH JD, NICKERSON DA, ROMIEU I, LONDON SJ, EICHLER EE. De novo rates and selection of large copy number variation. *Genome Res.* 2010; 20(11): 1469-81.
- JACQUEMONT ML, SANLAVILLE D, REDON R, RAOUL O, CORMIER-DAIRE V, LYONNET S, AMIEL J, LE MERRER M, HERON D, DE BLOIS MC, PRIEUR M, VEKEMANS M, CARTER NP, MUNNICH A, COLLEAUX L, PHILIPPE A. Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J Med Genet.* 2006; 43(11): 843-9.
- JACQUEMONT S, REYMOND A, ZUFFEREY F, HAREWOOD L, WALTERS RG, KUTALIK Z, MARTINET D, SHEN Y, VALSESIA A, BECKMANN ND, THORLEIFSSON G, BELFIORE M, BOUQUILLON S, CAMPION D, DE LEEUW N, DE VRIES BB, ESKO T, FERNANDEZ BA, FERNÁNDEZ-ARANDA F, FERNÁNDEZ-REAL JM, *et al.* Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature.* 2011; 478(7367): 97-102.

Bibliographie

- JAMAIN S, BETANCUR C, QUACH H, PHILIPPE A, FELLOUS M, GIROS B, GILLBERG C, LEBOYER M, BOURGERON T; PARIS AUTISM RESEARCH INTERNATIONAL SIBPAIR (PARIS) STUDY. Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Mol Psychiatry*. 2002; 7(3): 302-10.
- JAMAIN S, QUACH H, BETANCUR C, RÅSTAM M, COLINEAUX C, GILLBERG IC, SODERSTROM H, GIROS B, LEBOYER M, GILLBERG C, BOURGERON T; PARIS AUTISM RESEARCH INTERNATIONAL SIBPAIR STUDY. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet*. 2003; 34(1): 27-9.
- JIANG YH, YUEN RK, JIN X, WANG M, CHEN N, WU X, JU J, MEI J, SHI Y, HE M, WANG G, LIANG J, WANG Z, CAO D, CARTER MT, CHRYSLER C, DRMIC IE, HOWE JL, LAU L, MARSHALL CR, *et al*. Detection of clinically relevant genetic variants in autism spectrum disorder by whole-genome sequencing. *Am J Hum Genet*. 2013; 93(2): 249-63.
- JIANG YH, WANG Y, XIU X, CHOY KW, PURSLEY AN, CHEUNG SW. Genetic diagnosis of autism spectrum disorders: The opportunity and challenge in the genomics era. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014; 51(5): 249-62.
- JOLLY LA, HOMAN CC, JACOB R, BARRY S, GECZ J. The UPF3B gene, implicated in intellectual disability, autism, ADHD and childhood onset schizophrenia regulates neural progenitor cell behaviour and neuronal outgrowth. *Hum Mol Genet*. 2013; 22(23):4673-87.
- KALKMAN HO. A review of the evidence for the canonical Wnt pathway in autism spectrum disorders. *Mol Autism*. 2012; 3(1): 10.
- KAMINSKY EB, KAUL V, PASCHALL J, CHURCH DM, BUNKE B, KUNIG D, MORENO-DE-LUCA D, MORENO-DE-LUCA A, MULLE JG, WARREN ST, RICHARD G, COMPTON JG, FULLER AE, GLIEM TJ, HUANG S, COLLINSON MN, BEAL SJ, ACKLEY T, PICKERING DL, GOLDEN DM, *et al*. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med*. 2011; 13(9): 777-84.
- KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H., & JESSELL, T. M. (EDS.). *Principles of neural science (Fourth Edition)*. New York: McGraw-Hill , 2000.
- KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*. 1943; (2): 217-250
- KANNER, L, EISENBERG, L. Early Infantile Autism, 1943-1955. *Am J Orthopsychiatry*. 1956; 26(3): 556-566

- KAVANAGH DH, DWYER S, O'DONOVAN MC, OWEN MJ. The ENCODE project: implications for psychiatric genetics. *Mol Psychiatry*. 2013; 18(5): 540-2.
- KELLEHER RJ 3RD, GEIGENMÜLLER U, HOVHANNISYAN H, TRAUTMAN E, PINARD R, RATHMELL B, CARPENTER R, MARGULIES D. High-throughput sequencing of mGluR signaling pathway genes reveals enrichment of rare variants in autism. *PLoS One*. 2012; 7(4): e35003.
- KEMPER TL, BAUMAN ML. The contribution of neuropathologic studies to the understanding of autism. *Neurol Clin*. 1993; 11(1): 175-87.
- KENT WJ, SUGNET CW, FUREY TS, ROSKIN KM, PRINGLE TH, ZAHLER AM, HAUSSLER D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res*. 2002; 12(6): 996-1006.
- KIM E, CHO KO, ROTHSCHILD A, SHENG M. Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron*. 1996; 17(1): 103-13.
- KIM YS, LEVENTHAL BL, KOH YJ, FOMBONNE E, LASKA E, LIM EC, CHEON KA, KIM SJ, KIM YK, LEE H, SONG DH, GRINKER RR. Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *Am J Psychiatry*. 2011; 168(9): 904-12. Erratum in: *Am J Psychiatry*. 2013; 170(6): 689.
- KLASSEN T, DAVIS C, GOLDMAN A, BURGESS D, CHEN T, WHEELER D, MCPHERSON J, BOURQUIN T, LEWIS L, VILLASANA D, MORGAN M, MUZNY D, GIBBS R, NOEBELS J. Exome sequencing of ion channel genes reveals complex profiles confounding personal risk assessment in epilepsy. *Cell*. 2011; 145(7): 1036-48.
- KLEI L, SANDERS SJ, MURTHA MT, HUS V, LOWE JK, WILLSEY AJ, MORENO-DE-LUCA D, YU TW, FOMBONNE E, GESCHWIND D, GRICE DE, LEDBETTER DH, LORD C, MANE SM, MARTIN CL, MARTIN DM, MORROW EM, WALSH CA, MELHEM NM, CHASTE P, *et al*. Common genetic variants, acting additively, are a major source of risk for autism. *Mol Autism*. 2012; 3(1): 9.
- KONG A, FRIGGE ML, MASSON G, BESENBACHER S, SULEM P, MAGNUSSON G, GUDJONSSON SA, SIGURDSSON A, JONASDOTTIR A, JONASDOTTIR A, WONG WS, SIGURDSSON G, WALTERS GB, STEINBERG S, HELGASON H, THORLEIFSSON G, GUDBJARTSSON DF, HELGASON A, MAGNUSSON OT, THORSTEINSDOTTIR U, *et al*. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*. 2012; 488(7412): 471-5.
- KOUSOULIDOU L, TANTELES G, MOUTAFI M, SISMANI C, PATSALIS PC, ANASTASIADOU V. 263.4 kb deletion within the TCF4 gene consistent with Pitt-Hopkins syndrome,

Bibliographie

- inherited from a mosaic parent with normal phenotype. *Eur J Med Genet.* 2013; 56(6): 314-8.
- KOYTIGER G, KAUSHANSKY A, GORDUS A, RUSH J, SORGER PK, MACBEATH G. Phosphotyrosine signaling proteins that drive oncogenesis tend to be highly interconnected. *Mol Cell Proteomics.* 2013; 12(5): 1204-13.
- KRUMM N, O'ROAK BJ, SHENDURE J, EICHLER EE. A de novo convergence of autism genetics and molecular neuroscience. *Trends Neurosci.* 2014; 37(2): 95-105.
- KUMAR P, HENIKOFF S, NG PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009; 4(7): 1073-81.
- KUTSCHE K, YNTEMA H, BRANDT A, JANTKE I, NOTHWANG HG, ORTH U, BOAVIDA MG, DAVID D, CHELLY J, FRYNS JP, MORAINÉ C, ROPERS HH, HAMEL BC, VAN BOKHOVEN H, GAL A. Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet.* 2000; 26(2): 247-50.
- LASALLE JM. Autism genes keep turning up chromatin. *OA Autism.* 2013; 1(2): 14.
- LAUMONNIER F, BONNET-BRILHAULT F, GOMOT M, BLANC R, DAVID A, MOIZARD MP, RAYNAUD M, RONCE N, LEMONNIER E, CALVAS P, LAUDIER B, CHELLY J, FRYNS JP, ROPERS HH, HAMEL BC, ANDRES C, BARTHÉLÉMY C, MORAINÉ C, BRIAULT S. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet.* 2004; 74(3): 552-7.
- LAUMONNIER F, CUTHBERT PC, GRANT SG. The role of neuronal complexes in human X-linked brain diseases. *Am J Hum Genet.* 2007; 80(2): 205-20.
- LAUMONNIER F, SHOUBRIDGE C, ANTAR C, NGUYEN LS, VAN ESCH H, KLEEFSTRA T, BRIAULT S, FRYNS JP, HAMEL B, CHELLY J, ROPERS HH, RONCE N, BLESSON S, MORAINÉ C, GECZ J, RAYNAUD M. Mutations of the UPF3B gene, which encodes a protein widely expressed in neurons, are associated with nonspecific mental retardation with or without autism. *Mol Psychiatry.* 2010; 15(7):767-76.
- LAURA RP, ROSS S, KOEPPEN H, LASKY LA. MAGI-1: a widely expressed, alternatively spliced tight junction protein. *Exp Cell Res.* 2002; 275(2): 155-70.
- LAWSON-YUEN A, SALDIVAR JS, SOMMER S, PICKER J. Familial deletion within NLGN4 associated with autism and Tourette syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2008; 16(5): 614-8.

- LE COUTEUR A, BAILEY A, GOODE S, PICKLES A, ROBERTSON S, GOTTESMAN I, RUTTER M. A broader phenotype of autism: the clinical spectrum in twins. *J Child Psychol Psychiatry*. 1996; 37(7): 785-801.
- LEBLOND CS, HEINRICH J, DELORME R, PROEPPER C, BETANCUR C, HUGUET G, KONYUKH M, CHASTE P, EY E, RASTAM M, ANCKARSÄTER H, NYGREN G, GILLBERG IC, MELKE J, TORO R, REGNAULT B, FAUCHEREAU F, MERCATI O, LEMIÈRE N, SKUSE D, *et al*. Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. *PLoS Genet*. 2012; 8(2): e1002521.
- LEMONNIER E, DEGREGZ C, PHELEP M, TYZIO R, JOSSE F, GRANDGEORGE M, HADJIKHANI N, BEN-ARI Y. A randomised controlled trial of bumetanide in the treatment of autism in children. *Transl Psychiatry*. 2012; 2: e202.
- LESCA G, RUDOLF G, LABALME A, HIRSCH E, ARZIMANOGLU A, GENTON P, MOTTE J, DE SAINT MARTIN A, VALENTI MP, BOULAY C, DE BELLESCIZE J, KÉO-KOSAL P, BOUTRY-KRYZA N, EDERY P, SANLAVILLE D, SZEPETOWSKI P. Epileptic encephalopathies of the Landau-Kleffner and continuous spike and waves during slow-wave sleep types: genomic dissection makes the link with autism. *Epilepsia*. 2012; 53(9): 1526-38.
- LEVY D, RONEMUS M, YAMROM B, LEE YH, LEOTTA A, KENDALL J, MARKS S, LAKSHMI B, PAI D, YE K, BUJA A, KRIEGER A, YOON S, TROGE J, RODGERS L, IOSSIFOV I, WIGLER M. Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. *Neuron*. 2011; 70(5): 886-97.
- LIAO HM, GAU SS, TSAI WC, FANG JS, SU YC, CHOU MC, LIU SK, CHOU WJ, WU YY, CHEN CH. Chromosomal abnormalities in patients with autism spectrum disorders from Taiwan. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2013 Oct; 162B(7): 734-41.
- LIM ET, RAYCHAUDHURI S, SANDERS SJ, STEVENS C, SABO A, MACARTHUR DG, NEALE BM, KIRBY A, RUDERFER DM, FROMER M, LEK M, LIU L, FLANNICK J, RIPKE S, NAGASWAMY U, MUZNY D, REID JG, HAWES A, NEWSHAM I, WU Y, *et al*. Rare complete knockouts in humans: population distribution and significant role in autism spectrum disorders. *Neuron*. 2013; 77(2): 235-42.
- LIONEL AC, CROSBIE J, BARBOSA N, GOODALE T, THIRUVAHINDRAPURAM B, RICKABY J, GAZZELLONE M, CARSON AR, HOWE JL, WANG Z, WEI J, STEWART AF, ROBERTS R, MCPHERSON R, FIEBIG A, FRANKE A, SCHREIBER S, ZWAIGENBAUM L, FERNANDEZ BA, ROBERTS W, *et al*. Rare copy number variation discovery and cross-disorder comparisons identify risk genes for ADHD. *Sci Transl Med*. 2011; 3(95): 95ra75.

Bibliographie

- LIONEL AC, VAAGS AK, SATO D, GAZZELLONE MJ, MITCHELL EB, CHEN HY, COSTAIN G, WALKER S, EGGER G, THIRUVAHINDRAPURAM B, MERICO D, PRASAD A, ANAGNOSTOU E, FOMBONNE E, ZWAIGENBAUM L, ROBERTS W, SZATMARI P, FERNANDEZ BA, GEORGIEVA L, BRZUSTOWICZ LM, *et al.* Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia and seizures. *Hum Mol Genet.* 2013; 22(10): 2055-66.
- LIU X, TAKUMI T. Genomic and Genetic Aspects of Autism Spectrum Disorder. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 452(2): 244-253.
- LOHOFF FW, DAHL JP, FERRARO TN, ARNOLD SE, GALLINAT J, SANDER T, BERRETTINI WH. Variations in the vesicular monoamine transporter 1 gene (VMAT1/SLC18A1) are associated with bipolar i disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2006; 31(12): 2739-47.
- LORD C, RUTTER M, GOODE S, HEEMSBERGEN J, JORDAN H, MAWHOOD L, SCHOPLER E. Autism diagnostic observation schedule: a standardized observation of communicative and social behavior. *J Autism Dev Disord.* 1989; 19(2): 185-212.
- LORD, C, RUTTER, M, LE COUTEUR, A. Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J of Autism Dev Disord.* 1994; 24(5), 659-685.
- LOTTER, V, Epidemiology of autistic conditions in young children: 1. Prevalence. *Social psychiatry.* 1966; (1): 124-137
- MAAS NM, VAN DE PUTTE T, MELOTTE C, FRANCIS A, SCHRANDER-STUMPEL CT, SANLAVILLE D, GENEVIEVE D, LYONNET S, DIMITROV B, DEVRIENDT K, FRYNS JP, VERMEESCH JR. The C20orf133 gene is disrupted in a patient with Kabuki syndrome. *J Med Genet.* 2007; 44(9): 562-9
- MACDONALD JR, ZIMAN R, YUEN RK, FEUK L, SCHERER SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42.
- MALHOTRA D, SEBAT J. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell.* 2012; 148(6): 1223-41.
- MANAKOV SA, GRANT SG, ENRIGHT AJ. Reciprocal regulation of microRNA and mRNA profiles in neuronal development and synapse formation. *BMC Genomics.* 2009; 10: 419.
- MANOLIO TA, COLLINS FS, COX NJ, GOLDSTEIN DB, HINDORFF LA, HUNTER DJ, MCCARTHY MI, RAMOS EM, CARDON LR, CHAKRAVARTI A, CHO JH, GUTTMACHER AE, KONG A,

- KRUGLYAK L, MARDIS E, ROTIMI CN, SLATKIN M, VALLE D, WHITTEMORE AS, BOEHNKE M, *et al.* Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009; 461(7265): 747-53.
- MARDIS ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008; 9:387-402.
- MARSHALL CR, NOOR A, VINCENT JB, LIONEL AC, FEUK L, SKAUG J, SHAGO M, MOESSNER R, PINTO D, REN Y, THIRUVAHINDRAPDURAM B, FIEBIG A, SCHREIBER S, FRIEDMAN J, KETELAARS CE, VOS YJ, FICICIOGLU C, KIRKPATRICK S, NICOLSON R, SLOMAN L, *et al.* Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet*. 2008; 82(2): 477-88.
- MARTIN PM, YANG X, ROBIN N, LAM E, RABINOWITZ JS, ERDMAN CA, QUINN J, WEISS LA, HAMILTON SP, KWOK PY, MOON RT, CHEYETTE BN. A rare WNT1 missense variant overrepresented in ASD leads to increased Wnt signal pathway activation. *Transl Psychiatry*. 2013; 3: e301.
- MATSUMOTO A, KUWAJIMA M, MIYAKE K, KOJIMA K, NAKASHIMA N, JIMBO EF, KUBOTA T, MOMOI MY, YAMAGATA T. An Xp22.12 microduplication including RPS6KA3 identified in a family with variably affected intellectual and behavioral disabilities. *J Hum Genet*. 2013; 58(11): 755-7.
- MCCRACKEN JT, MCGOUGH J, SHAH B, CRONIN P, HONG D, AMAN MG, ARNOLD LE, LINDSAY R, NASH P, HOLLWAY J, MCDOUGLE CJ, POSEY D, SWIEZY N, KOHN A, SCAHILL L, MARTIN A, KOENIG K, VOLKMAR F, CARROLL D, LANCOR A, *et al.* Risperidone in children with autism and serious behavioral problems. *N Engl J Med*. 2002; 347(5): 314-21.
- MCDOUGLE CJ, CARLEZON WA JR. Neuroinflammation and autism: toward mechanisms and treatments. *Neuropsychopharmacology*. 2013; 38(1): 241-2.
- MELDRUM BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*. 2000; 130(4S Suppl): 1007S-15S.
- MERIENNE K, JACQUOT S, PANNETIER S, ZENIOU M, BANKIER A, GECZ J, MANDEL JL, MULLEY J, SASSONE-CORSI P, HANAUER A. A missense mutation in RPS6KA3 (RSK2) responsible for non-specific mental retardation. *Nat Genet*. 1999; 22(1): 13-4.
- MICHAELSON JJ, SHI Y, GUJRAL M, ZHENG H, MALHOTRA D, JIN X, JIAN M, LIU G, GREER D, BHANDARI A, WU W, COROMINAS R, PEOPLES A, KOREN A, GORE A, KANG S, LIN

Bibliographie

- GN, ESTABILLO J, GADOMSKI T, SINGH B, *et al.* Whole-genome sequencing in autism identifies hot spots for *de novo* germline mutation. *Cell*. 2012; 151(7): 1431-42.
- MONEY J, BOBROW NA, CLARKE FC. Autism and autoimmune disease: a family study. *J Autism Dev Disord*. 1971; 16: 146–160.
- MORAINE C, BONNET-BRILHAULT F, LAUMONNIER F, GOMOT M. Could autism with mental retardation result from digenism and frequent *de novo* mutations? *World J Biol Psychiatry*. 2009; 10(4 Pt 3): 1030-6.
- MORROW EM, YOO SY, FLAVELL SW, KIM TK, LIN Y, HILL RS, MUKADDES NM, BALKHY S, GASCON G, HASHMI A, AL-SAAD S, WARE J, JOSEPH RM, GREENBLATT R, GLEASON D, ERTELT JA, APSE KA, BODELL A, PARTLOW JN, BARRY B, *et al.* Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science*. 2008; 321(5886): 218-23.
- MORTON NE. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet*. 1955; 7(3): 277-318.
- MUÑOS-GIMENO M, GUIDI M, KAGERBAUER B, MARTIN-SANTOS R, NAVINES R, ALONSO P, MENCHON JM, GRATACOS M, ESTIVILL X, ESPINOSA-PARRILLA Y. Allele variants in functional MicroRNA target sites of the neurotrophin-3 receptor gene (NTRK3) as susceptibility factors for anxiety disorders. *Hum Mutat*. 2009; 30(7): 1062-71.
- MULLE JG, DODD AF, MCGRATH JA, WOLYNYEC PS, MITCHELL AA, SHETTY AC, SOBREIRA NL, VALLE D, RUDD MK, SATTEN G, CUTLER DJ, PULVER AE, WARREN ST. Microdeletions of 3q29 confer high risk for schizophrenia. *Am J Hum Genet*. 2010; 87(2): 229-36.
- MULLIGAN KA, CHEYETTE BN. Wnt signaling in vertebrate neural development and function. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012; 7(4): 774-87.
- NAJMABADI H, HU H, GARSHASBI M, ZEMOJTEL T, ABEDINI SS, CHEN W, HOSSEINI M, BEHJATI F, HAAS S, JAMALI P, ZECHA A, MOHSENI M, PÜTTMANN L, VAHID LN, JENSEN C, MOHEB LA, BIENEK M, LARTI F, MUELLER I, WEISSMANN R, *et al.* Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature*. 2011; 478(7367) :57-63.
- NEALE BM, KOU Y, LIU L, MA'AYAN A, SAMOCHA KE, SABO A, LIN CF, STEVENS C, WANG LS, MAKAROV V, POLAK P, YOON S, MAGUIRE J, CRAWFORD EL, CAMPBELL NG, GELLER ET, VALLADARES O, SCHAFFER C, LIU H, ZHAO T, *et al.* Patterns and rates of exonic *de novo* mutations in autism spectrum disorders. *Nature*. 2012; 485(7397): 242-5.

- NG PC, HENIKOFF S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 2001; 11(5): 863-74.
- NG PC, HENIKOFF S. Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Res.* 2002; 12(3): 436-46.
- NG PC, HENIKOFF S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13): 3812-4.
- NG PC, HENIKOFF S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006; 7: 61-80.
- NG PC, LEVY S, HUANG J, STOCKWELL TB, WALENZ BP, LI K, AXELROD N, BUSAM DA, STRAUSBERG RL, VENTER JC. Genetic variation in an individual human exome. *PLoS Genet.* 2008; 4(8): e1000160.
- NGUYEN LS, WILKINSON MF, GECZ J. Nonsense-mediated decay mRNA decay: inter-individual variability and human diseases. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014; 46: 175-186.
- O'ROAK BJ, DERIZIOTIS P, LEE C, VIVES L, SCHWARTZ JJ, GIRIRAJAN S, KARAKOC E, MACKENZIE AP, NG SB, BAKER C, RIEDER MJ, NICKERSON DA, BERNIER R, FISHER SE, SHENDURE J, EICHLER EE. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe *de novo* mutations. *Nat Genet.* 2011; 43(6): 585-9.
- O'ROAK BJ, VIVES L, GIRIRAJAN S, KARAKOC E, KRUMM N, COE BP, LEVY R, KO A, LEE C, SMITH JD, TURNER EH, STANAWAY IB, VERNOT B, MALIG M, BAKER C, REILLY B, AKEY JM, BORENSTEIN E, RIEDER MJ, NICKERSON DA, *et al.* Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of *de novo* mutations. *Nature.* 2012; 485(7397): 246-50.
- OHNISHI T, MATSUDA H, HASHIMOTO T, KUNIHIRO T, NISHIKAWA M, UEMA T, SASAKI M. Abnormal regional cerebral blood flow in childhood autism. *Brain.* 2000; 123 (Pt 9): 1838-1844
- OHTSUKI T, SAKURAI K, DOU H, TORU M, YAMAKAWA-KOBAYASHI K, ARINAMI T. Mutation analysis of the NMDAR2B (GRIN2B) gene in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2001; 6(2): 211-6.
- OLDE LOOHUIS NF, KOS A, MARTENS GJ, VAN BOKHOVEN H, NADIF KASRI N, ASCHRAFI A. MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 69(1):89-102.
- ONORE C, CAREAGA M, ASHWOOD P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain Behav Immun.* 2012; 26(3): 383-92.

Bibliographie

- PACIORKOWSKI AR, KEPPLER-NOREUIL K, ROBINSON L, SULLIVAN C, SAJAN S, CHRISTIAN SL, BUKSHUN P, GABRIEL SB, GLEESON JG, SHERR EH, DOBYNS WB. Deletion 16p13.11 uncovers NDE1 mutations on the non-deleted homolog and extends the spectrum of severe microcephaly to include fetal brain disruption. *Am J Med Genet A*. 2013; 161A(7): 1523-30.
- PALMEN SJ, VAN ENGELAND H, HOF PR, SCHMITZ C. Neuropathological findings in autism. *Brain*. 2004; 127(Pt 12): 2572-83.
- PEREA G, NAVARRETE M, ARAQUE A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*. 2009; 32(8): 421-31.
- PETER D, FINN JP, KLISAK I, LIU Y, KOJIS T, HEINZMANN C, ROGHANI A, SPARKES RS, EDWARDS RH. Chromosomal localization of the human vesicular amine transporter genes. *Genomics*. 1993; 18(3): 720-3.
- PETERS SU, BEAUDET AL, MADDURI N, BACINO CA. Autism in Angelman syndrome: implications for autism research. *Clin Genet*. 2004; 66(6): 530-6
- PINHEIRO AP, BULIK CM, THORNTON LM, SULLIVAN PF, ROOT TL, BLOSS CS, BERRETTINI WH, SCHORK NJ, KAYE WH, BERGEN AW, MAGISTRETTI P, BRANDT H, CRAWFORD S, CROW S, FICHTER MM, GOLDMAN D, HALMI KA, JOHNSON C, KAPLAN AS, KEEL PK, *et al*. Association study of 182 candidate genes in anorexia nervosa. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010; 153B(5): 1070–80.
- PINKEL D, SEGRAVES R, SUDAR D, CLARK S, POOLE I, KOWBEL D, COLLINS C, KUO WL, CHEN C, ZHAI Y, DAIRKEE SH, LJUNG BM, GRAY JW, ALBERTSON DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998; 20(2): 207-11.
- PINTO D, PAGNAMENTA AT, KLEI L, ANNEY R, MERICO D, REGAN R, CONROY J, MAGALHAES TR, CORREIA C, ABRAHAMS BS, ALMEIDA J, BACCHELLI E, BADER GD, BAILEY AJ, BAIRD G, BATTAGLIA A, BERNEY T, BOLSHAKOVA N, BÖLTE S, BOLTON PF, *et al*. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*. 2010; 466(7304): 368-72.
- PINTO D, DARVISHI K, SHI X, RAJAN D, RIGLER D, FITZGERALD T, LIONEL AC, THIRUVAHINDRAPURAM B, MACDONALD JR, MILLS R, PRASAD A, NOONAN K, GRIBBLE S, PRIGMORE E, DONAHOE PK, SMITH RS, PARK JH, HURLES ME, CARTER NP, LEE C, *et al*. Comprehensive assessment of array-based platforms and calling algorithms for detection of copy number variants. *Nat Biotechnol*. 2011; 29(6): 512-20.

- PINTO D, DELABY E, MERICO D, BARBOSA M, MERIKANGAS A, KLEI L, THIRUVAHINDRAPURAM B, XU X, ZIMAN R, WANG Z, VORSTMAN JA, THOMPSON A, REGAN R, PILORGE M, PELLECCIA G, PAGNAMENTA AT, OLIVEIRA B, MARSHALL CR, MAGALHAES TR, LOWE JK, *et al.* Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet.* 2014; 94(5): 677-94.
- PITON A, GAUTHIER J, HAMDAN FF, LAFRENIERE RG, YANG Y, HENRION E, LAURENT S, NOREAU A, THIBODEAU P, KAREMERA L, SPIEGELMAN D, KUKU F, DUGUAY J, DESTROISMAISONS L, JOLIVET P, COTE M, LACHAPPELLE K, DIALLO O, RAYMOND A, MARINEAU C, *et al.* Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2011; 16(8):867-80.
- POPP MW, MAQUAT LE. Organizing principles of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Ann Rev Genet.* 2013; 47:139-165.
- POTOCKI L, CHEN KS, PARK SS, OSTERHOLM DE, WITHERS MA, KIMONIS V, SUMMERS AM, MESCHINO WS, ANYANE-YEBOA K, KASHORK CD, SHAFFER LG, LUPSKI JR. Molecular mechanism for duplication 17p11.2- the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion. *Nat Genet.* 2000; 24(1): 84-7.
- POTOCKI L, BI W, TREADWELL-DEERING D, CARVALHO CM, EIFERT A, FRIEDMAN EM, GLAZE D, KRULL K, LEE JA, LEWIS RA, MENDOZA-LONDONO R, ROBBINS-FURMAN P, SHAW C, SHI X, WEISSENBERGER G, WITHERS M, YATSENKO SA, ZACKAI EH, STANKIEWICZ P, LUPSKI JR. Characterization of Potocki-Lupski syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. *Am J Hum Genet.* 2007; 80(4): 633-49.
- POULTNEY CS, GOLDBERG AP, DRAPEAU E, KOU Y, HARONY-NICOLAS H, KAJIWARA Y, DE RUBEIS S, DURAND S, STEVENS C, REHNSTRÖM K, PALOTIE A, DALY MJ, MA'AYAN A, FROMER M, BUXBAUM JD. Identification of small exonic CNV from whole-exome sequence data and application to autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.* 2013; 93(4): 607-19.
- PRADO, C, *Le coût économique et social de l'autisme.* Les éditions des Journaux Officiels, France 2012.
- PRASAD A, MERICO D, THIRUVAHINDRAPURAM B, WEI J, LIONEL AC, SATO D, RICKABY J, LU C, SZATMARI P, ROBERTS W, FERNANDEZ BA, MARSHALL CR, HATCHWELL E, EIS PS, SCHERER SW. A discovery resource of rare copy number variations in individuals with autism spectrum disorder. *G3 (Bethesda).* 2012; 2(12): 1665-85.

Bibliographie

- PRONTERA P, OTTAVIANI V, TOCCACELI D, ROGAIA D, ARDISIA C, ROMANI R, STANGONI G, PIERINI A, DONTI E. Recurrent ~100 Kb microdeletion in the chromosomal region 14q11.2, involving CHD8 gene, is associated with autism and macrocephaly. *Am J Med Genet A*. 2014 Sep 24.
- QUINTERO-RIVERA F, SHARIFI-HANNAUER P, MARTINEZ-AGOSTO JA. Autistic and psychiatric findings associated with the 3q29 microdeletion syndrome: case report and review. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A(10): 2459-67.
- RAHMAN A, FRIEDMAN DS, GOLDSTEIN LS. Two kinesin light chain genes in mice. Identification and characterization of the encoded proteins. *J Biol Chem*. 1998; 273(25): 15395-403.
- RAMAKERS GJ, WOLFER D, ROSENBERGER G, KUCHENBECKER K, KREIENKAMP HJ, PRANGE-KIEL J, RUNE G, RICHTER K, LANGNAESE K, MASNEUF S, BÖSL MR, FISCHER KD, KRUGERS HJ, LIPP HP, VAN GALEN E, KUTSCHE K. Dysregulation of Rho GTPases in the α Pix/Arhgef6 mouse model of X-linked intellectual disability is paralleled by impaired structural and synaptic plasticity and cognitive deficits. *Hum Mol Genet*. 2012; 21(2):268-86.
- RAMALINGAM A, ZHOU XG, FIEDLER SD, BRAWNER SJ, JOYCE JM, LIU HY, YU S. 16p13.11 duplication is a risk factor for a wide spectrum of neuropsychiatric disorders. *J Hum Genet*. 2011; 56(7): 541-4.
- RANTA S, ZHANG Y, ROSS B, TAKKUNEN E, HIRVASNIEMI A, DE LA CHAPELLE A, GILLIAM TC, LEHESJOKI AE. Positional cloning and characterisation of the human DLGAP2 gene and its exclusion in progressive epilepsy with mental retardation. *Eur J Hum Genet*. 2000; 8(5): 381-4.
- REES MI, HARVEY K, WARD H, WHITE JH, EVANS L, DUGUID IC, HSU CC, COLEMAN SL, MILLER J, BAER K, WALDVOGEL HJ, GIBBON F, SMART TG, OWEN MJ, HARVEY RJ, SNELL RG. Isoform heterogeneity of the human gephyrin gene (GPHN), binding domains to the glycine receptor, and mutation analysis in hyperekplexia. *J Biol Chem*. 2003; 278(27): 24688-96.
- REISSNER C, STAHN J, BREUER D, KLOSE M, POHLENTZ G, MORMANN M, MISSLER M. Dystroglycan Binding to α -Neurexin Competes with Neurexophilin-1 and Neuroligin in the Brain. *J Biol Chem*. 2014 Aug 25.
- REN CM, LIANG Y, WEI F, ZHANG YN, ZHONG SQ, GU H, DONG XS, HUANG YY, KE H, SON XM, TANG D, CHEN Z. Balanced translocation t(3;18)(p13;q22.3) and points

- mutation in the ZNF407 gene detected in patients with both moderate non-syndromic intellectual disability and autism. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1832(3): 431-8.
- RENDLE-SHORT J. Infantile autism in Australia. *Med J Aust*. 1969; 2(5): 245-9.
- RICHARDS M, IJIMA Y, KONDO H, SHIZUNO T, HORI H, ARIMA K, SAITOH O, KUNUGI H. Association study of the vesicular monoamine transporter 1 (VMAT1) gene with schizophrenia in a Japanese population. *Behav Brain Funct*. 2006; 2: 39.
- RISCH N, MERIKANGAS K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996; 273(5281): 1516-7.
- ROGER G, *Neuropsychologie*, Masson, 2003
- ROJAS, D. C., PETERSON, E., WINTERROWD, E., REITE, M. L., ROGERS, S. J., AND TREGELLAS, J. R. (2006). Regional gray matter volumetric changes in autism associated with social and repetitive behavior symptoms. *BMC Psychiatry*. 2006; 6: 56.
- RONEMUS M, IOSSIFOV I, LEVY D, WIGLER M. The role of de novo mutations in the genetics of autism spectrum disorders. *Nat Rev Genet*. 2014; 15(2): 133-41.
- ROSENHALL U, NORDIN V, SANDSTRÖM M, AHLSEN G, GILLBERG C. Autism and hearing loss. *J Autism Dev Disord*. 1999; 29(5): 349-57.
- ROZEN S, SKALETSKY H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000; 132: 365-86.
- RUTTER, M. Diagnosis and definition of childhood autism. *J Autism Child Schizophr*. 1978; 8(2): 139-61
- SANDERS SJ, ERCAN-SENCICEK AG, HUS V, LUO R, MURTHA MT, MORENO-DE-LUCA D, CHU SH, MOREAU MP, GUPTA AR, THOMSON SA, MASON CE, BILGUVAR K, CELESTINO-SOPER PB, CHOI M, CRAWFORD EL, DAVIS L, WRIGHT NR, DHODAPKAR RM, DiCOLA M, DiLULLO NM, *et al*. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron*. 2011; 70(5): 863-85.
- SANDERS SJ, MURTHA MT, GUPTA AR, MURDOCH JD, RAUBESON MJ, WILLSEY AJ, ERCAN-SENCICEK AG, DiLULLO NM, PARIKSHAK NN, STEIN JL, WALKER MF, OBER GT, TERAN NA, SONG Y, EL-FISHAWY P, MURTHA RC, CHOI M, OVERTON JD, BJORNSON RD, CARRIERO NJ, *et al*. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*. 2012; 485(7397): 237-41.
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(12): 5463-7.

Bibliographie

- SANS N, RACCA C, PETRALIA RS, WANG YX, MCCALLUM J, WENTHOLD RJ. Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway. *J Neurosci*. 2001; 21(19): 7506-16.
- SANZ-CLEMENTE A, NICOLL RA, ROCHE KW. Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neuroscientist*. 2013; 19(1): 62-75.
- SATO D, LIONEL AC, LEBLOND CS, PRASAD A, PINTO D, WALKER S, O'CONNOR I, RUSSELL C, DRMIC IE, HAMDAN FF, MICHAUD JL, ENDRIS V, ROETH R, DELORME R, HUGUET G, LEBOYER M, RASTAM M, GILLBERG C, LATHROP M, STAVROPOULOS DJ, *et al*. SHANK1 Deletions in Males with Autism Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet*. 2012; 90(5): 879-87.
- SAWICKA K, ZUKIN RS. Dysregulation of mTOR signaling in neuropsychiatric disorders: therapeutic implications. *Neuropsychopharmacology*. 2012; 37(1): 305-6.
- SCHAEFER GB, MENDELSON NJ; Professional Practice and Guidelines Committee. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genet Med*. 2013; 15(5): 399-407. Erratum in: *Genet Med*. 2013; 15(8): 669.
- SCHIZOPHRENIA PSYCHIATRIC GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY (GWAS) CONSORTIUM. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet*. 2011; 43(10): 969-76.
- SCHOPLER E, REICHLER RJ., DEVELLIS RF., DALY K., Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *J Autism Dev Disord*. 1980; 10(1): 91-103.
- SCHWARZ JM, COOPER DN, SCHUELKE M, SEELOW D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014; 11(4): 361-2.
- SEBAT J, LAKSHMI B, TROGE J, ALEXANDER J, YOUNG J, LUNDIN P, MÄNÉR S, MASSA H, WALKER M, CHI M, NAVIN N, LUCITO R, HEALY J, HICKS J, YE K, REINER A, GILLIAM TC, TRASK B, PATTERSON N, ZETTERBERG A, *et al*. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*. 2004; 305(5683): 525-8.
- SEBAT J, LAKSHMI B, MALHOTRA D, TROGE J, LESE-MARTIN C, WALSH T, YAMROM B, YOON S, KRASNITZ A, KENDALL J, LEOTTA A, PAI D, ZHANG R, LEE YH, HICKS J, SPENCE SJ, LEE AT, PUURA K, LEHTIMÄKI T, LEDBETTER D, *et al*. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*. 2007; 316(5823): 445-9.

- SEBAT J, LEVY DL, MCCARTHY SE. Rare structural variants in schizophrenia: one disorder, multiple mutations; one mutation, multiple disorders. *Trends Genet.* 2009; 25(12): 528-35.
- SEDLACEK Z, MUNSTERMANN E, MINCHEVA A, LICHTER P, POUSTKA A. The human rab GDI beta gene with long retroposon-rich introns maps to 10p15 and its pseudogene to 7p11-p13. *Mamm Genome.* 1998; 9(1): 78-80.
- SHAFFER LG, SCHULTZ RA, BALLIF BC. The use of new technologies in the detection of balanced translocations in hematologic disorders. *Curr Opin Genet Dev.* 2012; 22(3): 264-71.
- SHARMA A, HOFFER CA, TAKAYASU Y, MIYAWAKI T, MCBRIDE SM, KLANN E, ZUKIN RS. Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *J Neurosci.* 2010; 30(2): 694-702.
- SHARP AJ, LOCKE DP, MCGRATH SD, CHENG Z, BAILEY JA, VALLENTE RU, PERTZ LM, CLARK RA, SCHWARTZ S, SEGRAVES R, OSEROFF VV, ALBERTSON DG, PINKEL D, EICHLER EE. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet.* 2005; 77(1): 78-88.
- SHCHELOCHKOV OA, CHEUNG SW, LUPSKI JR. Genomic and clinical characteristics of microduplications in chromosome 17. *Am J Med Genet A.* 2010; 152A(5): 1101-10.
- SHERRY ST, WARD M, SIROTKIN K. dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Res.* 1999; 9(8): 677-9.
- SHI L, ZHANG X, GOLHAR R, OTIENO FG, HE M, HOU C, KIM C, KEATING B, LYON GJ, WANG K, HAKONARSON H. Whole-genome sequencing in an autism multiplex family. *Mol Autism.* 2013; 4(1): 8.
- SILVERMAN JL, OLIVER CF, KARRAS MN, GASTRELL PT, CRAWLEY JN. AMPAKINE enhancement of social interaction in the BTBR mouse model of autism. *Neuropharmacology.* 2013; 64: 268-82.
- SLEEMAN MW, ANDERSON KD, LAMBERT PD, YANCOPOULOS GD, WIEGAND SJ. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv.* 2000; 74(2-3): 265-72.
- SMITH KR, KOPEIKINA KJ, FAWCETT-PATEL JM, LEADERBRAND K, GAO R, SCHÜRMAN B, MYCZEK K, RADULOVIC J, SWANSON GT, PENZES P. Psychiatric Risk Factor ANK3/Ankyrin-G Nanodomains Regulate the Structure and Function of Glutamatergic Synapses. *Neuron.* 2014; 84(2): 399-415.

Bibliographie

- SMRT R.D., ZHAO X. Epigenetic regulation of neuronal dendrite and dendritic spine development. *Front. Biol.* 2010; 5: 304-323.
- SPIELMAN RS, MCGINNIS RE, EWENS WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet.* 1993; 52(3): 506-16.
- SPIELMANN M, KLOPOCKI E. CNVs of noncoding cis-regulatory elements in human disease. *Curr Opin Genet Dev.* 2013; 23(3): 249-56.
- SPOOREN W, LINDEMANN L, GHOSH A, SANTARELLI L. Synapse dysfunction in autism: a molecular medicine approach to drug discovery in neurodevelopmental disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2012; 33(12): 669-84.
- SRIVASTAVA S, COHEN JS, VERNON H, BARAÑANO K, MCCLELLAN R, JAMAL L, NAIDU S, FATEMI A. Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Ann Neurol.* 2014 Aug 18.
- STANKIEWICZ P, LUPSKI JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med.* 2010; 61: 437-55.
- STEFANSSON H, MEYER-LINDENBERG A, STEINBERG S, MAGNUSDOTTIR B, MORGEN K, ARNARSDOTTIR S, BJORNSDOTTIR G, WALTERS GB, JONSDOTTIR GA, DOYLE OM, TOST H, GRIMM O, KRISTJANSDOTTIR S, SNORRASON H, DAVIDSDOTTIR SR, GUDMUNDSSON LJ, JONSSON GF, STEFANSDOTTIR B, HELGADOTTIR I, HARALDSSON M, *et al.* CNVs conferring risk of autism or schizophrenia affect cognition in controls. *Nature.* 2014; 505(7483): 361-6.
- STEVENSON RE, SCHROER RJ, SKINNER C, FENDER D, SIMENSEN RJ. Autism and macrocephaly. *Lancet.* 1997; 349(9067): 1744-5.
- STONER R, CHOW ML, BOYLE MP, SUNKIN SM, MOUTON PR, ROY S, WYNshaw-BORIS A, COLAMARINO SA, LEIN ES, COURCHESNE E. Patches of disorganization in the neocortex of children with autism. *N Engl J Med.* 2014; 370(13): 1209-19.
- STOODLEY CJ. Distinct regions of the cerebellum show gray matter decreases in autism, ADHD, and developmental dyslexia. *Front Syst Neurosci.* 2014; 8: 92.
- SWANSON CJ, BURES M, JOHNSON MP, LINDEN AM, MONN JA, SCHOEPP DD. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(2): 131-44.
- TARABEUX J, KEBIR O, GAUTHIER J, HAMDAN FF, XIONG L, PITON A, SPIEGELMAN D, HENRION É, MILLET B; S2D TEAM, FATHALLI F, JOOBER R, RAPOPORT JL, DELISI LE, FOMBONNE É, MOTTRON L, FORGET-DUBOIS N, BOIVIN M, MICHAUD JL, DRAPEAU P,

- et al.* Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2011; 1: e55.
- TARPEY PS, RAYMOND FL, NGUYEN LS, RODRIGUEZ J, HACKETT A, VANDELEUR L, SMITH R, SHOUBRIDGE C, EDKINS S, STEVENS C, O'MEARA S, TOFTS C, BARTHORPE S, BUCK G, COLE J, HALLIDAY K, HILLS K, JONES D, MIRONENKO T, PERRY *et al.* Mutations in UPF3B, a member of the nonsense-mediated mRNA decay complex, cause syndromic and nonsyndromic mental retardation. *Nat Genet*. 2007; 39(9):1127-33.
- THIERRY G, BENETEAU C, PICHON O, FLORI E, ISIDOR B, POPELARD F, DELRUE MA, DUBOSCQ-BIDOT L, THURESSON AC, VAN BON BW, CAILLEY D, ROORYCK C, PAUBEL A, METAY C, DUSSER A, PASQUIER L, BERI M, BONNET C, JAILLARD S, DUBOURG C, *et al.* Molecular characterization of 1q44 microdeletion in 11 patients reveals three candidate genes for intellectual disability and seizures. *Am J Med Genet A*. 2012; 158A(7): 1633-40.
- TOMA C, TORRICO B, HERVÁS A, VALDÉS-MAS R, TRISTÁN-NOGUERO A, PADILLO V, MARISTANY M, SALGADO M, ARENAS C, PUENTE XS, BAYÉS M, CORMAND B. Exome sequencing in multiplex autism families suggests a major role for heterozygous truncating mutations. *Mol Psychiatry*. 2014; 19(7): 784-90.
- TORDJMAN S, SOMOGYI E, COULON N, KERMARREC S, COHEN D, BRONSARD G, BONNOT O, WEISMANN-ARCACHE C, BOTBOL M, LAUTH B, GINCHAT V, ROUBERTOUX P, BARBUROTH M, KOVÉSS V, GEOFFRAY MM, XAVIER J. Gene × Environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms. *Front Psychiatry*. 2014; 5: 53.
- TRAYNELIS SF, WOLLMUTH LP, MCBAIN CJ, MENNITI FS, VANCE KM, OGDEN KK, HANSEN KB, YUAN H, MYERS SJ, DINGLEDINE R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*. 2010; 62(3): 405-96.
- TROPEANO M, AHN JW, DOBSON RJ, BREEN G, RUCKER J, DIXIT A, PAL DK, MCGUFFIN P, FARMER A, WHITE PS, ANDRIEUX J, VASSOS E, OGILVIE CM, CURRAN S, COLLIER DA. Male-biased autosomal effect of 16p13.11 copy number variation in neurodevelopmental disorders. *PLoS One*. 2013; 8(4): e61365.
- ULLMANN R, TURNER G, KIRCHHOFF M, CHEN W, TONGE B, ROSENBERG C, FIELD M, VIANNA-MORGANTE AM, CHRISTIE L, KREPISCHI-SANTOS AC, BANNA L, BRERETON AV, HILL A, BISGAARD AM, MÜLLER I, HULTSCHIG C, ERDOGAN F, WIECZOREK G, ROPERS HH. Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. *Hum Mutat*. 2007; 28(7): 674-82.

Bibliographie

- UZUNOVA G, HOLLANDER E, SHEPHERD J. The role of ionotropic glutamate receptors in childhood neurodevelopmental disorders: autism spectrum disorders and fragile x syndrome. *Curr Neuropharmacol*. 2014; 12(1): 71-98.
- VAN BOKHOVEN H. Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet*. 2011; 45:81-104.
- VAN DER AA N, ROOMS L, VANDEWEYER G, VAN DEN ENDE J, REYNIERS E, FICHERA M, ROMANO C, DELLE CHIAIE B, MORTIER G, MENTEN B, DESTREE A, MAYSTADT I, MÄNNIK K, KURG A, REIMAND T, McMULLAN D, OLEY C, BRUETON L, BONGERS EM, VAN BON BW, *et al*. Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur J Med Genet*. 2009; 52(2-3): 94-100.
- VELTMAN JA, BRUNNER HG. Understanding variable expressivity in microdeletion syndromes. *Nat Genet*. 2010; 42(3): 192-3.
- VELTMAN MW, CRAIG EE, BOLTON PF. Autism spectrum disorders in Prader-Willi and Angelman syndromes: a systematic review. *Psychiatr Genet*. 2005; 15(4): 243-54.
- VERHOEVEN JS, DE COCK P, LAGAE L, SUNAERT S. Neuroimaging of autism. *Neuroradiology*; 52: 3-14
- WANG C, YU C, YE F, WEI Z, ZHANG M. Structure of the ZU5-ZU5-UPA-DD tandem of ankyrin-B reveals interaction surfaces necessary for ankyrin function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(13): 4822-7.
- WANG H, DOERING LC. Reversing autism by targeting downstream mTOR signaling. *Front Cell Neurosci*. 2013; 7: 28.
- WANG Z, XU L, ZHU X, CUI W, SUN Y, NISHIJO H, PENG Y, LI R. Demethylation of specific Wnt/ β -catenin pathway genes and its upregulation in rat brain induced by prenatal valproate exposure. *Anat Rec (Hoboken)*. 2010; 293(11): 1947-53.
- WASSINK TH, PIVEN J, VIELAND VJ, HUANG J, SWIDERSKI RE, PIETILA J, BRAUN T, BECK G, FOLSTEIN SE, HAINES JL, SHEFFIELD VC. Evidence supporting WNT2 as an autism susceptibility gene. *Am J Med Genet*. 2001; 105(5): 406-13.
- WHEELWRIGHT S, AUYEUNG B, ALLISON C, BARON-COHEN S. Defining the broader, medium and narrow autism phenotype among parents using the Autism Spectrum Quotient (AQ). *Mol Autism*. 2010; 1(1): 10.
- WING, L. Asperger's syndrome: a clinical account. *Psychol Med*. 1981; 11(1): 115-29.
- WING L, LEEKAM SR, LIBBY SJ, GOULD J, LARCOMBE M. The Diagnostic Interview for Social and Communication Disorders: background, inter-rater reliability and clinical use. *J Child Psychol Psychiatry*. 2002; 43(3): 307-25.

- WILLATT L, COX J, BARBER J, CABANAS ED, COLLINS A, DONNAI D, FITZPATRICK DR, MAHER E, MARTIN H, PARNAU J, PINDAR L, RAMSAY J, SHAW-SMITH C, SISTERMANS EA, TETTENBORN M, TRUMP D, DE VRIES BB, WALKER K, RAYMOND FL. 3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome. *Am J Hum Genet.* 2005; 77(1): 154–60.
- WILLEMSSEN MH, DE LEEUW N, DE BROUWER AP, PFUNDT R, HEHIR-KWA JY, YNTEMA HG, NILLESEN WM, DE VRIES BB, VAN BOKHOVEN H, KLEEFSTRA T. Interpretation of clinical relevance of X-chromosome copy number variations identified in a large cohort of individuals with cognitive disorders and/or congenital anomalies. *Eur J Med Genet.* 2012; 55(11): 586-98.
- WILLIAMS NM, ZAHARIEVA I, MARTIN A, LANGLEY K, MANTRIPRAGADA K, FOSSDAL R, STEFANSSON H, STEFANSSON K, MAGNUSSON P, GUDMUNDSSON OO, GUSTAFSSON O, HOLMANS P, OWEN MJ, O'DONOVAN M, THAPAR A. Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet.* 2010; 376(9750): 1401-8.
- XIAO B, TU JC, WORLEY PF. Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function. *Curr Opin Neurobiol.* 2000; 10(3): 370-4.
- XU LM, LI JR, HUANG Y, ZHAO M, TANG X, WEI L. AutismKB: an evidence-based knowledgebase of autism genetics. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40 (Database issue)
- YAGI H, FURUTANI Y, HAMADA H, SASAKI T, ASAKAWA S, MINOSHIMA S, ICHIDA F, JOO K, KIMURA M, IMAMURA S, KAMATANI N, MOMMA K, TAKAO A, NAKAZAWA M, SHIMIZU N, MATSUOKA R. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet.* 2003; 362(9393): 1 366-73.
- YASUNAGA M, IPSARO JJ, MONDRAGON A. Structurally similar but functionally diverse ZU5 domains in human erythrocyte ankyrin. *J Mol Biol.* 2012; 417(4): 336-50.
- YU TW, CHAHROUR MH, COULTER ME, JIRALERSPONG S, OKAMURA-IKEDA K, ATAMAN B, SCHMITZ-ABE K, HARMIN DA, ADLI M, MALIK AN, D'GAMA AM, LIM ET, SANDERS SJ, MOCHIDA GH, PARTLOW JN, SUNU CM, FELIE JM, RODRIGUEZ J, NASIR RH, WARE J, *et al.* Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron.* 2013; 77(2): 259-73.
- ZAFEIRIOU DI, VERVERI A, VARGIAMI E. Childhood autism and associated comorbidities. *Brain Dev.* 2007; 29(5): 257-72.
- ZHUBI A, COOK EH, GUIDOTTI A, GRAYSON DR. Epigenetic mechanisms in autism spectrum disorder. *Int Rev Neurobiol.* 2014; 115: 203-44.

Bibliographie

- ZIATS MN, RENNERT OM. Expression profiling of autism candidate genes during human brain development implicates central immune signaling pathways. *PLoS One*. 2011; 6(9): e24691.
- ZILBOVICIUS M, BODDAERT N, BELIN P, POLINE JB, REMY P, MANGIN JF, THIVARD L, BARTHELEMY C, SAMSON Y. Temporal lobe dysfunction in childhood autism: a PET study. Positron emission tomography. *Am J Psychiatry*. 2000; 157: 1988-1993

Annexes

Annexe 1 : Protocole d'analyse ADM-2

Analysis Settings	
Design	: 021529_20111015
Aberration Algorithm	: ADM-2
Fuzzy Zero	: OFF
GC Correction	: ON
Centralization (legacy)	: OFF
SNP Copy Number	: OFF
Combine Replicates (Intra Array)	: ON
Metric Set Filters	: NONE
Feature Level Filters	: gIsSaturated = true OR rlsSaturated = true OR gIsFeatNonUnifOL = true OR rlsFeatNonUnifOL = true OR LogRatio = 0; Include matching values=false
Genomic Boundary	: OFF
Template Name	: Default Cyto Report Template - CGH
Genome	: hg19
Threshold	: 6.0
Nesting Level	: OFF
Window Size	: 2Kb
Diploid Peak Centralization	: ON
LOH	: OFF
Array Level Filters	: NONE
Aberration Filters	: minProbes = 3 AND minAvgAbsLogRatio = 0.25 AND maxAberrations = 100000 AND percentPenetrance = 0
Design Level Filters	: Homology = 0 OR IsPseudoautosomal = 1; Include matching values=true
Show Flat Intervals	: false

Annexe 2 : Liste des amorces utilisées en qPCR

Gène	Patients	Primer	Taille (pb)	Hybridation-Elongation	
				Tm (°C)	Temps (s)
<i>AK1</i>	RAF09009AB	GCAAGAAGCTGTCGGAAATC CACCCACTCAGGGCTACTGT	103	62	10
<i>AKR1C2</i>	BAF08012FL	CTCCCCAGGTTCCCTAAAAG CACACTGCCATCTGCAATCT	147	62	10
<i>ANKRD24</i>	TAF32031LP	CATGAAGAGTGAGCGACACG ATGCCTCCCTGACTGAGTGT	186	62	10
<i>ANKRD35</i>	TAF24022LB	ATGGAGAGCAGAGCCTGAAG AACAACTTTCCTCCGCTCCT	103	62	10
<i>ANKRD56</i>	BAF18026BL / BAF18027NL	CCAGGAGGCACTACTGGACT GAGTTGACGAAGCCCTTGAA	153	63	5
<i>ARHGEF17</i>	BAF11017GL	AGCTTTACCGCAGCGTCTC AGACGCCAGCTTGGACAC	167	63	5
<i>ARNTL2</i>	BAF15022ML	CTTGTGGCCATTGGAAGATT TTTTCCATTCACTGCAAACC	105	62	10
<i>ASCL3</i>	TAF14014GA / BAF03003BG / BAF17025DA	AGGTCAGGGGACTAGGGAAA AGAGCTTTCCTGGCATTGA	133	62	10
<i>ASCM1</i>	TAF12012DC	CCATGTTGTTTCCAGTGTGC CCTCACAGGTTTCAGGGTGT	160	62	10
<i>ATP2C2</i>	TAF04004NR	GTGTGGACAGCACACAATCC CAGGTTCTCCGTCTGGAAGA	175	62	10
<i>BPTF</i>	RAF14014BR	CCGCTCATA CAGGAGGAAAAG TGCTCTTGACAGAGGTGTGG	111	62	10
<i>CDC62</i>	TAF08008JD	GTCTTTCTGTGCTGGCTTC CCTGTCAGCAGATGAGTGGGA	154	62	10
<i>CHORDC1</i>	BAF17025DA	TCAAATTGAGGCCTTTCGAG TTGCTGAATCTCTGAATGACG	184	62	10
<i>CNTFR</i>	TAF02002CM	CAGGGCTACTGCTCTTTTGG GGATCCCACCCTCTCTTCTC	167	62	10
<i>DIP2C</i>	BAF05007JB	CACCACCTCCTCGTCTCTA GCACAGAAAAGACACCGTGAA	113	62	10
<i>DIS3L2</i>	BAF08012FL	TGGTAAAATTGAGCCTGAAA CCTCTGGTGGAAATTGTCCAT	122	62	10
<i>DPYD</i>	TAF24022LB	CCCCGTAGGTATTCAAAGCA CAATCGAGCCAAAAGGAAG	152	62	10
<i>ERBB2</i>	BAF17025DA	AACCTTTCGGACACAACAG CATCACACCACCTTGGAG	141	62	10
<i>ERCC8</i>	BAF11017GL	TGGTAGCACCAATTGCTGTTT CACTCTTACCTGGAAATTTGACTG	115	62	10
<i>FLNA</i>	BAF17025DA	GCTGCTTTTCCTGGTCTTTG CTAAGGCAGTCAGCCAGGAC	144	62	10
<i>FRMPD4</i>	TAF04004NR	CTCTGAAGGCAAGCTGATCC GCAGAACAGGACACAGGTGA	129	62	10
<i>FUT2</i>	TAF09009DL	CGAGTACGCCACACTGTACG GGCAGGGTGATTCTGAAGAT	105	62	10
<i>GDI2</i>	TAF18017JB	TGCTGAATAAACCCATTGAAGA GCATCAGTGTCACACCAAA	161	62	10
<i>GJB6</i>	BAF06008YB / RAF02002AA	GGGCTCGTCCGAGTGACAG GTCGGGTTTCGGGTGAAG	124	63	10
<i>GLT1D1</i>	RAF12012LL	CGGAAGGGAATACGTGAGAA GCCCTCAATCTTCAGTGCTT	101	60	10
<i>GPHN</i>	TAF32031LP	AATAGAACGGGAAGCACCAG CGGAAACAGTTCACCTAGCA	133	62	10
<i>GRM_Ex8</i>	RAF28028CL	CCTGGCAGTTAAGCACACAA CCATCCCCATACTCCCTTT	138	60	10
<i>GRM5_Ex3</i>	BAF13020LL	ATCAGCGAGAAGCTGTTGGT AAACGATGCTGCCAAAATTC	139	62	10
<i>GTF3C4</i>	TAF06006AF	CCCAGTCAGAATGGAGTGGT CACGGCGATATTACCGTTT	121	62	10
<i>HNRNPU</i>	TAF26025AL	GCGTTGCCTTCAAAATCAGT ATGGCTTTTCCTTCTGACCA	111	62	10
<i>KCNH1</i>	RAF22022EF	TGGATTTTGAAGCTGTCTG TCCCGAATGCAGTAAACCAT	144	62	10

Annexe 2 : Liste des amorces utilisées en qPCR

Gène	Patients	Primer	Taille (pb)	Hybridation- Elongation	
				Tm (°C)	Temps (s)
<i>KLC2</i>	RAF11011ES	CTCCATCCACAGGAAGCCTA CAGTCACAACAGCTGGCATT	115	62	10
<i>LYG2_LYG1</i>	RAF12012LL / BAF16024SJ	GGCTCGGTGACACGTTTTAT CCCCAGAAGCAGAAGCTTGAG	120	62	10
<i>MACROD2</i>	RAF07007QD / TAF11011JF	CAGCAATGCACCTTCAAAGGA GCACTCCTCTTGGTTGAAGC	149	62	10
<i>MNX1</i>	TAF01001RB	GATATCTCCCATCCCAGGT TCATCCGGTGACTTTCCTTC	145	62	10
<i>MYH11</i>	BAF03004HG	GAAAGTTTGCCACCTCATGG TTGTCTGAGCTTCTGTACCACA	104	62	10
<i>NARS2</i>	BAF07010EP	AGAGGAACTGTTCAAGGCTACAA AATTACCTTTTGCCAGGTG	101	62	10
<i>NDE1</i>	BAF03004HG	CAGCAGAAGCAGGAGAAACC CTGAAGCTCCCAGGTGTGTT	152	62	10
<i>NLGN2</i>	TAF35034RL	ATCATGCTGCCTGTGTGGT GTGGGCACGTAGAGGTTGAG	101	62	10
<i>NPHP1</i>	BAF16024SJ	TGAATCTTCTCGGTCAGCA AGAGAAAACCAGGGCCACTT	168	62	10
<i>NXPH1</i>	BAF07009MP	GGAGCAGAGCTTGGTGTTC GAAGGCTGCGTAACCTTGAG	120	62	10
<i>NXPH3</i>	TAF06006AF	CGTCCACTTCCAACAATG CATCCGGCAGTTGAAGATT	139	62	10
<i>PCGF2</i>	TAF38037CM	CGCCTTTCTTCTCCCTTTT ACAAAGAGGTGGTGGTCGAG	115	62	10
<i>PCGF3</i>	TAF38037CM	AGCTCAGCCAAGGATGAAAG TCCCACAGCTTGATCTTCT	104	62	10
<i>PDXDC1</i>	TAF19018EB	CATATGGCTTTGTTGGGACA TCTGCATAGCCATAAGGTGGT	114	62	10
<i>PRAME</i>	RAF17017MR	TTCTCAGGGTTCATTTCAG CTCATCTTCAGCAGGCTCT	101	62	10
<i>PRPH</i>	BAF12019YR	CAGCAACGAGAAGCAGGAG TTCTGTGCTCCAGAAAGC	115	64	10
<i>PRSS1</i>	TAF23021AS	ATCCAGGTGAGACTGGGAGA ACTGCACGTGAGGAGAGCTT	149	62	10
<i>SEMA6D</i>	TAF07007LP	AAGCAGCAGCAGGCATTTAT CCTTAAATTGCTGGCCTCAG	172	62	10
<i>SH2D4A</i>	TAF01001RB	ATGCCCTGTCTATCTGTGCG GTGGCATGCTGTAGCTGGT	103	62	10
<i>SIL1</i>	RAF24024LB	CAGCCTTCCAAGACCTTGT CCAGTCCCTAGGGTTGACAC	187	62	10
<i>SLC18A1</i>	TAF05005MF	CAGCAGACAAAAGCAAATGGA GAAGAATCCACCATGCCTGT	111	62	10
<i>SLC26A5</i>	RAF17017NR	CTCTGTCTCAGCCTCAGT TACCAGATCCAATGTGCAG	109	62	10
<i>SLC30A10</i>	RAF08008EB	AGATTATTGCCACCCTGCAC TTAGCACAGCCCTTGGAGAT	202	62	10
<i>ST8SLA2</i>	RAF19019NR	ACGCATGTTTGGTTTTTACA TTCTTCAGTGGCGAAGTCTT	183	62	10
<i>SYT7</i>	RAF07007QD	AGAGGACGCCTTGAGAAGC CGCCATCACTCACTTGGAC	136	62	10
<i>SYTL2</i>	TAF15015GD	GTGTACCTGGCCTAACCAT CCAGGACTCTGTGGAAGCTC	140	62	10
<i>SYTL3</i>	TAF41040HB	ACAAAACCAAACTGGGATGG GAGCATTGGGATCCTCTTG	112	62	10
<i>TPPP</i>	BAF14021OF	TAGCAACATGGCTGACAAGG ATTCCAGCGACAGCCTCTT	110	62	10
<i>TRPM2</i>	BAF08011JL	TCCACCTGAACATCCTCTCC GCCAGAGGTAGATGGCACAC	111	62	10
<i>TRPX1</i>	TAF09009DL / RAF14014BR	TCAACATCGTGACCTGTGGT GTAGACTCACCAGCATTGGT	123	62	10
<i>UB2T</i>	TAF28027CT	CAGCAATTATGCCCTTTTGG CCTTGCAGACCACTCTCC	132	62	10
<i>USP43</i>	RAF29029VF / BAF08011JL	GTGGTGCAGTGTCTCAGCAA GAAAGTTGGGGCGTGTATTC	149	63	10

Annexe 2 : Liste des amorces utilisées en qPCR

Le choix des couples d'amorces pour les amplifications des gènes étudiés a été réalisé en utilisant le logiciel Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>; Rozen et Skaletsky, 2000), ensuite la spécificité de chaque amplicon a été contrôlée *in silico* par le programme BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Chaque amplicon a une taille comprise entre 100 et 200 pb pour que la technique de qPCR puisse être efficace.

Annexe 3 : Liste des amorces utilisées en séquençage

Gène	Exon	Patient	Séquence	Taille (pb)	Tm (°C)
<i>ACO2</i>	2	RAF25025CV	GGAAGCTGAGGCTGCAGTTA CTCAGAGACCTGGCTGTGGT	519	62
<i>ACO2</i>	3	BAF16023MJ / BAF16024SJ	AGTGGAACGTTGAGGTCCTG AGCAGACCAATCCAAAGAGG	522	62
<i>AKAP9</i>	6	TAF23021AS	TGATTTGGAAGCACCAATTTT GCAGAAATACCCTCAATCAACC	591	60
<i>AKAP9</i>	43	RAF25025CV	CATGCCTCTGGGACAGCTA GGGGGAAAGCAAGCATTATT	553	60
<i>ALDOC</i>	7	TAF27026DC	AACCCAGCTTAGATCCAG TTGATGGCATTGAGGTTGAA	557	60
<i>ARHGEF6</i>	22	RAF30030EB	AGACAGGCAGGAGAATCGACA CAACCAACCAATAACCAAACA	525	58
<i>ARNT</i>	20	TAF12012CD	AATCCCATAGTTCATTGCTTTT TGCTGGTATTACAGGCGTGA	571	60
<i>ATP2B4</i>	6	TAF16024VA	GAGGGAGGGCTTACCCTAAA CAACCTGATTTGGGAGCCTA	369	62
<i>ATP2B4</i>	13	TAF27026DC	TCCCTTTCTTCACTCTCCA TTAGAAACCACCCACCTTCC	572	60
<i>ATP6V1A</i>	9	RAF27027EB	TCAGTGTGTGCCAGAAAAA GGGTGCTTACGCTCCTACAA	500	60
<i>BSN</i>	5	BAF11017GL	GCCACTCAGACTCAGGCTCT CCTCTCACTGGAAGCAAAGG	545	62
<i>CIT</i>	337	TAF06006AF	AAGATTGGCTCTGCAAAGGA GGATCATGATGCCACACAAG	537	60
<i>CNTNAP2</i>	6	TAF31030HC / TAF41040HB	TCCAGGTTAACTCGAATGG AGCATGGTTCCTCTTTCAA	565	60
<i>CNTNAP2</i>	20	TAF30029BQ	AGGTTGCAGTGAGCCAAGAT AACAAAACCAATGGCCAAGC	404	58
<i>DALGAP2</i>	2	TAF02002CM	GCACTACAGCTCGCACTACG GCACTACAGCTCGCACTACG	561	60
<i>DLG1</i>	16	TAF05005MF	CTGCTGTCTGATGCATGGAA TCCAATTCTTGAAGGCACA	572	60
<i>DLG2</i>	4	TAF16024VA	TGCAGGTA AAAAGATAATTTTCA TTGTTGTTGCCATTTGTTGATA	422	58
<i>DLGAP2</i>	2	RAF08008EB	TTTCTGTTTCCCCACAGACC CTTCTGCACGGAGGTACCA	559	62
<i>DLGAP2</i>	9	BAF09013RC	AGTACAGCGCGGTGAGAACT TCCAAGAAAAGTTAGCACA	533	62
<i>DLGAP2</i>	10	RAF24024LB	GAGGTATAGCCGCTTTCT CGGGAAGCTCTTCTGTAGT	505	62
<i>DSG1</i>	15	TAF23021AS	GAGCTGGCATAAGTGGTGGT TCCCTAGCAGTGGTGTTC	340	60
<i>FGD4</i>	11	RAF22022EF	GGGAGGCAGAGCTTACAATG GCCTGCAGTTCCAGTGTCT	311	62
<i>FLNC</i>	11	TAF25023NG	GGTGTGTTTCGAGTGCAGTA CTCTAGCTGCCCTCATGTCC	515	62
<i>FLNC</i>	34	RAF07007QD	AGTCTGCCTTCCTCTTT GTGCCATCCTTGTGTCCCT	524	60
<i>GAP43</i>	3	RAF28028CL	GATGATGTCCAAGCTGCTGA GCACAGCTTCCCTTGATTTC	595	60
<i>GLUL</i>	8	BAF11017GL	GGTCCATACCTGGAGACAA CCTCTATCCCAGCCAAACAA	540	62
<i>GNB2</i>	10	TAF13013MB	AACTGCAACATCTGGGATGC GTGGGGCCATTAGTCCAG	236	60

Annexe 3 : Liste des amorces utilisées en séquençage

Gène	Exon	Patient	Séquence	Taille (pb)	Tm (°C)
<i>GOT2</i>	5	RAF25025CV	TCCAACCCAGGCAGTCTTAC GCCAAGAGACGACTTTGCAG	531	62
<i>GRIK2</i>	8	BAF18027NL	CAGAAAAATTGTAAGTGGAAAAATG CCCTTTATCCTTGAATCCTAAT	530	60
<i>GRIN2A</i>	13	TAF37036JL	GAGCGCACCTACCTGAAAAAC TTGAAGGGCATTGTCTGTG	531	62
<i>HOMER1</i>	3	BAF16023MJ / BAF16024SJ	CGTTGTGGCTTATTGATAATCTT CATTTTCCAAGTGACAGCAGA	422	62
<i>INA</i>	3	BAF10014PM / BAF10015LM	GCACCAGTGGGTAAAGCATT ACTGTGAAGCGTGAGCTGAA	535	60
<i>IRS1</i>	1	BAF18026BL / BAF18027NL	TGGATAATCGGTTCCGAAAG GGCAAGACATGAGAGTGGTG	586	60
<i>KALRN</i>	13	RAF03003LM	TTCTTTTACAATCCTGCTTGA CCTTGGCCAGGAAGCACT	500	58
<i>KCNMA1</i>	11	BAF06008YB	GGCTGGGGTTTTACTTCTCTT TGACCTCAAGGTTGCTGGTAT	439	62
<i>KLC2</i>	13	RAF05005EP	TTGAGACTGTCCCATCCACA CGGAGTTTCCCAAAGGAAC	506	60
<i>LGII</i>	8	RAF29029VF	GGGGACGTGTACATTGCTT CCACATCACTGGACTGGACA	527	60
<i>MAG11</i>	4	BAF09013RC	GCTTTCCTCTCCCATCTGA GGACCATCTCTTCTGCAAGC	571	60
<i>MAG12</i>	5	TAF28027CT	CGAGTGAAAGGAGAGCTCAAA TGACCTTTTTGGCACTGTTG	428	60
<i>MAG12</i>	12	RAF20020LL	GAAAAGTCCACAAGGCAAAAA TTCCCGATTTCTTCAGGAG	536	56
<i>MAP2K3</i>	12	TAF34033SC	TGACAGTCATGGAGGGCCT ACAGAGCCAGGTGGGAGCA	387	62
<i>MYH11</i>	11	TAF09009DL	GGTCCATGGGCTGTAATTTG TTTTAATCCCTGCGCTCTG	519	60
<i>MYH11</i>	12	RAF03003LM	CAATCATTGCCTCTCAGCAA GGTAGTGAGGGATGGAGA	570	60
<i>MYH11</i>	34	TAF35034RL	TCAGGGTTCATCTTGAGTCC CCACACCAACCATGAGAGTG	440	62
<i>MYH6</i>	14	TAF22020KM	GAGGCAGTCATTGTCCTGT AAGTCTCTGGGAAAGGAAGA	522	62
<i>MYH6</i>	18	RAF24024LB	CCAGGGTTTAAGGGCCTAAG TCCCTTCTGCTATCAATG	568	60
<i>MYH6</i>	29	TAF26025AL	TCAGCCCACATGGTGAATAA TCCGTCTCATGACCACTTTG	403	60
<i>MYH9</i>	32	TAF04004NR	GCACGGGACTGTGTATTG GACTTCTCCAGCTCGTGGAC	549	62
<i>MYO5A</i>	10	RAF14014BR	CCCCAGAAGAGATTGCAAAA TGGCAGACCAATTAGCCAAA	500	58
<i>NEFM</i>	3	TAF11011JF	CCAAGGGATCCAGGAAGG AATCCCCCAAAGACTGAGGA	554	60
<i>NLGN4X</i>	5	TAF30029BQ	TCCAGAACTCACATGCCTGA TTGGACACGGAGAAGTCAAA	500	58
<i>NOS1</i>	14	TAF36035AL	GGCTCTGGTGGGATTTAATA TTTGCCAAAGGCTTCTTCTC	522	60
<i>PFKL</i>	13	BAF19028NT	CGTGAATGCTGGTCAGACAC GCCAGGGCTTACCATCT	306	60
<i>PLCB1</i>	20	TAF02002CM	TGGGTGAGGACATAGAACCA GGTTTTCAAGATGGCTTTCAA	515	60
<i>PPP2R1A</i>	4	TAF40039AR	TGAGGAGATGAGCCCATGAT GGCAGAGGTGGGTAAACTGA	528	60

Annexe 3 : Liste des amorces utilisées en séquençage

Gène	Exon	Patient	Séquence	Taille (pb)	Tm (°C)
<i>PRDX1</i>	4	RAF29029VF	ACCTGGCAGCAGAGAAGAAG TTGAAGCCTGAAGGAAATGG	504	60
<i>PRDX6</i>	4	RAF30030EB	TTTATGCCCTCTGTGCTTT TCAGCCATGAGGAAAAATCC	300	60
<i>PRKACB</i>	1	BAF18027NL	TGAATACCTGCAAACAGGA ACCATAACAATGATGAAAGCTG	508	58
<i>PRKCG</i>	3	TAF11011JF	AGCCCATCTCTGGGTTTCT GCAGACCCATCTCAGTCT	538	60
<i>PTPN5</i>	11	TAF11011JF	GCCTTACTTGTCTCCACCA CGAGCCTCACATCTCTCAT	568	62
<i>RAB37</i>	2	BAF12018KR / BAF12019YR	TGTGTGTGCATGGGTGTTCT CCTGCTTGAGGCTAGAGGT	547	60
<i>RALA</i>	2	RAF23023TP	GCCCTTGAGTCATAGGCTTG GCTTTGTTTTAAAGCCTGAGGT	576	60
<i>RPL7</i>	2	BAF14021OF	CTGTAGCATGCCAGAGCAAG CAATTACATCCCCACCAAA	420	60
<i>SHANK1</i>	9	RAF28028CL	AGGGCTAAGGAAAGGGTGAC GCAAGAGATGGTGGGAGAGA	504	62
<i>SHANK2</i>	22	TAF22020KM	GAAGACGTGCTCCATCCCTA GTGTCTCGTCAGCAAAAT	527	60
<i>SIPAIL1</i>	8	BAF13020LL / BAF16024SJ	CGCCAGGAATACCTGAAAGA GGAGAGACTCACCTGCAACC	417	62
<i>SIPAIL1</i>	15	TAF17016RD	TGATGAGAAAGCCAGGAAGG CCACCAACAGACCAACTCCT	527	60
<i>SLITRK2</i>	5	TAF03003PA	ACATCATGGGGCTGAAAGACT TTGCAGGTTTCGGTAATAGG	542	60
<i>SPINK5</i>	21	BAF05007JB	CTGGATTTTGGGGCTATCAA AGGGTCTACCCAGAACTAA	507	60
<i>SPTBN1</i>	16	BAF16023MJ / BAF16024SJ	GCAGCATTAAACCATCACTG GAAGTCGTCCAAGTCCCGTA	504	60
<i>SYNGAP1</i>	8	RAF05005EP	GGGTGCTTACGCTCCTACAA GTTGGCAGGGTTACAGGGTA	538	60
<i>UPF3B</i>	7	TAF34035RL	TTATTTCAGTTGGGGCTACCA TTACACCAACACAAGACGCA	363	62

Le choix des couples d'amorces pour les amplifications des gènes étudiés a été réalisé en utilisant le logiciel Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>; Rozen et Skaletsky, 2000), ensuite la spécificité de chaque amplicon a été contrôlée *in silico* par le programme BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Chaque amplicon a une taille comprise entre 300 et 600 pb avec la mutation au centre de l'amplicon

Annexe 4 : Article publié dans The American Journal of Human Genetics

ARTICLE

ZC4H2 Mutations Are Associated with Arthrogyposis Multiplex Congenita and Intellectual Disability through Impairment of Central and Peripheral Synaptic Plasticity

Hiromi Hirata,^{1,25} Indrajit Nanda,^{2,25} Anne van Riesen,^{3,25} Gai McMichael,^{4,25} Hao Hu,^{5,25} Melanie Hambrock,⁵ Marie-Amélie Papon,^{6,7} Ute Fischer,⁵ Sylviane Marouillat,^{6,7} Can Ding,³ Servane Alirol,^{6,7} Melanie Bienek,⁵ Sabine Preisler-Adams,⁸ Astrid Grimme,⁵ Dominik Seelow,³ Richard Webster,⁹ Eric Haan,^{10,11} Alastair MacLennan,⁴ Werner Stenzel,¹² Tzu Ying Yap,¹¹ Alison Gardner,¹³ Lam Son Nguyen,¹¹ Marie Shaw,¹¹ Nicolas Lebrun,^{14,15} Stefan A. Haas,¹⁶ Wolfram Kress,² Thomas Haaf,² Elke Schellenberger,¹⁷ Jamel Chelly,^{14,15} Géraldine Viot,¹⁸ Lisa G. Shaffer,^{19,26} Jill A. Rosenfeld,¹⁹ Nancy Kramer,²⁰ Rena Falk,²¹ Dima El-Khechen,²² Luis F. Escobar,²² Raoul Hennekam,²³ Peter Wieacker,⁸ Christoph Hübner,³ Hans-Hilger Ropers,⁵ Jozef Gecz,^{11,13} Markus Schuelke,^{3,*} Frédéric Laumonier,^{6,7,24} and Vera M. Kalscheuer^{5,*}

Arthrogyposis multiplex congenita (AMC) is caused by heterogeneous pathologies leading to multiple antenatal joint contractures through fetal akinesia. Understanding the pathophysiology of this disorder is important for clinical care of the affected individuals and genetic counseling of the families. We thus aimed to establish the genetic basis of an AMC subtype that is associated with multiple dysmorphic features and intellectual disability (ID). We used haplotype analysis, next-generation sequencing, array comparative genomic hybridization, and chromosome breakpoint mapping to identify the pathogenic mutations in families and simplex cases. Suspected disease variants were verified by cosegregation analysis. We identified disease-causing mutations in the zinc-finger gene *ZC4H2* in four families affected by X-linked AMC plus ID and one family affected by cerebral palsy. Several heterozygous females were also affected, but to a lesser degree. Furthermore, we found two *ZC4H2* deletions and one rearrangement in two female and one male unrelated simplex cases, respectively. In mouse primary hippocampal neurons, transiently produced ZC4H2 localized to the postsynaptic compartment of excitatory synapses, and the altered protein influenced dendritic spine density. In zebrafish, antisense-morpholino-mediated *zc4h2* knockdown caused abnormal swimming and impaired α -motoneuron development. All missense mutations identified herein failed to rescue the swimming defect of zebrafish morphants. We conclude that *ZC4H2* point mutations, rearrangements, and small deletions cause a clinically variable broad-spectrum neurodevelopmental disorder of the central and peripheral nervous systems in both familial and simplex cases of both sexes. Our results highlight the importance of *ZC4H2* for genetic testing of individuals presenting with ID plus muscle weakness and minor or major forms of AMC.

Introduction

Arthrogyposis multiplex congenita (AMC) is a heterogeneous group of disorders with an incidence of 1 in 12,000 live births, symmetrical gender distribution, and a perinatal mortality of 32%.¹ It is characterized by congenital joint contractures and is often associated with

decreased fetal movements, so-called fetal akinesia.^{2–4} AMC is seen in a variety of developmental defects of the musculoskeletal and nervous systems, in connective-tissue disorders, and in chromosomopathies.¹ In AMC-affected children, who show abnormal results on neurological examination, fetal akinesia might result from abnormalities of either the central or the peripheral

¹Center for Frontier Research, National Institute of Genetics, Precursory Research for Embryonic Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, Mishima 411-8540, Japan; ²Institute of Human Genetics, University of Würzburg, Biocenter, 97047 Würzburg, Germany; ³Department of Neuro-pediatrics and NeuroCure Clinical Research Center, Charité Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany; ⁴Robinson Institute, The University of Adelaide, Adelaide, SA 5000, Australia; ⁵Department of Human Molecular Genetics, Max Planck Institute for Molecular Genetics, 14195 Berlin, Germany; ⁶Université François-Rabelais, 37032 Tours, France; ⁷Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 930, 37032 Tours, France; ⁸Institute of Human Genetics, Westfälische Wilhelms Universität Münster, 48149 Münster, Germany; ⁹The Department of Neurology and Neurosurgery, The Children's Hospital at Westmead, Sydney, NSW 2145, Australia; ¹⁰South Australian Clinical Genetics Service, SA Pathology, Adelaide, SA 5000, Australia; ¹¹School of Paediatrics and Reproductive Health, The University of Adelaide, Adelaide, SA 5000, Australia; ¹²Institute of Neuropathology, Charité Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany; ¹³Neurogenetics, SA Pathology, Adelaide, SA 5000, Australia; ¹⁴University Paris Descartes, 75006 Paris, France; ¹⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1016, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 8104, Institut Cochin, 75014 Paris, France; ¹⁶Department of Computational Biology, Max Planck Institute for Molecular Genetics, 14195 Berlin, Germany; ¹⁷Kinderklinik am Mönchberg, Kinderfachabteilung der Missionsärztlichen Klinik Würzburg, 97067 Würzburg, Germany; ¹⁸Department of Gynecology-Obstetrics, Cochin Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 75014 Paris, France; ¹⁹Signature Genomic Laboratories, PerkinElmer, Inc., Spokane, WA 99207, USA; ²⁰Medical Genetics Institute, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA 90048, USA; ²¹Medical Genetics Institute and Department of Pathology and Laboratory Medicine, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA 90048, USA; ²²Medical Genetics and Neurodevelopmental Center, Peyton Manning St. Vincent Children's Hospital, Indianapolis, IN 46260, USA; ²³Department of Pediatrics and Clinical Genetics, Academic Medical Center, 1105 AZ Amsterdam, the Netherlands; ²⁴Department of Medical Genetics, Centre Hospitalier Régional Universitaire, 37044 Tours, France

²⁵These authors contributed equally to this work

²⁶Current address: Paw Print Genetics, Genetic Veterinary Sciences, Inc., Spokane, WA 99202, USA

*Correspondence: kalscheu@molgen.mpg.de (V.M.K.); for clinical information, markus.schuelke@charite.de (M.S.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.03.021>. ©2013 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

nervous system, the muscle, or the neuromuscular endplate.⁵ These conditions comprise antenatal spinal muscular atrophy,⁴ hypomyelinating peripheral neuropathies,⁶ congenital myasthenia caused by either transplacental antibodies against the acetylcholine receptor² or mutations in genes encoding components of the neuromuscular endplate,⁷ congenital myopathies,³ and myotonic dystrophy.⁸ Inheritance of AMC can be autosomal dominant³ or recessive,¹ but rare X-linked cases have been described as well.^{9–12}

Intellectual disability (ID) is a complex disorder that affects 1%–3% of the general population. It is characterized by significant limitations of intellectual functioning, adaptive behavior, or daily living skills with an onset before 18 years of age. Over the past decade, many ID-associated genes have been identified by chromosome breakpoint mapping, candidate-gene approaches, and whole-genome array-based copy-number analysis, the latter of which allows the detection of small deletions and duplications. More recently, massively parallel sequencing has led to the identification of many new genetic defects in familial and simplex cases, further emphasizing the vast genetic heterogeneity of ID.^{13–15} Similarly, X-linked ID (XLID), which arises from mutations in genes on the X chromosome and accounts for about 10%–12% of the ID seen in males,¹⁶ is a genetically heterogeneous disorder for which more than 92 associated genes have been described. Despite the large number of known mutations in genes implicated in XLID, many families assumed to be affected by XLID on the basis of linkage studies or pedigree structure still do not have a molecular diagnosis.

Our aim was to identify pathogenic mutations in families and simplex cases with the combination of AMC plus XLID and to functionally validate the pathogenic nature of the identified DNA variation in model systems. We identified disease-causing mutations in the zinc-finger gene *ZC4H2* in five families and three unrelated simplex cases (of both sexes) with this phenotype. In mouse primary neurons, *ZC4H2* localized to the postsynaptic compartment of excitatory synapses, and the DNA variation identified in the affected individuals influenced dendritic spine density. In zebrafish, *zc4h2* knockdown caused abnormal swimming and impaired α -motoneuron development, which could not be rescued by altered proteins containing the pathogenic substitutions.

Subjects and Methods

Subjects

Individuals were recruited through neuropediatric and clinical genetics outpatient clinics and the EUROMRX consortium and its associated groups. The clinical characteristics of the persons, in whom we later discovered mutations in *ZC4H2*, are listed in Tables 1 and 2 and Tables S1A and S1B, available online. This study was approved by the local institutional review boards. Written informed consent was obtained from all participants and their legal guardians according to the Declaration of Helsinki. Informa-

tion about deceased individuals was obtained through relatives and from hospital records.

Genetic Studies

For next-generation sequencing and genetic analysis, DNA was extracted from peripheral-blood samples or formalin-fixed tissues. For family 1, the mutation was identified in the index male (IV-3 in Figure 1A) by the sequencing of all exons on the X chromosome similarly to the previously described method.¹⁸ Family 2 was haplotyped with 21 microsatellite markers (5–10 cM distance) with GeneHunter,¹⁹ which revealed a 37 cM interval flanked by DXS6810 and DXS6797 (Figure S1). A BED file with all coding exons plus 100 bp flanking sequences of this region was generated with GeneDistiller software²⁰ and used for custom production of a NimbleGen Sequence Capture Array (4.97 Mb). Fifteen micrograms of genomic DNA from individual V-1 (Figures 1B and S1) and his mother (IV-6) were fragmented, captured, and sequenced on the Genome Sequencer FLX System (Roche). Eighty-five percent of 1.54 million reads (421 ± 52 bp) were aligned (average coverage $65\times$) and called for variants with GeneiousPro v.5.6.5 (Biomatters). Variants were then evaluated with MutationTaster software.²¹ For family 3 (Figure 1C), we analyzed all coding exons of *ZC4H2* with primer pairs listed in Table S2 by traditional Sanger sequencing.

For five individuals of family 4 (I-1, I-2, II-1, II-2, and II-5 in Figure 1D), whole-exome sequencing (WES) was performed with Illumina TrueSeq WES protocols. The enriched DNA (350–400 bp products) was sequenced on the Illumina HiSeq2000 platform (Axeq Technologies), which returned on average 48.3 Mb of 100 bp paired-end reads per individual. These reads were quality trimmed with the FASTX toolkit and aligned to UCSC Genome Browser hg19 with the Burrows-Wheeler Aligner with default parameters, except for -d 5 and -l 35. SAMtools was used for generating BAM files. Sequence variants were realigned, recalibrated, and reported with the Genome Analysis Toolkit and categorized with Annovar. We applied different inheritance models for this family: autosomal recessive (homozygous or compound heterozygous), X-linked, and de novo (postulated germline mosaicism was applied for one of the parents).

For family 5, all X-chromosome-specific exons were enriched from genomic DNA of the index male (IV-1 in Figure 1D) with droplet-based multiplex PCR similarly to the previously described method,²² and DNAs were sequenced on the Illumina HiSeq2000 platform (ATLAS).

For segregation analysis of the *ZC4H2* mutations identified in this study, we used gene-specific primers flanking the mutations and determined genotypes for all available family members by Sanger sequencing of PCR products. The c.593G>A (RefSeq accession number NM_018684) (p.Arg198Gln) mutation was further verified by restriction-fragment-length-polymorphism analysis and excluded in 100 alleles of healthy control subjects from the same ethnic background: the 290 bp PCR product generated with the oligonucleotide primers 5'-CTGAAGCTGGGTTA TGTCCTTCC-3' (forward) and 5'-CTTCCGTTTCGGCTTTTGTG-3' (reverse) was cleaved by HpaII into 263 + 27 bp in the presence of the mutation and 218 + 45 + 27 bp in the absence of the mutation (data not shown).

We performed X-inversion breakpoint mapping by fluorescence in situ hybridization (FISH) on metaphase chromosomes of the affected boy according to standard protocols by using bacterial artificial clones (BACs) selected from the regions of interest (Table S3). For expression analysis in fibroblasts, we

Table 1. Overview of Frequent Clinical Symptoms Present in Hemizygous Males

Characteristics and Symptoms	HPO ID	Family 1	Family 2	Family 3	Family 4	Family 5	Simplex Case 1	Total (per Genotype)
Mutation	NA	c.187G>C (p.Val63Leu)	c.593G>A (p.Arg198Gln)	c.601C>T (p.Pro201Ser)	c.637C>T (p.Arg213Trp)	c.637C>T (p.Arg213Trp)	de novo X inversion	NA
Origin	NA	Germany	Germany	Netherlands	Australia	France	Germany	NA
Age at last assessment	NA	27–74 years (mean = 56 years)	0.5–8.0 years	1.4–13.0 weeks	7.5–13.5 years	8.0–28.2 years	3.8 years	NA
Age at death	NA	no disease-related deaths	0.5–8.0 years	1.4–13.0 weeks	no disease-related deaths	no disease-related deaths	no disease-related deaths	NA
Number of affected individuals	NA	6	5	5	2	2	1	5 genotypes
Growth								
Dwarfism	HPO:1516	–	2	1	–	1	1	4/5
Head and Neck								
Long (flat) philtrum	HPO:299	1	2	5	–	–	1	4/5
Oral motor dysfunction	HPO:5216	–	1	–	–	2	1	3/5
Low-set ears	HPO:369	–	2	–	–	1	1	3/5
Ptosis	HPO:1488	6	3	1	–	1	1	5/5
Upturned nares	HPO:463	–	2	5	–	–	1	3/5
Broad alveolar ridges	HPO:187	–	–	5	–	2	1	3/5
High-arched palate	HPO:218	–	2	5	–	2	1	4/5
Carp-shaped mouth	HPO:10806	1	2	5	–	2	1	5/5
Droling	HPO:2307	–	3	–	2	2	1	3/5
Short neck (with limited rotation)	HPO:470	–	2	1	–	1	1	4/5
Respiratory								
Neonatal respiratory distress	HPO:2643	–	3	5	–	–	1	3/5
Chest								
Humeroscapular mobility restriction	HPO:6467	–	2	1	–	–	1	3/5
Narrow shoulders or thorax	HPO:6664	1	3	–	–	1	1	4/5
Abdomen								
Poor feeding	HPO:2022	–	4	–	–	1	1	3/5
Skeletal								
Kyphosis, lordosis, or scoliosis	HPO:2751	1	3	1	–	–	1	4/5
Congenital hip dislocations or hip flexion contractures	HPO:1374	–	4	2	–	–	1	3/5
Short limbs	HPO:9826	–	–	2	–	1	1	3/5
Flexion contractures of elbows or knees	HPO:2987, 2978	–	3	2	–	1	1	4/5
Proximally placed thumbs	HPO:9623	–	2	1	–	–	1	3/5
Camptodactyly	HPO:1215	–	5	2	–	–	1	3/5

(Continued on next page)

Table 1. Continued

Characteristics and Symptoms	HPO ID	Family 1	Family 2	Family 3	Family 4	Family 5	Simplex Case 1	Total (per Genotype)
Ulnar deviation of the finger	HPO:9465	–	3	1	–	–	1	3/5
Proximally placed toes	HPO:1780	–	4	1	–	–	1	3/5
Equinovarus feet or contracture of Achilles tendon	HPO:8110, 1771	6	5	2	2	–	1	5/5
Skin, Nails, and Hair								
High anterior hairline	HPO:294	–	2	5	–	–	1	3/5
Muscle and Soft Tissue								
Distal muscle weakness	HPO:2460	6	2	–	–	2	1	4/5
Edema or fat pads (hands and/or feet)	HPO:7514	–	3	1	–	–	1	3/5
Neurologic								
Retardation of motor development	HPO:1263	6	5	1	2	2	1	5/5
Intellectual disability	HPO:1249	6	5	1	2	2	1	5/5
Spasticity	HPO:1257	–	5	–	2	1	1	3/5
Seizures	HPO:1250	–	4	1	1	2	1	4/5
Delayed myelination on MRI	HPO:2188	–	2	1	–	–	1	3/5
Diffuse cerebral atrophy on MRI	HPO:2283	–	3	–	–	1	1	3/5

This table shows the clinical symptoms seen in >50% of the five different genotypes of all affected males from families 1–5 and of simplex case 1. The entire set of symptoms is listed in Table S1A. None of the investigated affected males showed abnormalities in motor (n = 4) or sensory (n = 3) peripheral nerve conduction studies or any histological signs of a myopathy (n = 7). All symptoms are listed according to the nomenclature and the systematics of the OMIM “Clinical Synopsis” and are mapped to the Human Phenotype Ontology.¹⁷ The phenotypes of families 1 and 3 have been published.^{9,10} Abbreviations are as follows: HPO, Human Phenotype Ontology; NA, not applicable; and –, symptom absent or unknown.

isolated total RNA and performed RT-PCR with two different sets of *ZC4H2* primer pairs and one *HPRT* primer pair (Table S2), which served as a control for cDNA integrity. *ZC4H2*-specific bands were excised from agarose gels, extracted (QIAGEN), and Sanger sequenced with the same primers as for the amplification.

For simplex case 1, array comparative genomic hybridization (aCGH) was performed with the NimbleGen CGX-6 format (which includes 135K oligonucleotide probes) according to the manufacturer's protocol, and the scanned data were processed with Genolyphix software (Signature Genomics). For simplex cases 2 and 3, aCGH was performed with a 105K feature (case 2) or a 135K feature (case 3) whole-genome microarray (SignatureChip Oligo Solution version 1.0 or 2.0, custom-designed by Signature Genomic Laboratories and manufactured by Agilent Technologies or Roche NimbleGen) as previously described.^{23,24}

Generation of Human Wild-Type and Altered *ZC4H2* Constructs for Overexpression Studies

For transient expression, full-length open reading frames of human wild-type and altered *ZC4H2* constructs from family 1 were amplified with primer sets (1) *ZC4H2*-EGFP-N2-EcoRI-forw and *ZC4H2*-EGFP-N2-SalI-rev and (2) *ZC4H2*-EGFP-C2-EcoRI-

forw and *ZC4H2*-EGFP-C2-SalI-rev (Table S2). PCR products were double digested with EcoRI and SalI (New England Biolabs), and the fragments were ligated into pEGFP-C2 and pEGFP-N2 (Clontech). The clones with c.637C>T (p.Arg213Trp), c.593G>A (p.Arg198Gln), and c.601C>T (p.Pro201Ser) mutations were generated from the wild-type constructs by site-directed mutagenesis with the Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Myc-tagged *ZC4H2* constructs were generated from the pEGFP-C2 clones after double digestion with EcoRI and SalI and ligation into the pCMVTag3B vector (Stratagene). Correctness of all sequences was determined by Sanger sequencing.

Immunofluorescence Studies of Wild-Type and Altered *ZC4H2* in Cell Lines and Primary Neurons

Neuro2A cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in the presence of antibiotics. Hippocampi or cortices were dissected from embryonic day (E) 17.5 C57BL/6J mouse embryos, dispersed in cold PBS, and triturated with papain (10 U/ml) (Worthington) for 22 min at 37°C. Cells were resuspended in DMEM/Ham's F-12 with 10% FBS and centrifuged at 400 × g (for 3 min), and the pellet was resuspended in primary neuron basal medium, neuronal survival factor, and 0.5 mM glutamine (Lonza). Dissociated

Table 2. Overview of Frequent Clinical Symptoms Present in Heterozygous Females

Characteristics and Symptoms	HPO ID	Family 2	Family 3	Family 4	Family 5	Simplex Case 2	Simplex Case 3	Total (per Genotype)
Mutation	NA	c.593G>A (p.Arg198Gln)	c.601C>T (p.Pro201Ser)	c.637C>T (p.Arg213Trp)	c.637C>T (p.Arg213Trp)	deletion of chrX: 63,666,909–64,493,512	deletion of chrX: 64,049,596–64,370,757	NA
Origin	NA	Germany	Netherlands	Australia	France	United States	Spain	NA
Age at last assessment	NA	–	–	–	–	9 years	13 years	NA
Number of affected individuals	NA	1	7	1	2	1	1	5 genotypes
Genitourinary								
Urine incontinence	HPO:20	–	1	–	–	1	1	3/5
Skeletal								
Camptodactyly	HPO:1215	–	5	–	–	1	1	3/5
Equinovarus foot deformity or contracture of Achilles tendon	HPO:8110, 1771	1	3	–	–	1	1	4/5
Muscle and Soft Tissue								
Distal muscle weakness	HPO:2460	–	3	–	–	1	1	3/5
Neurologic								
Intellectual disability	HPO:1249	–	3	1	2	1	1	4/5
Dysarthria and/or deficit in expressive language	HPO:1260	–	1	–	–	1	1	3/5

This table shows the clinical symptoms seen in >50% of the five different genotypes of all affected females from families 2–5 and simplex cases 2 and 3. The entire set of symptoms is listed in Table S1B. All symptoms are listed according to the nomenclature and the systematics of the OMIM “Clinical Synopsis” and are mapped to the Human Phenotype Ontology.¹⁷ The phenotype of family 3 has been published.¹⁰ Abbreviations are as follows: HPO, Human Phenotype Ontology; NA, not applicable; and –, symptom absent or unknown.

cells were plated onto poly-D-lysine (SIGMA)- and laminin (Invitrogen)-coated substrates at a density of 400 cells/mm². For immunofluorescence studies, human embryonic kidney (HEK) 293T and Neuro2A cells were fixed with 4% PFA 24 hr after transfection, permeabilized in 0.2% Triton X-100, and washed at room temperature (RT). Cells were incubated with 0.5 µg DAPI/ml and mounted with Fluoromount (SouthernBiotech). Transfected mouse hippocampal neurons were fixed with 4% PFA for 20 min and permeabilized with PBS, 3% BSA, and 0.2% Triton X-100 for 1 hr at RT.

Per well, 5×10^4 HEK293T cells or 8×10^4 Neuro2A cells were transfected with 1 µg plasmid DNA and 1 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Images were acquired with a confocal laser-scanning microscope (Zeiss LSM 700) with a 63× objective and were analyzed with the ZEISS LSM Image Browser. Mouse hippocampal neurons were transfected at 14 days in vitro (DIV) with the use of the Magnetofectamine transfection kit (OZ Biosciences). Microscopy was carried out 24–48 hr after transfection. Cells were incubated with primary antibodies mouse anti-PSD95-mAb (1:100; ThermoFisher), goat anti-GAD65-67 (1:50; SCBT), goat anti-VGLUT1 (1:50; SCBT), and rabbit anti-Gephyrin (1:1,000; Abcam) diluted in blocking solution (PBS, 3% BSA, and 0.2% Triton X-100) and with a secondary antibody (FluoProbes FP-594 donkey anti-mouse, anti rabbit, or anti-goat antibody [1:300; Interchim]) for 45 min. Sequential acquisitions were made, and

high-resolution z stack images of neurons were taken with the 63× objective of a confocal FluoView 500 microscope (Olympus) with optical section separation (z interval) of 0.5 µm and maximal projections. The extent of colocalization was measured with the “colocalization” module of the 64-bit version of Imaris 5.0.2 (Bitplane AG).²⁵

Colocalization of ZC4H2-GFP with presynaptic and postsynaptic markers was statistically analyzed with Prism Software and the Mann-Whitney U test. The number of dendritic spines was statistically analyzed with a one-way ANOVA (posthoc Newman-Kewls).

Immunoblot Analysis

A total of 5×10^5 HEK293T cells were grown in 75 cm² flasks, and 8 µg of plasmid DNA was transfected with the use of Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer’s recommendations. Twenty-four hours after transfection, cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1% NP40, and protease inhibitors [Roche]), sonicated, and centrifuged for 15 min at 13,000 rpm at 4°C. Immunoblots were incubated with the following primary and secondary antibodies: goat polyclonal anti-GFP-HRP (1:10,000; Abcam), rabbit polyclonal anti-actin (1:10,000; Sigma), peroxidase-conjugated anti-mouse-HRP (1:3,000; Dianova), and anti-rabbit-HRP (1:5,000; Amersham).

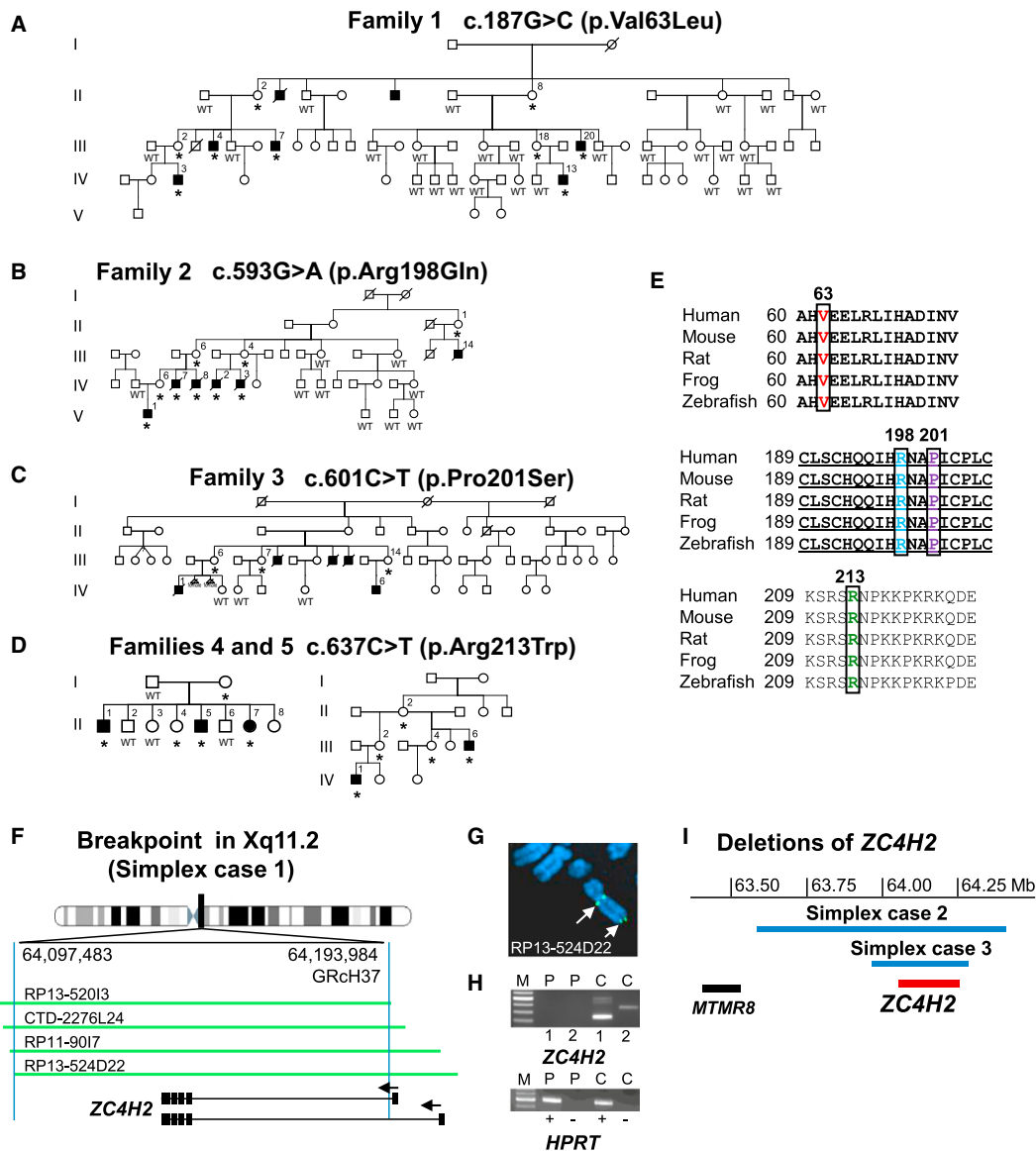


Figure 1. Overview of Genetic Results in Individuals with ZC4H2 Mutations Discovered by Massively Parallel Sequencing, Chromosome Breakpoint Mapping, and aCGH

(A–D) Pedigrees of families 1–5, affected by ZC4H2 missense mutations. Asterisks indicate that a mutation is present. Filled-in symbols represent affected individuals, and symbols with slashes represent deceased individuals. The following abbreviation is used: WT, wild-type.

(A) Pedigree of family 1, affected by WWS.⁹ The c.178G>C (RefSeq NM_018684.3) mutation was verified by Sanger sequencing to segregate with the disease phenotype in the family.

(B) Family 2 is affected by an early lethal AMC subtype that segregates with the c.593G>A mutation.

(C) Family 3, previously published by Hennekam et al.,¹⁰ is affected by an early lethal form of AMC due to a ZC4H2 c.601C>T missense mutation.

(D) Families 4 and 5 are affected by a c.637C>T missense mutation.

(E) Multiple-sequence alignment of ZC4H2 domains in five species and conservation of the substituted amino acids (colored and boxed). Amino acid residues of the ZC4H2 zinc-finger domain in the C terminus are underlined.

(F) Schematic view of the X chromosome with the 96 kb breakpoint region in Xq11.2 determined by fluorescence in situ hybridization (FISH) and the position and exon-intron structure of ZC4H2. For simplicity, we show only two out of five alternative transcripts. Arrows above the exons indicate the direction of transcription. Breakpoint-spanning clones in the boy with the X inversion are presented as green horizontal lines.

(G) FISH results for BAC RP13-524D22 from Xq11.2 with split signals in Xq11.2 and Xq28 (arrows) indicate that this clone spans the breakpoint.

(H) RT-PCR expression results of ZC4H2 (upper) and HPRT (lower) in the fibroblasts of the boy with the X inversion (P) and of the control (C). For ZC4H2 RT-PCR amplifications, we used two different primer pairs (indicated by 1 and 2 below the agarose-gel picture) and found

(legend continued on next page)

Zc4h2 Expression Analysis in Mouse Brain Tissues and Primary Cortical Cultures

All mouse experiments were performed according to protocols approved by the Committee on Use and Care of Animals at the University François-Rabelais (Tours, France) and by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Paris, France). TissueScan qPCR Arrays (OriGene) were used for screening for *Zc4h2* expression in 48 samples covering five stages of embryonic, postnatal, and adult brain tissues with the use of Soadvance Syber (BioRad) gene expression assays. The prestandardized cDNAs were amplified by PCR using a primer set specific to *Zc4h2* (Table S2).

RNA was extracted from primary cortical neurons after 5, 10, 14, and 21 days in culture. cDNA was synthesized with the QuantiTect RT kit (QIAGEN). Quantitative PCR (qPCR) was done with the use of 50 ng cDNA as a template with SsoFast Eva Green (BioRad) reagent. The same specific primer set was used for expression assays in mouse tissues. The assays were performed in duplicate on LightCycler480 (Roche). Quantification was carried out by the 2- $\Delta\Delta C_p$ method. The normalized ratio was obtained for each target gene with the use of LC480 software, qPCR efficiencies were considered, and reference genes *Cyc1*, *Sdha*, and *Gapdh* were used for normalization.

Zebrafish Whole-Mount In Situ Hybridization

Zebrafish were bred and maintained according to approved guidelines prescribed by the Committee on Use and Care of Animals at the National Institute of Genetics (Japan). For in situ hybridization, embryos at 24 and 48 hr postfertilization (hpf) were fixed overnight with 4% PFA in PBS. Embryos were then dehydrated with ascending concentrations of methanol and stored at -20°C overnight before rehydration with descending concentrations of methanol and treatment with proteinase K to increase permeability. Sense and antisense cRNA probes were generated with the DIG RNA labeling kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. Probe hybridization was performed overnight at 65°C and was detected with a DIG antibody conjugated to alkaline phosphatase (Roche), resulting in color development when the substrates nitro blue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-indolyl phosphate were added. In situ hybridization using a sense probe did not detect any significant signal.

Knockdown and Rescue Experiments in Zebrafish

Zebrafish *zc4h2* (RefSeq NM_199642) was cloned into a pCR4-TOPO vector (Invitrogen) and used for cRNA synthesis. Antisense morpholino oligonucleotides (MOs) were designed against the translation initiation codon (MO1) and the splice donor site between exon 2 and intron 2 (MO2) of zebrafish *zc4h2*. Zebrafish embryos were injected with 5 ng of MOs at 1- to 2-cell stages and studied as previously published.²⁶ At these dosages, control MOs produced no discernible phenotype change. For rescue experiments, zebrafish *zc4h2* and mouse *Zc4h2* (RefSeq NM_001003916) were cloned into the pCS2+ expression vector and missense mutations were introduced into the mouse clone by site-directed mutagenesis. All primer sequences are presented

in Table S2. Capped RNA was synthesized with the mMACHINE mMACHINE SP6 kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Capped RNA (100 pg) was coinjected with MO2 (4 ng) into zebrafish embryos at 1- to 2-cell stages. At 2 days post-fertilization (dpf), normal zebrafish embryos swam away rapidly (>2 cm/s) upon tactile stimulation. The number of embryos that exhibited slow swimming (<2 cm/s) after touch was counted. For labeling of motoneurons and neuromuscular junctions (NMJs) in zebrafish, embryos were fixed in 4% PFA, washed in PBS, and labeled. Motor axon projections were labeled with a znp-1 antibody (antisynaptotagmin 2, 1:100, DSHB) and an AlexaFluor488-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody (Life Technologies). NMJs were labeled with α -bungarotoxin conjugated with AlexaFluor594 (Life Technologies).

Results

Clinical Delineation of a Syndrome with AMC plus ID

We initially studied two large families (families 1 and 2) who are compatible with X-linked recessive inheritance and in whom multiple malformations are associated with ID. Although contractures of the feet were one of the main clinical symptoms in family 1, affected by Wieacker-Wolff syndrome (WWS [MIM 314580]),⁹ the children of family 2 presented with neonatal respiratory distress, AMC, muscle weakness, and ptosis. These features suggested dysfunction of neuromuscular transmission in utero. As development progressed, it became clear that the affected boys of family 2 were also severely intellectually disabled. Correspondingly, the affected males from family 1 also had signs of a developmental defect of neuromuscular transmission, albeit in a much more attenuated form, as seen by congenital equinovarus foot deformity and ptosis. Central symptoms—besides ID—that were seen in the majority of individuals were spasticity due to involvement of upper motor neurons and seizures as a manifestation of disturbed formation of the cerebral network. Histological investigation did not provide evidence of a demyelinating or axonal neuropathy or a myopathy (see below). Phenotypic analysis of heterozygous females revealed mild ID, and in several individuals, additional minor dysmorphic signs, such as camptodactyly and equinovarus feet, were present. The phenotype of family 3 had been published previously.¹⁰ As a result of our findings and the presence of multiple contractures, respiratory distress, and severe ID in the family, we contacted the authors and enrolled this family into our study. Family 4 had been included in a larger study aimed at identifying novel genes for cerebral palsy (CP). Because the inheritance pattern of CP in the family was not unequivocally X linked, five individuals (affected and unaffected) were

with both sets that *ZC4H2* transcripts were lacking in the affected individual but that the expected products (three bands in lane 4 and one band in lane 5) were present in a male control. *HPRT* RT-PCR served as a control for cDNA integrity. Abbreviations are as follows: M, marker; +, addition of reverse transcriptase enzyme (RT); and -, negative control.

(I) Schematic view of the deletions identified by aCGH in two affected girls (simplex cases 2 and 3). Blue horizontal bars indicate the respective deletion in each of the affected individuals. Both deletions include *ZC4H2* (indicated by the red bar), but no other known gene.

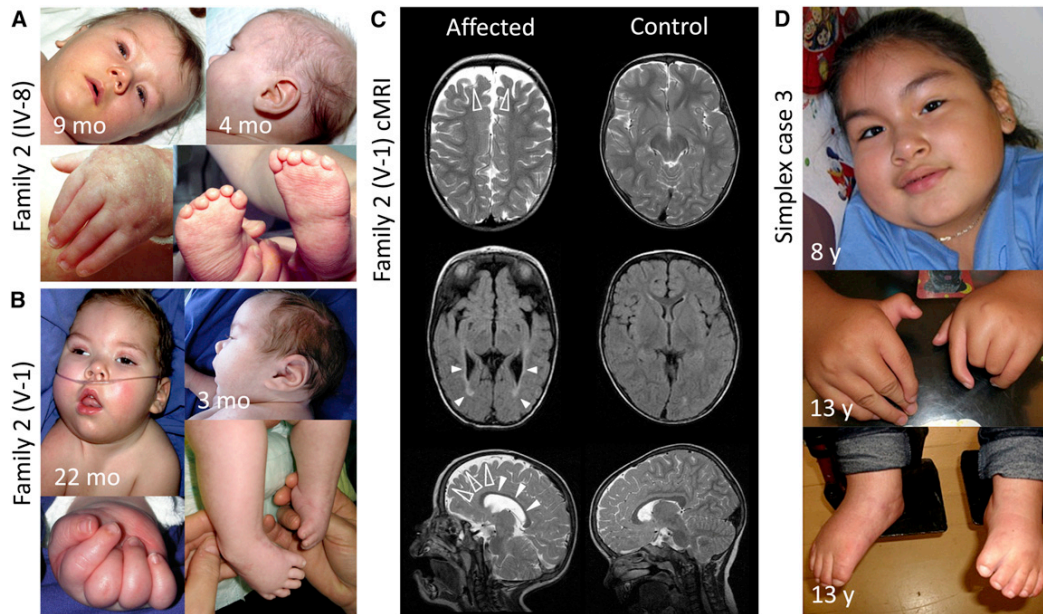


Figure 2. Clinical Photographs and Cranial MRIs of Two Affected Boys from Family 2 and a Simplex Case

(A) Male child IV-8 (family 2) shows facial weakness, low-set and posteriorly rotated ears, and strabismus. He has bilateral camptodactyly and equinovarus feet with small, proximally placed toes.

(B) Male child V-1 (family 2) shows prominent facial weakness, a flat philtrum, strabismus, upturned nares, a carp-shaped mouth, narrow shoulders, and muscular hypotonia. The contracted fingers cannot be opened passively and show characteristic fat pads over the extensor surfaces.

(C) Axial and parasagittal cranial MRIs (cMRIs) of individual V-1 (family 2) at the age of 22 months (left column) and an age-matched control (right column). In the affected child, frontal brain atrophy (open arrowheads) and hypoplasia of the corpus callosum (closed arrowheads) are depicted in the sagittal T₂-weighted image. The fluid-attenuated-inversion-recovery image (middle panel) shows abnormality of the periventricular white matter mainly in the occipital region (closed arrowheads).

(D) Female simplex case 3 shows narrow shoulders, proximally placed thumbs, camptodactyly, radial and ulnar deviation of the fingers, and mild equinovarus feet.

analyzed by WES. The heterozygous girl from this family (II-7 in Figure 1D) was assessed at the age of 3.75 years. She had a significant deficit of language development (especially of perceptive language) and of personal and social skills. Her fine and gross motor abilities, however, were appropriate for her age. She had neither CP nor joint contractures. The family 5 index individual, who presented with ID and additional clinical symptoms similar to those of the affected males of families 2 and 3, had been included in the EUROMRX cohort and thus has been sequenced for all X-chromosome-specific exons. For more clinical details on all affected individuals from families 1–5 and simplex cases 1–3, see Tables 1, 2, S1A, and S1B. We can single out retardation of motor development, ID, and equinovarus feet as the minimum common phenotypic denominators of WWS for all different mutations described in this article. The syndrome thus represents a clinically distinct and phenotypically broad neurodevelopmental disorder of the central and peripheral nervous systems.

Next-Generation Sequencing Identifies Missense Mutations in *ZC4H2*

In an effort to find pathogenic mutations in families affected by syndromic and nonsyndromic forms of XLID,

we identified the disease-causing mutation in a family afflicted with WWS^{27,28} by sequencing all X chromosome exons. After all identified variants were filtered against publicly available data, the only one that remained was a missense mutation in exon 3b (c.187G>C [p.Val63Leu]) of the zinc-finger gene *ZC4H2* (RefSeq NM_018684.3). This mutation cosegregated with the disease in the WWS-affected family (family 1 in Figure 1A). In family 2, linkage analysis localized the responsible locus between DXS6810 and DXS6797, and deep sequencing of the linkage interval and subsequent segregation analysis indicated a cosegregating mutation in exon 6 of *ZC4H2* (c.593G>A [p.Arg198Gln]) (Figure 1B). Clinical photographs and MRIs of two affected boys are presented in Figures 2A–2C. For family 3,¹⁰ we used gene-specific primers to search all *ZC4H2* exons and exon-intron boundaries by PCR and Sanger sequencing for a mutation in the mother (III-14 in Figure 1C) of one affected male. This analysis revealed in *ZC4H2* exon 6 another transition (c.601C>T [p.Pro201Ser]), which was also present in the heterozygous form in her two sisters (III-6 and III-7 in Figure 1C). For family 4, we performed WES on five family members (I-1, I-2, II-1, II-2, and II-5 in Figure 1D) because the inheritance pattern was inconclusive. In seven genes, we identified

unique sequence variants, which were subsequently validated. The three X chromosome variants—c.637C>T (p.Arg213Trp) in *ZC4H2* (Figure 1C), c.20T>A (RefSeq NM_152423.4) (p.Leu7Gln) in *MUM1L1*, and c.3140G>A (RefSeq NM_032968.3) (p.Gly1047Glu) in *PCDH11X* (MIM 300246) (data not shown)—were predicted to result in amino acid changes. All three variants segregated in the extended family (whole-exome-sequenced individuals, as well as the remaining sibling) according to postulated X chromosome inheritance (data not shown), and as such, we could not distinguish which one was causative. However, during data analysis, the latter two variants (in *MUM1L1* and *PCDH11X*) appeared as SNPs in the latest release of dbSNP135 and were thus considered to be rare, noncausative variants. Of the identified autosomal variants, the potentially compound-heterozygous change in *SLC11A2* (MIM 600523) was not confirmed by Sanger sequencing and the two *MYH14* (MIM 608568) changes were both on the same allele (i.e., not compound heterozygous). These *MYH14* variants did not segregate, given that the healthy mother and her healthy daughter had them as well. The de novo heterozygous variants in *FLNB* (MIM 603381) and *PLAC4* (MIM 613770) were not confirmed by Sanger sequencing (data not shown).

The same *ZC4H2* mutation as was found in family 4 (c.637C>T [p.Arg213Trp]) was identified in the affected male from family 5 (IV-1 in Figure 1D) by massively parallel sequencing of all X-chromosome-specific exons with the use of a PCR-based enrichment strategy. The mutation was also present in his mother (III-2), his affected uncle (III-6), and two other female relatives (II-2 and III-4) (Figure 1D). Representative sequence chromatograms of all mutations from families 1–5 are shown in Figure S2.

All *ZC4H2* amino acid positions affected by identified mutations are highly conserved (Figures 1E and S3). The new amino acids are predicted to be damaging to *ZC4H2* function by PolyPhen-2 and MutationTaster.¹⁷ Such changes were not detected in publicly available databases, including the 1000 Genomes Project database, dbSNP135, and the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Exome Sequencing Project Exome Variant Server. Moreover, when tested in 100 ethnic controls (males), the c.637C>T (p.Arg213Trp) mutation was not detected. None of the changes were present among >450 X chromosome exomes from males with XLID (data not shown). Importantly, no other variants (X linked or autosomal) identified and segregating in these families were predicted to be deleterious.

An X Chromosome Inversion Abolishes *ZC4H2* Expression in a Severely Affected Boy

We also examined a severely affected boy (simplex case 1 in Tables 1 and S1A) with a phenotype similar to that of the affected boys of families 2 and 3; he was found to have a paracentric de novo inversion on the X chromosome with breakpoints at Xq11.2 (location of *ZC4H2*) and

Xq28. Using serial FISH, we mapped both breakpoints to intervals of <150 kb (Figures 1F and 1G and Table S3). Whereas the breakpoint region at Xq28 did not contain any known gene (Figure S4), the mapped region at Xq11.2 contained *ZC4H2*, which led us to speculate that the rearrangement might interfere with the normal expression of this gene. We thus performed RT-PCR experiments with two different primer sets on RNA isolated from cultured skin fibroblasts of the affected male and a control. The results showed that unlike in the normal control, no *ZC4H2* transcripts were detectable in mRNA from the affected male (Figure 1H), indicating that the rearrangement abolished *ZC4H2* expression.

aCGH Identifies Mildly Affected Females with Single Allelic Deletions of the *ZC4H2* Locus, and *ZC4H2* Is Subject to X Inactivation

Using whole-genome microarray analysis, we also identified small heterozygous deletions at Xq11.2 in two mildly affected girls (simplex cases 2 and 3 in Tables 2 and S1B and Figures 1I and S5). In simplex case 2, the deletion removed about 826 Kb of the X chromosome genomic DNA (chrX: 63,666,909–64,493,512 [UCSC Genome Browser hg19]) and was absent in her mother. In simplex case 3, the deletion encompassed about 321 Kb (chrX: 64,049,596–64,370,757 [UCSC Genome Browser hg19]). Clinical photographs are presented in Figure 2D. Additional parental DNA was unavailable for further testing. Both deletions included *ZC4H2*, but not any other adjacent gene, and allowed us to conclude that heterozygous deletions of *ZC4H2* can result in a clinical phenotype.

To investigate whether *ZC4H2* might be subject to X inactivation, we determined its expression level in blood lymphocytes from healthy males and females by microarray analysis. Its relative expression level compared to those of other genes known to be expressed from only one or from both X chromosomes suggested that *ZC4H2* is subject to X inactivation in females (Figure S6). We next determined the X inactivation status of healthy and affected females who carried a heterozygous missense mutation or deletion of *ZC4H2*. We observed preferential inactivation of the mutated X chromosome in all females tested, except for the affected girl of family 4 and her unaffected mother (data not shown). An overview of all genetic results is provided in Table S4.

***ZC4H2* Is Expressed in the Central and Peripheral Nervous Systems of Humans, Mice, and Zebrafish**

The functional role of *ZC4H2* is not well characterized. We therefore first investigated its expression pattern and found it to be transcribed in human fetal brain and other tissues (Figure S7). In mouse and zebrafish embryos, *Zc4h2* and *zc4h2*, respectively, are strongly expressed throughout the brain and in the spinal cord (Figure 5A and Mouse Genome Informatics [see Web Resources]). These results prompted us to investigate the in vivo expression pattern of *Zc4h2* during neurodevelopment in

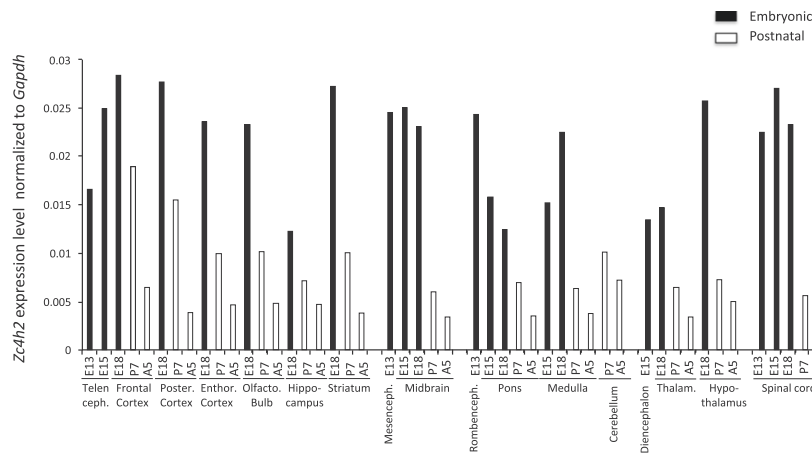


Figure 3. Mouse *Zc4h2* Is Expressed in Various Brain Tissues and the Spinal Cord, and its Expression Is Reduced Postnatally

Zc4h2 mRNA expression was assessed by quantitative RT-PCR using SYBR Green I protocol and arrays containing cDNA from 48 mouse samples. The tissues represented are telencephalon, frontal cortex, posterior cortex, entorhinal cortex, olfactory bulb, hippocampus, striatum, mesencephalon, midbrain, rhombencephalon, pons, medulla, cerebellum, diencephalon, thalamus, hypothalamus, and spinal cord. Five developmental stages were investigated: E13, E15, E18, postnatal day 7 (P7), and adult week 5 (A5). Expression of *Zc4h2* mRNA is shown relative to the *Gapdh* reference gene.

various mouse brain regions and spinal cord of different developmental stages. Interestingly, in all brain areas, *Zc4h2* expression was highest during embryonic development and declined postnatally, suggesting an important role of *Zc4h2* during brain development (Figure 3). A similar dynamic gene expression was evident in cultures of mouse primary cortical neurons: there was a significant decline of *Zc4h2* expression in more mature neurons than in immature neurons ($p < 0.05$) (Figure S8).

High Levels of Altered ZC4H2 Reduce the Number of Dendritic Spines

To gain further insight into the functional role of ZC4H2, we studied the subcellular localization of wild-type and altered proteins in cell lines and mouse primary neurons. Transient transfection of tagged ZC4H2 constructs led to the stable production of the corresponding protein (Figure S9). Immunofluorescence analysis of altered and wild-type ZC4H2 in Neuro2A and HEK293T cells showed its presence in both the nucleus and the cytosol. Compared to that of wild-type constructs, overexpression of constructs containing the missense mutations identified in the families did not reveal any obvious changes (Figure S10 and data not shown). Subsequent analysis showed that human ZC4H2 was distributed in mouse primary hippocampal neurons similarly to in Neuro2A and HEK293T cells (Figure 4A). A more detailed analysis showed that both wild-type and altered ZC4H2 localized at excitatory postsynaptic sites, as verified by a predominant colocalization with PSD95, but not in inhibitory synapses (Figures 4B, 4C, and S11). In subsequent follow-up studies, using altered constructs containing the missense mutations, we found that compared to wild-type ZC4H2 and GFP alone, the p.Val63Leu, p.Arg198Gln, and p.Pro201Ser substitutions caused a significant decrease in synapse number and density. Remarkably, the p.Arg198Gln and p.Pro201Ser substitutions, which caused a more severe clinical phenotype in the affected individuals, were most deleterious (Figures 4D and 4E). We obtained similar results with Myc-tagged

constructs, which we used to exclude any potential effect of GFP on ZC4H2 (data not shown).

Knockdown of *zc4h2* in Zebrafish Results in Impaired Swimming and a Reduced Number and Disorganized Pattern of Neuromuscular Endplates

Finally, we investigated the loss of *zc4h2* function in zebrafish by knockdown with two different antisense MOs, one designed against the translation initiation codon and the other against the splice donor site between exon 2 and intron 2 of *zc4h2*. This knockdown did not result in any gross morphological abnormalities, but the morphants showed impaired swimming capability at 2–3 dpf as a result of compromised swimming contractions (Figure 5B and Movies S1 and S2). This defect could be rescued with wild-type zebrafish *zc4h2* and with mouse *Zc4h2* cDNA constructs, but not with constructs carrying the missense mutations of families 1–5 (Table S5). Because slow swimming might be due to muscle weakness, we next investigated the effect of *zc4h2* ablation on the development of the motoneurons, the myotome, and the NMJ. In contrast to control embryos, *zc4h2* morphants had shorter and less branched motoneurons projecting from the spinal cord by 27 and 48 hpf, demonstrating a slower pace of axon growth and branching. α -bungarotoxin staining revealed a reduced number and disorganized pattern of neuromuscular endplates in *zc4h2* morphants compared to controls (Figure 5C).

Because muscle-fiber growth depends on the timely and correct establishment of the NMJ,²⁹ we measured fiber diameters in muscle-biopsy specimens taken from five affected boys of family 2 at different ages. Until 6 weeks of age, the fibers were smaller and later normalized in size, suggesting delayed innervation (Figure S12A). A disorder of myelination was excluded by electron microscopy (Figure S12C). The formation of the neuromuscular endplate is a carefully orchestrated process of axon trajectories through growth-cone choices and targeting of the myofiber, and an imbalance of muscle agonists and antagonists results in permanent contractures and arthrogryposis.³⁰

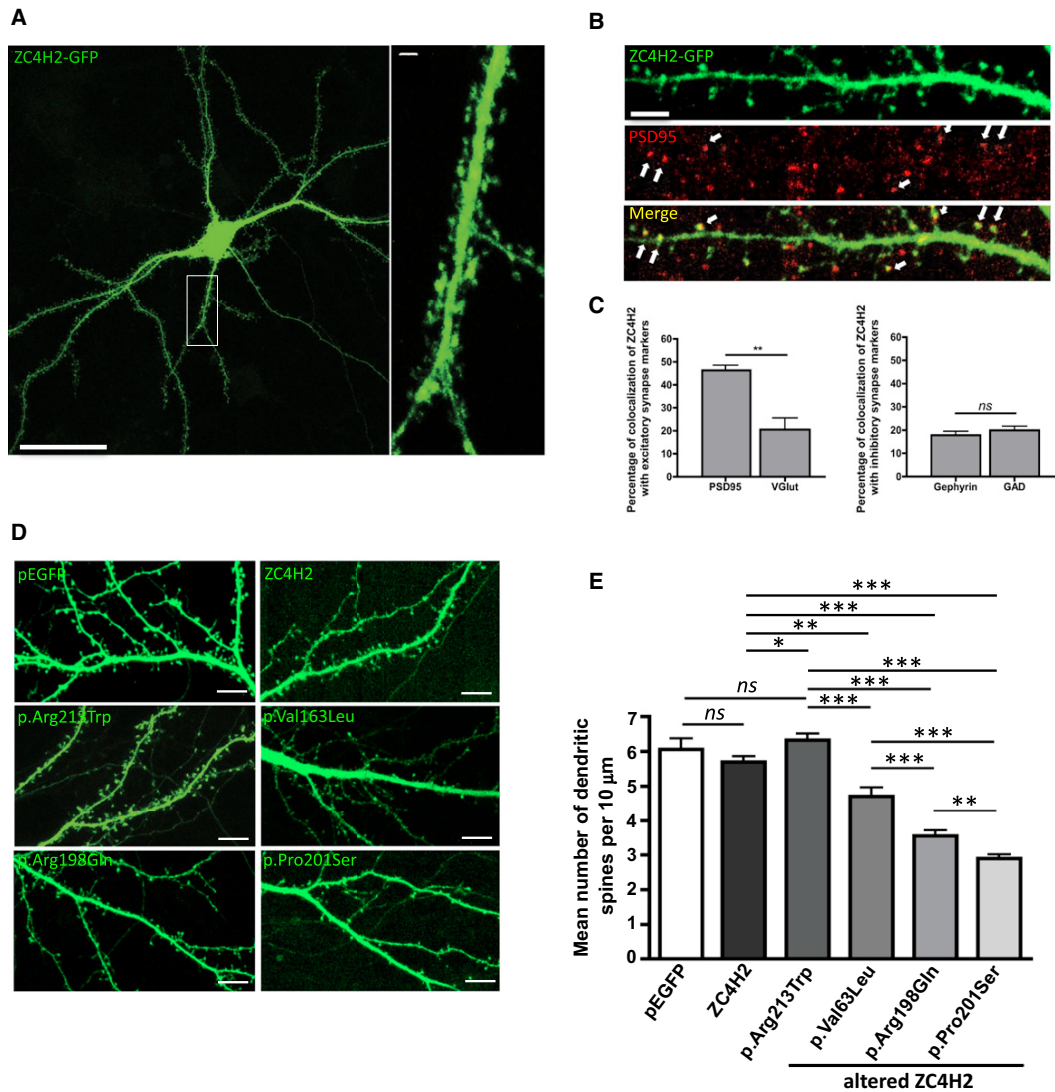


Figure 4. Recombinant ZC4H2 Localizes to Excitatory Postsynaptic Sites in Primary Hippocampal Neurons, and Altered Proteins Cause a Significant Decrease in Dendritic Spine Number and Density

(A) Confocal image of a living mature mouse primary hippocampal neuron (DIV 16) with transiently produced ZC4H2-GFP (36 hr after transfection) shows that the protein is present throughout the cell (three independent transfections; 15 cells; scale bar represents 50 μm). The right-hand panel shows a higher magnification of a single neurite (scale bar represents 2 μm). The comparative analysis of neurons transfected with the pEGFP vector used for cloning did not reveal any change in neuronal morphology, nor did we see any differences between GFP-tagged and Myc-tagged constructs (data not shown).

(B) Confocal images of fixed primary hippocampal neurons (DIV 16) with ZC4H2-GFP (36 hr after transfection). Immunostaining with PSD95 (excitatory postsynaptic marker) or VGLUT (excitatory presynaptic marker) antibodies revealed a postsynaptic localization of ZC4H2-GFP in excitatory synapses (n = 3 transfections; 12 cells; scale bar represents 5 μm). Arrows indicate domains of colocalization.

(C) Quantification of the mean percentage of colocalization of ZC4H2 with endogenous PSD95 and VGLUT (excitatory synapse) and with endogenous gephyrin and GAD (inhibitory synapse) (Mann-Whitney U test; **p < 0.01). The following abbreviation is used: ns, not significant. Error bars represent the SEM.

(D) Confocal images of dendrites and dendritic spines of mature neurons (DIV 16) transfected with pEGFP (negative control), ZC4H2-GFP, ZC4H2 p.Arg213Trp-GFP, ZC4H2 p.Val63Leu-GFP, ZC4H2 p.Arg198Gln-GFP, or ZC4H2 p.Pro201Ser-GFP plasmids. For each neuron that was further analyzed, we counted the number of spines in 10 μm sections: pEGFP (1 transfection; 8 cells; 47 spines), ZC4H2 (3 transfections; 18 cells; 111 spines), ZC4H2 p.Arg213Trp (3 transfections; 23 cells; 151 spines), ZC4H2 p.Val63Leu (3 transfections; 7 cells; 47 spines), ZC4H2 p.Arg198Gln (3 transfections; 11 cells; 94 spines), and ZC4H2 p.Pro201Ser (3 transfections; 18 cells; 156 spines).

(E) Quantification of the mean number of dendritic spines for the transiently expressed GFP, wild-type ZC4H2, and altered ZC4H2. Error bars represent the SEM.

The statistical comparative analysis was performed with PRISM software and a one-way ANOVA test (posthoc Newman-Kewls). *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. The following abbreviation is used: ns, not significant.

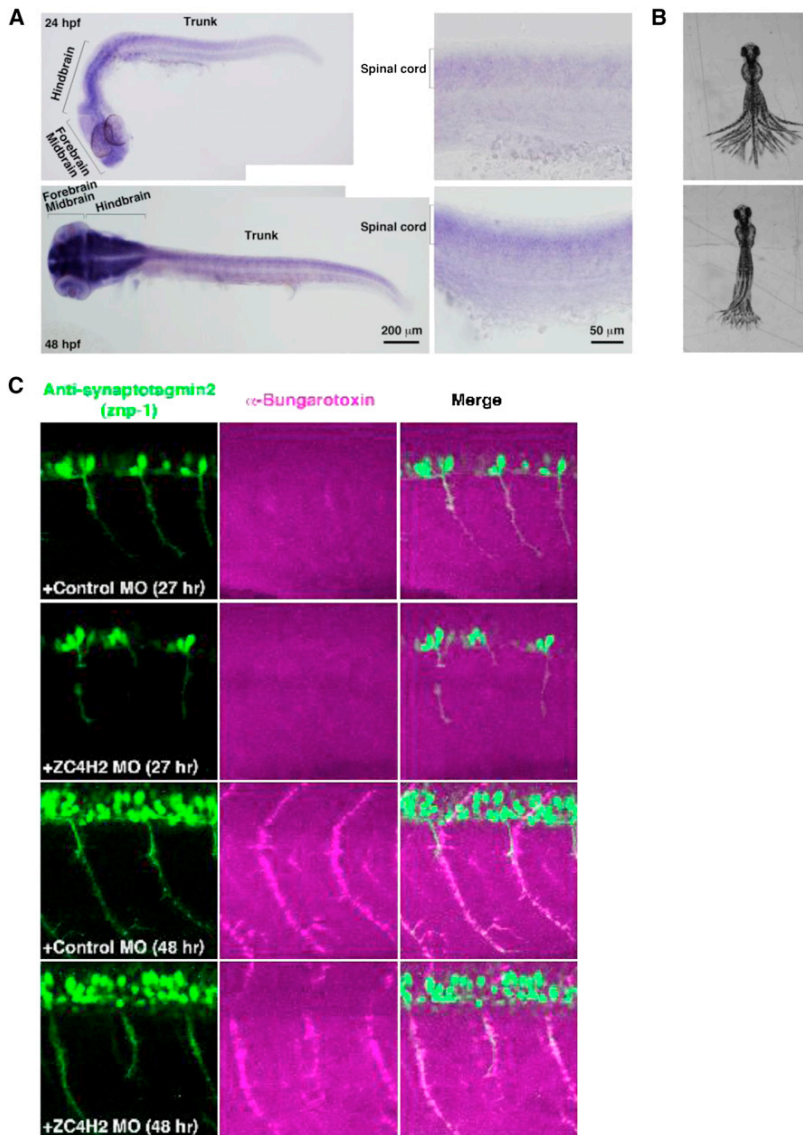


Figure 5. Zebrafish *zc4h2* Is Expressed in the Brain and Spinal Cord, and its Knockdown Causes Compromised Swimming Contractions and Abnormal α -Motoneuron Development

(A) Whole-mount in situ hybridization with a *zc4h2* probe at 24 hpf (upper row) and 48 hpf (lower row). Embryos show *zc4h2* expression in the forebrain, midbrain, hindbrain, and spinal cord.

(B) Superimposed images of tail movement at 48 hpf. Compared to animals injected with control MOs, *zc4h2*-knockdown zebrafish (lower) show weak swimming contraction.

(C) At 27 and 48 hpf, outgrowth of spinal cord motoneurons and formation of NMJs are morphologically affected in *zc4h2* morphants, but not in controls.

and who carries a heterozygous deletion that removes *ZC4H2* in addition to other genes.

ZC4H2 amino acids, which are affected by damaging mutations, are highly conserved and predicted to be functionally relevant. In families 1–5, the disease severity correlated with the severity of the underlying mutation. The location of the p.Val63Leu substitution (family 1) in a potential coiled-coil domain is predicted to alter secondary structure and slightly destabilize the local protein conformation.³³ This substitution caused a comparatively mild phenotype in females with this mutation. The p.Leu198Gln and p.Pro201Ser substitutions (families 2 and 3, respectively), associated with a severe lethal phenotype, lie within the highly conserved zinc-finger domain (Figure S3) and are predicted to compromise the domain's function.³³ The p.Arg213Trp substitution (families 4 and 5) is located in the protein's highly conserved C terminus, which cannot be assigned a known domain function or structure. The disease severity of these individuals is intermediate. Importantly, some females with the p.Arg213Trp substitution have developmental delay but are normal otherwise. We hypothesize that the different affection statuses of females with a heterozygous *ZC4H2* mutation might be related to varying X inactivation. The results obtained in peripheral-blood lymphocytes were consistent with the presence of symptoms in some heterozygous females, but not in others. However, because the X inactivation pattern in the nervous system can differ from that seen in the blood, as reported for Rett syndrome,³⁴ investigation of blood cells might not be suitable for predicting the phenotype.

Discussion

We report the association between mutations in the X-linked zinc-finger gene *ZC4H2* and a disease phenotype. Mutations in *ZC4H2* were identified in intellectually impaired individuals in four AMC-affected families and in one CP-affected family. On the basis of in silico analysis, *ZC4H2* had previously been suggested as a candidate for XLID.³¹ In several families, females with heterozygous *ZC4H2* mutations were also affected, but to a lesser degree. Furthermore, we found two *ZC4H2* deletions and one rearrangement in two female and one male unrelated simplex cases, respectively. These findings, along with the clinical findings in heterozygous females from families 2–5, indicate that females with *ZC4H2* mutations might also be affected. This is corroborated by a recently published female who has joint contractures³² and other symptoms

Given the clinical phenotypes, we conclude that *ZC4H2* should have a neuronal function during fetal growth. Our expression studies in mouse brain tissues of different developmental stages indicate that the gene has its highest level of expression during embryogenesis and that mRNA levels decline after birth. In primary hippocampal mouse neurons, transiently produced *ZC4H2* controls the number of dendritic spines, and the magnitude of spine reduction reflects the severity of the clinical phenotype. In zebrafish, *zc4h2* knockdown caused abnormal swimming and impaired α -motoneuron development. The deleterious nature of the *ZC4H2* variants found in this study is supported experimentally by failure of all missense mutations to rescue the swimming defect of zebrafish morphants.

Apart from in our studies, the role of *ZC4H2* has only been investigated in *Caenorhabditis elegans*, where a homozygous deletion of *zc4h2* (called *vab-23*) was found to be lethal at early larval stages because of failed ventral closure. Neuron-specific rescue of *vab-23* in ventral neuroblasts entirely rescued the phenotype. The authors hypothesized that *vab-23* might be a nuclear transcription factor with an influence on gene expression for secreted cues that regulate different steps of morphogenesis.³⁵ It was subsequently demonstrated that *vab-23* acts under the control of the *hox*-gene *lin-39* and binds directly to the *smp-1* promoter to induce *smp-1* (semaphorin 1a) transcription.³⁶ Semaphorins are a group of key signal proteins that act through their receptor proteins (neuropilins and plexins) and are essential for neuronal pathfinding, axon sorting and branching, endplate formation, dendrite specification, and synaptic specificity.³⁷ The general importance of axonal-guidance ligands in the pathophysiology of arthrogryposis has recently been supported by the discovery of mutations in endothelin-converting enzyme-like 1 (*ECEL1*) (MIM 605896 and 615065). Corresponding alterations of endopeptidase *ECEL1* prevent the intramuscular branching of α -motoneurons and the formation of sufficient NMJs, resulting in distal arthrogryposis without central nervous symptoms.^{38,39}

Dysregulation of axonal-guidance molecules (e.g., semaphorins or ephrins) might thus be the common denominator for the complex phenotype seen in the individuals with symptoms that affect central neuronal circuits (ID, seizures, gyral and white-matter abnormalities, and, occasionally, CP) and the peripheral nervous system (arthrogryposis and muscle weakness).

Taken together, the X-linked gene *ZC4H2* plays an important role during embryonic development of the central and peripheral nervous systems. Although the variable clinical manifestation of *ZC4H2* mutations, ranging from lethality in some affected males to very mild or absent symptoms in some females who have the mutation, might be explained in part by skewed X inactivation, other genetic, environmental, or stochastic factors might also be involved. Our results suggest the importance of including *ZC4H2* in genetic testing of individuals presenting with

ID plus muscle weakness and AMC (or at least equinovarus feet).

Supplemental Data

Supplemental Data include 12 figures, 5 tables, and 2 movies and can be found with this article online at <http://www.cell.com/AJHG>.

Acknowledgments

We thank all family members and affected individuals for participating in this study, Susanne Freier and Susanne Lützkendorf for excellent technical assistance, Cordula Nuener for help with fluorescence in situ hybridization, Karoline Gemeinhardt for initial RT-PCR experiments, and the Department of Microscopy (P.P.F.) of the University of Tours. J.A.R. is an employee of Signature Genomic Laboratories, a subsidiary of Perkin Elmer, Inc. This work was financed by a grant from the German Ministry of Education and Research through the German Mental Retardation Network; by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB665 TP C4); by the Einsteinstiftung Berlin (A-2011-63); by Project GENCODYS (241995), which is funded by the European Union Framework Program 7; by Australian National Health and Medical Research Council (NHMRC) grants APP1019928 and APP1008077; by Australian NHMRC Research Fellowship APP508043 (to J.G.); by the Australian Cerebral Palsy Foundation; and by the Adelaide Women's & Children's Hospital Research Foundation.

Received: February 10, 2013

Revised: March 15, 2013

Accepted: March 22, 2013

Published: April 25, 2013

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

1000 Genomes, <http://browser.1000genomes.org/index.html>

BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.omim.org/>

Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org/image/MGI:4505977>

MutationTaster, <http://www.mutationtaster.org>

PolyPhen-2, www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2/

Project HOPE, <http://www.cmbi.ru.nl/hope/home>

RefSeq, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>

UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/>

References

- Hoff, J.M., Loane, M., Gilhus, N.E., Rasmussen, S., and Daltveit, A.K. (2011). Arthrogryposis multiplexa congenita: an epidemiologic study of nearly 9 million births in 24 EUROCAT registers. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 159, 347–350.
- Reimann, J., Jacobson, L., Vincent, A., and Kornblum, C. (2009). Endplate destruction due to maternal antibodies in arthrogryposis multiplex congenita. *Neurology* 73, 1806–1808.

3. Tajsharghi, H., and Oldfors, A. (2013). Myosinopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* *125*, 3–18.
4. Bürglen, L., Amiel, J., Viollet, L., Lefebvre, S., Burlet, P., Clermont, O., Raclin, V., Landrieu, P., Verloes, A., Munnich, A., and Melki, J. (1996). Survival motor neuron gene deletion in the arthrogryposis multiplex congenita-spinal muscular atrophy association. *J. Clin. Invest.* *98*, 1130–1132.
5. Bamshad, M., Van Heest, A.E., and Pleasure, D. (2009). Arthrogryposis: a review and update. *J. Bone Joint Surg. Am.* *91(Suppl 4)*, 40–46.
6. Boylan, K.B., Ferriero, D.M., Greco, C.M., Sheldon, R.A., and Dew, M. (1992). Congenital hypomyelination neuropathy with arthrogryposis multiplex congenita. *Ann. Neurol.* *31*, 337–340.
7. Steinlein, O.K. (2007). Genetic disorders caused by mutated acetylcholine receptors. *Life Sci.* *80*, 2186–2190.
8. Nazir, M.A., Dillon, W.P., and McPherson, E.W. (1984). Myotonic dystrophy in pregnancy. Prenatal, neonatal and maternal considerations. *J. Reprod. Med.* *29*, 168–172.
9. Wieacker, P., Wolff, G., Wienker, T.F., and Sauer, M. (1985). A new X-linked syndrome with muscle atrophy, congenital contractures, and oculomotor apraxia. *Am. J. Med. Genet.* *20*, 597–606.
10. Hennekam, R.C., Barth, P.G., Van Lookeren Campagne, W., De Visser, M., and Dingemans, K.P. (1991). A family with severe X-linked arthrogryposis. *Eur. J. Pediatr.* *150*, 656–660.
11. Hall, J.G., Reed, S.D., Scott, C.I., Rogers, J.G., Jones, K.L., and Camarano, A. (1982). Three distinct types of X-linked arthrogryposis seen in 6 families. *Clin. Genet.* *21*, 81–97.
12. Ramser, J., Ahearn, M.E., Lenski, C., Yariz, K.O., Hellebrand, H., von Rhein, M., Clark, R.D., Schmutzler, R.K., Lichtner, P., Hoffman, E.P., et al. (2008). Rare missense and synonymous variants in UBE1 are associated with X-linked infantile spinal muscular atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 188–193.
13. Najmabadi, H., Hu, H., Garshasbi, M., Zemojtel, T., Abedini, S.S., Chen, W., Hosseini, M., Behjati, F., Haas, S., Jamali, P., et al. (2011). Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* *478*, 57–63.
14. Rauch, A., Wiczorek, D., Graf, E., Wieland, T., Ende, S., Schwarzmayr, T., Albrecht, B., Bartholdi, D., Beygo, J., Di Donato, N., et al. (2012). Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* *380*, 1674–1682.
15. de Ligt, J., Willemssen, M.H., van Bon, B.W., Kleefstra, T., Yntema, H.G., Kroes, T., Vulto-van Silfhout, A.T., Koolen, D.A., de Vries, P., Gilissen, C., et al. (2012). Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N. Engl. J. Med.* *367*, 1921–1929.
16. Ropers, H.H. (2010). Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *11*, 161–187.
17. Robinson, P.N., Köhler, S., Bauer, S., Seelow, D., Horn, D., and Mundlos, S. (2008). The Human Phenotype Ontology: a tool for annotating and analyzing human hereditary disease. *Am. J. Hum. Genet.* *83*, 610–615.
18. Zanni, G., Cali, T., Kalscheuer, V.M., Ottolini, D., Barresi, S., Lebrun, N., Montecchi-Palazzi, L., Hu, H., Chelly, J., Bertini, E., et al. (2012). Mutation of plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 3 in a family with X-linked congenital cerebellar ataxia impairs Ca²⁺ homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *109*, 14514–14519.
19. Kruglyak, L., Daly, M.J., Reeve-Daly, M.P., and Lander, E.S. (1996). Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am. J. Hum. Genet.* *58*, 1347–1363.
20. Seelow, D., Schwarz, J.M., and Schuelke, M. (2008). Gene-Distiller—distilling candidate genes from linkage intervals. *PLoS ONE* *3*, e3874.
21. Schwarz, J.M., Rödelersperger, C., Schuelke, M., and Seelow, D. (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat. Methods* *7*, 575–576.
22. Hu, H., Wrogemann, K., Kalscheuer, V., Tzschach, A., Richard, H., Haas, S.A., Menzel, C., Bienek, M., Froyen, G., Raynaud, M., et al. (2009). Mutation screening in 86 known X-linked mental retardation genes by droplet-based multiplex PCR and massive parallel sequencing. *Hugo J* *3*, 41–49.
23. Ballif, B.C., Theisen, A., McDonald-McGinn, D.M., Zackai, E.H., Hersh, J.H., Bejjani, B.A., and Shaffer, L.G. (2008). Identification of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16q11.2q12.2. *Clin. Genet.* *74*, 469–475.
24. Duker, A.L., Ballif, B.C., Bawle, E.V., Person, R.E., Mahadevan, S., Alliman, S., Thompson, R., Traylor, R., Bejjani, B.A., Shaffer, L.G., et al. (2010). Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* *18*, 1196–1201.
25. Marvizón, J.C., Pérez, O.A., Song, B., Chen, W., Bunnett, N.W., Grady, E.F., and Todd, A.J. (2007). Calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1 in the rat dorsal horn: localization in glutamatergic presynaptic terminals containing opioids and adrenergic alpha2C receptors. *Neuroscience* *148*, 250–265.
26. Ogino, K., Ramsden, S.L., Keib, N., Schwarz, G., Harvey, R.J., and Hirata, H. (2011). Duplicated gephyrin genes showing distinct tissue distribution and alternative splicing patterns mediate molybdenum cofactor biosynthesis, glycine receptor clustering, and escape behavior in zebrafish. *J. Biol. Chem.* *286*, 806–817.
27. Wieacker, P., Wolff, G., and Wienker, T.F. (1987). Close linkage of the Wieacker-Wolff syndrome to the DNA segment DXYS1 in proximal Xq. *Am. J. Med. Genet.* *28*, 245–253.
28. Kloos, D.U., Jakubiczka, S., Wienker, T., Wolff, G., and Wieacker, P. (1997). Localization of the gene for Wieacker-Wolff syndrome in the pericentromeric region of the X chromosome. *Hum. Genet.* *100*, 426–430.
29. Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci.* *22*, 389–442.
30. Germiller, J.A., Lerner, A.L., Pacifico, R.J., Loder, R.T., and Hensinger, R.N. (1998). Muscle and tendon size relationships in a paralyzed chick embryo model of clubfoot. *J. Pediatr. Orthop.* *18*, 314–318.
31. Lombard, Z., Park, C., Makova, K.D., and Ramsay, M. (2011). A computational approach to candidate gene prioritization for X-linked mental retardation using annotation-based binary filtering and motif-based linear discriminatory analysis. *Biol. Direct* *6*, 30.
32. Holman, S.K., Morgan, T., Baujat, G., Cormier-Daire, V., Cho, T.J., Lees, M., Samanich, J., Tapon, D., Hove, H.D., Hing, A., et al. (2013). Osteopathia striata congenita with cranial sclerosis and intellectual disability due to contiguous gene deletions involving the WTX locus. *Clin. Genet.* *83*, 251–256.
33. Venselaar, H., Te Beek, T.A., Kuipers, R.K., Hekkelman, M.L., and Vriend, G. (2010). Protein structure analysis of mutations

- causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* 11, 548.
34. Gibson, J.H., Williamson, S.L., Arbuckle, S., and Christodoulou, J. (2005). X chromosome inactivation patterns in brain in Rett syndrome: implications for the disease phenotype. *Brain Dev.* 27, 266–270.
35. Pellegrino, M.W., Gasser, R.B., Sprenger, F., Stetak, A., and Hajnal, A. (2009). The conserved zinc finger protein VAB-23 is an essential regulator of epidermal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 336, 84–93.
36. Pellegrino, M.W., Farooqui, S., Fröhli, E., Rehrauer, H., Kaeser-Pebernard, S., Müller, F., Gasser, R.B., and Hajnal, A. (2011). LIN-39 and the EGFR/RAS/MAPK pathway regulate *C. elegans* vulval morphogenesis via the VAB-23 zinc finger protein. *Development* 138, 4649–4660.
37. Pasterkamp, R.J. (2012). Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 605–618.
38. Dieterich, K., Quijano-Roy, S., Monnier, N., Zhou, J., Fauré, J., Smirnow, D.A., Carlier, R., Laroche, C., Marcorelles, P., Mercier, S., et al. (2013). The neuronal endopeptidase ECEL1 is associated with a distinct form of recessive distal arthrogryposis. *Hum. Mol. Genet.* 22, 1483–1492.
39. McMillin, M.J., Below, J.E., Shively, K.M., Beck, A.E., Gilderleeve, H.I., Pinner, J., Gogola, G.R., Hecht, J.T., Grange, D.K., Harris, D.J., et al.; University of Washington Center for Mendelian Genomics. (2013). Mutations in ECEL1 cause distal arthrogryposis type 5D. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 150–156.

Servane ALIROL

**Étude génétique du complexe synaptique lié
au récepteur NMDA et caractérisation de
modèles à complexité variable dans l'autisme**

L'autisme est un trouble du développement du système nerveux central défini par des altérations des interactions sociales et de la communication, et par des comportements restreints et répétitifs. Sa prévalence est actuellement évaluée jusqu'à 1% dans la population générale. L'autisme est caractérisé par une grande hétérogénéité sur les plans phénotypiques et génétiques. À ce jour, plus de 300 gènes candidats ont été caractérisés soit par des variations du nombre de copies (CNV) et/ou des variations nucléotidiques (SNV). Leur identification a permis de mettre en évidence une contribution significative de mutation *de novo*, ainsi que l'implication de voies physiopathologiques cibles, en particulier la densité post-synaptique (PSD).

Le travail de cette thèse a consisté à effectuer une étude génétique globale sur environ 100 sujets autistes représentant 88 familles, afin d'évaluer d'une part la contribution de CNV par l'approche de CGH array à haute résolution, et d'autre part, pour identifier des mutations au sein d'une série de 216 gènes codant les protéines du complexe post-synaptique lié au récepteur NMDA (NRC/MASC) grâce à de la capture ciblée d'exons et du séquençage à haut-débit.

Cette approche complémentaire a permis de définir de nouveaux gènes et nouvelles régions candidat(e)s, ou de répliquer leur implication dans l'autisme. Nos résultats démontrent en outre que la présence de modèles génétiques faisant interagir des variants *de novo* et/ou hérités s sont retrouvés spécifiquement associés à l'autisme et absents dans la déficience intellectuelle.

Mot clés : Autisme, variation du nombre de copies, protéome synaptique, modèle génétique multi-hit, séquençage à haut-débit

Autism is a developmental disorder of the central nervous system defined by impairments in social interaction and communication, and by restricted and repetitive behavior. Its prevalence is currently estimated at around 1% in the general population. Autism is characterized by a wide heterogeneity at both phenotypic and genetic level. To date, more than 300 candidate genes were characterized either by copy number variations (CNV) and/or nucleotide variations (SNV). Their identification has highlighted a significant contribution of *de novo* mutations, as well as the involvement of targeted pathophysiological pathways, particularly post-synaptic density (PSD).

The work of this thesis was to perform a global genetic study of about 100 autistic individuals representing 88 families, in order to assess both the contribution of CNV by high-resolution pangenomic CGH array and secondly to identify mutations among 216 genes coding protein from post-synaptic complex bound to NMDA receptor (NRC/MASC), with high-throughput targeted sequencing.

This complementary approach allowed us to identify new candidate genes and regions, or reproduce their involvement in autism. Our results further demonstrate that the presence of genetic model that involve interactions between *de novo* and/or rarely inherited are found specifically associated with autism and absent in the intellectual disability.

Keywords: Autism, copy number variations, post-synaptic proteome, multi-hit genetic model, high-throughput sequencing