

ÉCOLE DOCTORALE SST

INSERM 930 équipe 2

THÈSE présentée par :

Caroline MICHELLE BLANC-TAILLEUR

soutenue le : **jeudi 17 décembre 2009**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Génétique et neurosciences

Les enzymes de conjugaison à l'ubiquitine dans l'autisme

THÈSE dirigée par :
Pr Christian ANDRES

PU-PH, Université François-Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :
Pr Michel SIMONNEAU
Pr Alain KITZIS

PU, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Paris
PU-PH, UFR Médecine-Pahrmacie, Poitiers

JURY :
Pr Thierry MOREAU
Dr Frédérique BONNET-BRILHAULT
Pr Christian ANDRES

PR, Université François-Rabelais, Tours
MCU-PH, Université François-Rabelais, Tours
PU-PH, Université François-Rabelais, Tours

A ma petite grand-mère

Remerciements

Ils me font l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse :

Le Professeur Michel Simonneau, spécialiste en neurobiologie et neurogénétique au sein de l'unité INSERM U675, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Université Paris Diderot-Paris 7 (Paris).

Le Professeur Alain Kitzis, généticien spécialiste des mécanismes d'adressage et de signalisation au sein de l'unité UPRES-EA 2622, Laboratoire de Génétique Cellulaire et Moléculaire du CHU de Poitiers (Poitiers).

Ils me font l'honneur d'être examinateurs de cette thèse :

Le Professeur Thierry Moreau, biochimiste responsable de l'équipe 1 « Protéases et Pathologies Pulmonaires » de l'unité INSERM U618, Université François-Rabelais (Tours).

Le Docteur Frédérique Bonnet-Brilhault, physiologiste-psychiatre au sein de l'équipe 1 « Autisme et troubles du développement » de l'unité INSERM U930, Université François-Rabelais (Tours).

Le Professeur Christian Andres, neurobiologiste spécialisée en biochimie et biologie moléculaire au sein de l'équipe 2 « Génétique de l'autisme et de la déficience mentale » de l'unité INSERM U930, Université François-Rabelais (Tours).

Je remercie le Professeur Denis Guilloteau de m'avoir accueillie au sein de son unité, ainsi que tout le personnel des laboratoires de biochimie et de génétique pour leur aide technique dans la réalisation de ce travail.

Mes premiers remerciements sont évidemment adressés au Pr Christian Andres, mon directeur de thèse, qui a cru en moi dès notre premier entretien malgré mon profil particulier et qui a tout mis en œuvre pour que je puisse effectuer cette thèse au sein de son laboratoire. J'espère ne pas avoir trop souvent déçu cette confiance. Malgré vos nombreuses activités vous avez toujours su vous rendre disponible en cas de nécessité. Vos discussions sont toujours une grande source de réflexion, chaque rencontre remotivait les efforts à fournir pour poursuivre ces travaux. D'un point de vue plus humain vous vous êtes également toujours montré soucieux de nos conditions de vie au sein de votre équipe, en veillant à ce que venir chaque matin reste toujours un plaisir. Je vous suis infiniment reconnaissante pour ces 3 ans et demi passés au sein de votre équipe. Je vous remercie enfin sincèrement d'avoir accepté de participer à un événement très important de ma vie personnelle, qui se renouvelle aujourd'hui par votre présence à mes côtés en ce jour si important pour ma vie professionnelle.

J'adresse également toute ma gratitude au Dr Patrick Vourc'h, sans qui ces travaux n'auraient jamais pu être menés. Tête pensante indispensable du laboratoire, tu as toujours été présent, pour tout le monde, pour toutes les questions, tous les problèmes, toutes les bonnes et mauvaises nouvelles. Tu donnes ton temps et ton énergie sans compter, avec une bonne humeur sans faille. Tes qualités professionnelles n'ont d'égales que tes qualités personnelles, ce qui n'est pas peu dire. Je te remercie sincèrement pour tout le temps que tu m'as accordé, ta gentillesse, tes conseils et ton soutien face à toutes les épreuves.

Je remercie du fond du cœur « les filles », Rose-Anne, Cathy et Sylviane, pour leur aide, leurs conseils, leur bonne humeur. Vous m'avez soutenue dans mon travail, mais aussi dans mes problèmes de tous les jours. Merci pour toutes ces discussions, les pauses café du matin, les midis en salle de réunion, les mercredis resto ; sans votre bonne humeur cette thèse n'aurait jamais pu être menée à bout. Merci d'avoir accepté de partager tous ces grands événements de ma vie. Je regrette de ne pas rester plus longtemps parmi vous rien que pour votre présence, mais je reviendrai, notamment pour t'encourager Sylviane lors de ta soutenance !

Je remercie également le Dr Frédéric Laumonier pour son soutien et sa sympathie. Tu as toujours été de bon conseil et tu m'as permis d'avoir de nouveaux points de vue sur mon sujet d'étude, ce qui a enrichi mon travail. Je suis ravie d'être restée suffisamment longtemps au sein du laboratoire pour avoir eu le temps de te connaître, et je te souhaite tout le bonheur que tu mérites dans ta nouvelle vie de papa.

Une pensée amicale pour notre petite Julie, nouvelle doctorante venue prendre la relève, avec qui j'ai pu partager ces quelques mois. Je te souhaite plein de courage pour tes travaux, de la persévérance et une petite dose de chance pour ta thèse qui sera, je n'en doute pas, pleinement réussie.

Enfin un grand merci pour « mes petites mains », « mes » stagiaires, tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ces résultats. Mes premières pensées vont forcément vers toi Agathe, parce que tu es la dernière mais aussi et surtout parce que tu es celle avec qui je me suis le plus liée. Merci d'être venue me tenir compagnie dans mon bureau et d'avoir largement contribué à l'aboutissement de cette thèse, merci pour tout ton travail, ton dynamisme et ton investissement dans le projet. Ta présence aura été un vrai rayon de soleil pour éclairer cette fin de thèse et j'espère en faire au moins autant pour toi si tu as un jour besoin de moi. Mais je remercie également les stagiaires passés qui ont travaillé sur ce sujet, avec une pensée pleine d'affection pour ma pétillante Saskya qui a, elle aussi, débordé d'énergie pour m'aider dans mon travail, et un petit clin d'œil particulier à Mélina et à Gaëlle, témoins de mes grands événements professionnels et familiaux...

Parce qu'une thèse n'est pas seulement le reflet du travail d'un seul doctorant, mais de toute une équipe qui le soutient, l'encourage, le conseille, le réoriente, l'assiste, j'espère par cette thèse vous faire tous les honneurs que vous méritez.

Résumé

L'autisme est une pathologie neurodéveloppementale impliquant des facteurs génétiques. Nous avons utilisé une stratégie d'étude de gènes candidats choisis pour leur rôle clé dans la voie de l'ubiquitine, impliquée dans des mécanismes de neurogénèse ou de plasticité synaptique mis en cause dans l'autisme.

L'identification des 37 enzymes de conjugaison à l'ubiquitine E2 humaines, groupées en 17 familles, a permis de sélectionner 6 enzymes pour mener une recherche de mutation chez 195 autistes : *UBE2H*, *UBE2A*, *UBE2K*, *UBE2I*, *UBE2N*, *UBE2E3*.

Aucune mutation n'a été détectée dans notre population d'autistes, et aucune preuve génétique n'a pu impliquer les gènes *UBE2K*, *UBE2A* et *UBE2N*. En revanche des associations significatives ont été mises en évidence avec des polymorphismes des gènes *UBE2E3*, *UBE2I* et *UBE2H*.

Des études *in vitro* ont mis en évidence les rôles importants d'enzymes E2 lors de la neurogénèse : *UBE2H* favorise la prolifération des cellules souches neurales (CSN) tout en empêchant la différenciation neuronale, tandis qu'*UBE2A* modifie la différenciation des CSN par une augmentation de la taille des neurites.

Ces résultats de génétique humaine apportent des arguments en faveur d'une conception polygénique de la pathologie autistique et militent pour l'implication forte de la voie de l'ubiquitinylation dans cette pathologie. Ces données sont complétées par des observations d'autres équipes allant dans le même sens, et s'intègrent dans les mécanismes déjà identifiés de régulation de la traduction (*FMRI*) et de la plasticité synaptique (protéines des complexes synaptiques). Nos résultats devraient contribuer, nous l'espérons, à dessiner une vision plus synthétique des mécanismes moléculaires impliqués dans la pathologie autistique.

Mots-clés :

autisme, enzymes de conjugaison à l'ubiquitine E2, phylogénèse, *UBE2K*, *UBE2A*, *UBE2I*, *UBE2N*, *UBE2H*, *UBE2E3*, criblage génétique, étude d'association, étude de déséquilibre de transmission, étude haplotypique, cellules souches neurales, profil d'expression, surexpression plasmidique, TNF-alpha

Résumé en anglais

Autism is a neurodevelopmental disorder involving genetic factors. We use a candidate genes strategy selected for their key role in the ubiquitin pathway involved in mechanisms of neurogenesis and synaptic plasticity implicated in autism.

Identification of the 37 human ubiquitin conjugating enzymes E2, grouped into 17 families, helped to select 6 enzymes to conduct a mutation screening in 195 autistic patients: *UBE2H*, *UBE2A*, *UBE2K*, *UBE2I*, *UBE2N*, *UBE2E3*.

No mutation was detected in our autistic population, and no genetic evidence could involve *UBE2K*, *UBE2A* and *UBE2N* genes. However significant associations were identified with polymorphisms from *UBE2E3*, *UBE2I* and *UBE2H* genes.

In vitro studies highlighted the important role of E2 enzymes during neurogenesis: *UBE2H* promotes the proliferation of neural stem cells (NSC) while preventing neuronal differentiation, while *UBE2A* alters differentiation of NSC by increasing the neurites size.

Researches therefore remain encouraged by these very promising initial results.

These results of human genetic make arguments in favor of a polygenic idea of autism and advocate for stronger involvement of the ubiquitin pathway in this pathology. These data are supplemented by comments from other teams in the same direction and fit into the already identified mechanisms of regulation of translation (*FMRI*) and synaptic plasticity (proteins of synaptic complexes). We hope that our results should contribute to draw a more synthetic vision of the molecular mechanisms involved in autism.

Keywords:

autism, ubiquitin conjugating enzymes E2, phylogeny, *UBE2K*, *UBE2A*, *UBE2I*, *UBE2N*, *UBE2H*, *UBE2E3*, genetic screening, association study, transmission disequilibrium test, haplotype study, neural stem cells, expression profiling, plasmid overexpression, TNF-alpha

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	6
Résumé en anglais	7
Table des matières	8
Liste des tableaux	13
Liste des figures	14
Liste des annexes.....	17
Liste des abréviations	18
Introduction	21
Introduction sur l'autisme	22
Historique	22
Définition	24
L'hétérogénéité de la pathologie	27
Les troubles envahissants du développement (TED) : complexité d'une classification	28
Épidémiologie	29
Données anatomopathologiques.....	30
Le volume cérébral.....	32
Le cervelet	32
Les régions corticales	34
Le lobe frontal	34
Le lobe temporal.....	35
Le tronc cérébral.....	35
Le système limbique.....	36
Le corps calleux	36
Anomalies neurochimiques : de grandes controverses	37
Le système dopaminergique.....	37
Le système adrénergique	38
Le système sérotoninergique	39
Le système glutamatergique.....	41
Le système GABAergique	42
Le système cholinergique.....	42
Le système opioïde.....	43

L'ocytocine.....	44
Le cortisol.....	44
Les traitements de l'autisme.....	45
Les médicaments	45
Les psychothérapies	46
Les traitements comportementaux	46
Les méthodes éducatives	46
Les autres méthodes	47
Étiologie du syndrome autistique.....	48
Causes psychopathologiques.....	48
Causes <i>in utero</i>	49
Causes périnatales	52
Causes immunitaires	52
Génétique de l'autisme.....	53
Les arguments en faveur d'une étiologie génétique.....	53
Les stratégies de recherche directe de gènes impliqués dans l'autisme	60
Les méthodes d'exploration	61
Conclusion sur ce chapitre génétique.....	72
Les modèles animaux	76
Les systèmes ubiquitine et ubiquitine-like	78
La voie de l'ubiquitinylation	78
La réaction d'ubiquitinylation.....	78
L'ubiquitine et ses apparentées	81
Les enzymes de la voie de l'ubiquitine	83
Le rôle fonctionnel de l'ubiquitinylation	84
La voie de sumoylation	85
Les différentes isoformes de SUMO.....	85
La réaction de sumoylation	86
La régulation de la sumoylation	87
Le rôle fonctionnel de la sumoylation.....	88
Le système ubiquitine dans l'autisme	90
Maladies neurodéveloppementales	92
<i>UBE3A</i>	92
<i>UBE2A</i>	92

Maladies neurologiques.....	93
Mécanismes pouvant être impliqués dans l'autisme	93
Les enzymes de conjugaison à l'ubiquitine.....	95
Matériel et méthodes	98
Étude phylogénétique des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine	99
Recherche par Blastp.....	99
Alignement des séquences par ClustalW	99
Algorithmes de phylogénie : NJ, ML, MP, BI.....	99
Calcul d'arbre consensus par le programme Consense.....	99
Criblage de gènes candidats par séquençage de l'ADN génomique.....	99
Les populations étudiées	99
L'extraction d'ADN	99
Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction, ou PCR).....	99
Séquençage : cycle, purification puis passage sur le séquenceur et analyse des résultats ...	99
Calculs statistiques	99
Étude d'association	99
Étude de déséquilibre de transmission	99
Étude haplotypique.....	99
Test de Student	99
Test de Mann-Whitney.....	99
Cultures cellulaires de cellules souches neurales	99
Prélèvements de mésencéphales d'embryons de rat	99
Mise en culture pour la prolifération et la différenciation	99
RT-qPCR.....	99
Extraction d'ARN totaux	99
Transcription inverse (ou RT)	99
Réaction de polymérisation en chaîne semi-quantitative, ou qPCR	99
Clonage des gènes <i>UBE2A</i> et <i>UBE2H</i> dans des vecteurs plasmidiques	99
Transfection des cellules souches neurales	99
Immunocytochimie par marquage de la β -III tubuline.....	99
Modélisation moléculaire de la protéine UBE2A et de son mutant c.382C>T.....	99
Résultats	99
Étude des enzymes de conjugaison du système ubiquitine	99
Position du problème.....	99

Résultats	99
Recherche des E2 connues chez l'homme ainsi que chez six autres espèces (<i>M. musculus</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>C. elegans</i> , <i>S. pombe</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>A. thaliana</i>)	99
Regroupement des enzymes E2 en familles	99
Manuscrit 1	99
Choix des gènes candidats de la superfamille des E2 dans l'autisme	99
<i>UBE2H</i>	99
<i>UBE2A</i>	99
<i>UBE2N</i>	99
<i>UBE2I</i>	99
<i>UBE2K</i>	99
<i>UBE2E3</i>	99
Criblage des gènes candidats dans l'autisme	99
Mise au point des amplifications et recherche de variants	99
Recherche de mutations par identification des variants détectés	99
Études d'association et de déséquilibre de liaison	99
Position du problème	99
Résultats	99
Position du problème	99
Résultats	99
Expression d'UBE2H et neurogénèse	99
Position du problème	99
Résultats	99
Étude du profil d'expression d'UBE2H au cours du développement dans le cerveau de rat	99
Étude du profil d'expression d'UBE2H au cours de la différenciation des cellules souches neurales	99
Effet du TNF-alpha sur l'expression d'UBE2H dans des cultures de cellules souches neurales en différenciation	99
Étude <i>in vitro</i> des effets d'une surexpression d'UBE2H sur des cultures de cellules souches neurales	99
Étude du profil d'expression d'UBE2A au cours de la différenciation des cellules souches neurales	99
Position du problème	99

Résultats	99
Étude du profil d'expression d' <i>UBE2A</i> au cours de la différenciation des CSN.....	99
Etude <i>in vitro</i> des effets d'une surexpression d' <i>UBE2A</i> sur des cultures de cellules souches neurales en différenciation.....	99
Modélisation de la protéine UBE2A	99
Discussion	99
Analyse phylogénomique des E2	99
Criblage génétique des gènes E2 candidats dans l'autisme	99
Études <i>in vitro</i>	99
Perspectives	99
Exploration <i>in silico</i> du système ubiquitine	99
Exploration génétique du système ubiquitine	99
Exploration <i>in vitro</i> du système ubiquitine	99
Conclusion	99
Résumé.....	99
Résumé en anglais	99

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques cliniques décrites par Kanner en 1943 sur la base de l'étude de onze enfants autistes.....	22
Tableau 2 : Questionnaire de diagnostic F84.0 (299.00) du syndrome autistique établi par le DSM-IV.....	26
Tableau 3 : Tableau comparatif des deux principales classifications utilisées pour la description des troubles envahissants du développement.	29
Tableau 4 : Liste des ubiquitons connus à ce jour (le nom correspond à celui donné chez les mammifères, les synonymes apparaissent entre parenthèses). * ISG15 / UCRP et FAT10 contiennent chacun deux sous-unités (Extrait de Welchman <i>et al.</i> , 2005).	82
Tableau 5 : Rôles des protéines de la voie de l'ubiquitine dans les pathologies humaines (extrait de Ying <i>et al.</i> , 2009).	91
Tableau 6 : Bilan de la mise au point des amplifications par PCR des exons de chacune des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine étudiées et résultats du séquençage de l'ADN de 195 patients autistes.	99
Tableau 7 : Tableau synthétique de la nomenclature attribuée aux nouveaux variants détectés dans nos populations.	99

Liste des figures

Figure 1 : Schéma du cerveau humain permettant la localisation de différentes régions d'intérêt dans l'autisme.	31
Figure 2 : Schéma d'une coupe saggitale du cerveau humain permettant la localisation des principales structures d'intérêt dans l'autisme.	31
Figure 3 : Régions du chromosome 15 potentiellement impliquées dans l'autisme (extrait de Folstein et Rosen-Sheidley, 2001). Schéma du chromosome 15 indiquant la position des gènes de la région 15q11-q13, incluant ceux des régions critiques pour les syndromes d'Angelman (AS) et de Prader-Willi (PWS) chevauchant la zone candidate pour l'autisme.	57
Figure 4 : Représentation générale de toutes les régions cytogénétiques d'intérêt (CROIs: Cytogenetic regions Of Interest) associées à l'autisme (extrait de Vorstman <i>et al.</i> , 2006). A gauche des chromosomes : les régions liées (Lod score > 2) sont représentées par des traits bleus, celles associées ($P < 0,05$) par des traits rouges. A droite des chromosomes : les barres verticales représentent les CROIs ; les barres de même couleur indiquent que cette CROI a été rapportée plus qu'une fois dans la littérature. Les rectangles rouges indiquent les nouvelles régions d'intérêt potentiel quand un locus commun est rapporté plus de quatre fois associé à des anomalies chromosomiques, sans qu'il soit préalablement lié ou associé.	63
Figure 5 : Répartition génomique des CNV dans l'autisme (extrait de Marshall <i>et al.</i> , 2008). Les CNV issus de la base de données ACRD (Autism Chromosome Rearrangement Database) sont en noir. Les CNV issus de données strictement spécifiques de l'autisme répertoriés par l'équipe de Marshall sont à gauche des chromosomes (couleur légendée). Les étoiles rouges soulignent la présence de cinq CNV appartenant à la fois aux catégories <i>de novo</i> et récurrents.	65
Figure 6 : La « nébuleuse » des TED mettant en évidence la complexité des phénotypes, avec des limites floues et se chevauchant.	73
Figure 7 : Schéma des caractéristiques étiologiques possibles (cercles bleus) et de l'hétérogénéité clinique ou syndromique (cercles verts) dans les troubles du spectre autistique ; les processus neurodéveloppementaux qui pourraient être perturbés figurent dans la boîte centrale fléchée (Geschwind et Levitt, 2007).	75
Figure 8 : Schéma du principal mécanisme d'ubiquitylation aboutissant à la dégradation par le protéasome.	79

Figure 9 : Schéma des différents mécanismes possibles d'ubiquitinylation du substrat après prise en charge de l'ubiquitine par l'enzyme E2. (1) Transfert direct de l'ubiquitine par l'enzyme E2 sur la protéine cible (signalisation d'adressage par monoubiquitinylation du substrat) ; (2) Transfert à une enzyme E3 responsable de la reconnaissance du substrat (E3 de type HECT) ; (3) Formation d'un complexe avec les enzymes E2 et E3 (E3 de type RING). Les voies (2) et (3) permettent d'aboutir à la polyubiquitinylation de la protéine cible en vue de son marquage pour une dégradation via le protéasome 26s.....	80
Figure 10 : Séquences en acides aminés de la molécule d'ubiquitine à travers différentes espèces eucaryotes. Les barres rouges mettent en évidence la position des résidus lysines, les cadres jaunes soulignent la présence des rares variations. Avec <i>H. sapiens</i> l'homme, <i>C. elegans</i> le ver nématode, <i>A. thaliana</i> la plante, et <i>Triticum</i> le blé.....	81
Figure 11 : Superposition de la structure 3D schématique de l'ubiquitine (bleu), SUMO-1 (vert) et NEDD8 (rouge) mettant en évidence la forte homologie de structure entre ces ubiquitons (extrait de Welchman <i>et al.</i> , 2005).	83
Figure 12 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine. Les boucles sont notées de L1 à L8 ; les feuillets β sont notés de S1 à S4 ; et les hélices sont notées de H1 à H4 (avec « h » une petite hélice 3/10 fréquemment conservée). Adapté de la structure d'UBE2D2 (code pdb E2SK), et légendé selon Winn <i>et al.</i> , 2004.....	95
Figure 13 : Schéma du gène <i>UBE2H</i>	99
Figure 14 : Schéma du gène <i>UBE2A</i>	99
Figure 15 : Schéma du gène <i>UBE2N</i>	99
Figure 16 : Schéma du gène <i>UBE2I</i>	99
Figure 17 : Environnement génomique du gène <i>UBE2I</i> (D'après Ensembl version 56)	99
Figure 18 : Schéma du gène <i>UBE2K</i>	99
Figure 19 : Schéma du gène <i>UBE2E3</i>	99
Figure 20 : Environnement génomique du gène <i>UBE2E3</i> (D'après Ensembl version 56). L'étoile orange symbolise la localisation du point de cassure observée chez un patient autiste (Conroy <i>et al.</i> , 2009).....	99
Figure 21 : Schémas reprenant la localisation génomique de tous les polymorphismes trouvés dans notre étude.....	99
Figure 22 : Profil d'expression relative d' <i>UBE2A</i> par rapport à l'expression du gène GAPDH au cours de la différenciation des CSN d'embryons de rats (n = 10), au stade neurosphères et après 2 et 7 jours de différenciation.	99

- Figure 23 : Effets d'une surexpression d'*UBE2A* sur la croissance des neurites à partir de CSN transfectées par la GFP (A) ou co-transfectées par la GFP et un plasmide permettant la surexpression d'*UBE2A* (B) (échelle de taille : 20 μ m). (C) Taille du plus long neurite des cellules GFP⁺/ β -III tubuline⁺ après surexpression d'*UBE2A* (n = 3 expériences ; * p < 0,05 par le test de Mann-Whitney)..... 99
- Figure 24 : Modèle tridimensionnel de la protéine UBE2A obtenu à partir de la structure 3D d'UBE2B (PDB : 1jas). (A) Modèle tridimensionnel d'UBE2A. (B) Agrandissement de la zone du site actif d'UBE2A. La cystéine active Cys 88 est représentée en vert, la présence d'une serine phosphorylable Ser 120 en mis en évidence en rouge..... 99
- Figure 25 : Modélisation de la structure tridimensionnelle de la protéine UBE2A et de son mutant c.382C>T. La modélisation a été réalisé grâce au serveur Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>) et visualisé grâce au logiciel Pymol (<http://pymol.org/>) ; le cercle rose permet de localiser le site actif. 99
- Figure 26 : Immunocytochimie anti β 3-tubuline et anti PSD-95 à J4, J8 et J17 (cultures de neurones de souris). Les flèches indiquent la localisation des épines dendritiques. Barre d'échelle = 50 μ m..... 99
- Figure 27 : Cluster hiérarchique représentant la classification des E2 étudiées en fonction de leur profil d'expression relative au cours du temps basé sur la méthode de calcul des $\Delta\Delta$ Cp normalisée à J4. 99

Liste des annexes

Annexes	99
Annexe 1 : Plasmide pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen®) utilisés pour la réalisation du clonage d' <i>UBE2H</i>	99
Annexe 2 : Plasmide pcDNA3.1/v5-His-TOPO (Invitrogen®) utilisé pour la réalisation du clonage d' <i>UBE2A</i>	99
Annexe 3 : Conditions de PCR des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine étudiées (amorces et Tm)	99
Annexe 4 : Amorces utilisées pour les réactions de PCR quantitatives spécifiques des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine étudiées	99
Annexe 5 : Amorces utilisées pour le clonage des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine étudiées.....	99
Annexe 6 : Publications et communications scientifiques	99

Liste des abréviations

3D : tridimensionnelle
5-HIAA : acide 5-hydroxyindole acétique
5-HT : sérotonine (5-hydroxytryptamine)
5-HTP : 5-hydroxytryptophane
ACh : acétylcholine
ACRD : Autism Chromosome Rearrangement Database
ACTH : hormone adréno-corticotropine
ADI : Autism Diagnostic Interview
ADI-R : Autism Diagnostic Interview-Revised
ADN : acide desoxiribonucléique
ADOS-G : Autism Diagnostic Observation Schedule-Generic
AGP : Autism Genome Project
AGRE : Autism Genetic Resource Exchange
ARN : acide ribonucléique
ASD : Autism Spectrum Disorder
ATP : adénosine triphosphate
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor
BSA : sérum-albumine bovine
BSE-R : Behavioral Summarized Evaluation-Revised
CARS : Childhood Autism Rating Scale
CDCP : Centre for Disease Control and Prevention
CGH-m : hybridation génomique comparative basée sur la matrice
CIM-10 : classification internationale des maladies version 10 (ou ICD-10 pour International Classification of Diseases)
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CNTNAP2 : contactin-associated protein-like 2
CNV : variation du nombre de copies (Copy Number Variant)
CROI : région cytogénétique d'intérêt (Cytogenetic region Of Interest)
CSN : cellules souches neurales
DA : dopamine
DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole

DBH : dopamine β hydroxylase,
ddl : degré de liberté
DOPAC : acide 3,4-dihydroxyphénylacétique
DSM : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DTT : dithiotréitol
DUB : enzymes désubiquitylantes
EDTA : acide éthylènediamine tétraacétique
EGF : Epidermal Growth Factor
GABA : acide gamma-aminobutyrique
GAD : acide glutamique décarboxylase
GTS : gyrus temporal supérieur
GWLA : études de criblage sur génome entier (Genome-wide linkage analysis)
HECT : Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
HSP : Heat Shock Protein
HVA : acide homovanillique
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
INSERM : Institut national de la santé et de la recherche médicale
IRM : imagerie par résonance magnétique
IRS : inhibiteurs de la recapture de la sérotonine
LCR : liquide céphalo-rachidien
MeCP2 : methyl-CpG-binding protein
MHPG : 3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol
MS-PCR : PCR spécifiques de la méthylation (methylation-specific PCR)
NA : noradrénaline (ou norépinephrine)
NGF : facteur de croissance nerveuse
NK : cellule tueuse (natural killer)
pb : paire de bases
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
PDB : Protein Data Bank
PDSM : motif de sumoylation dépendant de la phosphorylation
PML : leucémies promyélocytiques nucléaires
PSD : densité post-synaptique
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

PWS/AS : Prader-Willi Syndrome/Angelman Syndrome
qPCR : Réaction de polymérisation en chaîne semi-quantitative
RING : Really Interesting New Gene
ROR : rougeole-oreillons-rubéole
ROS : reactive oxygen species
RT : Transcription inverse
SBM : motifs de liaison à SUMO
SNC : système nerveux central
SNP : variation nucléotidique unique
STS : sillon temporal supérieur
SUMO : small ubiquitin-related modifier
T3 : triiodothyronine
T4 : thyroxine
TDT : test de déséquilibre de transmission
TED : Troubles Envahissants du Développement
TED-NS : trouble envahissant du développement non spécifié (ou PDD-NOS pour Pervasive Developmental Disorder - Not Otherwise Specified)
TNF-alpha : Tumor Necrosis Factor-alpha
TOC : trouble obsessionnel compulsif
TSC : sclérose tubéreuse de Bourneville (Tuberous Sclerosis Complex)
Ub : ubiquitine
Ubl : ubiquitin-like
UEV : variant des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine (Ub-conjugating Enzyme Variant)
UTR : région non traduite (untranslated region)
VMA : acide vanillyl-mandélique
WGA : Whole Genome Association

Introduction

Introduction sur l'autisme

Historique

Le psychiatre suisse Eugen Bleuler fut le premier à employer le terme « autisme » (ou plus exactement « autismus », en allemand) dans un article de 1911 pour parler du retrait social observé chez des adultes schizophrènes ; il désigna ainsi ce repli sur soi par le terme « autisme », issu du grec « autos », qui signifie soi-même. C'est ainsi que l'autisme fut le premier des troubles envahissants du développement à être nommé. Il a cependant fallu attendre quarante ans pour qu'en 1943, Leo Kanner, médecin pédopsychiatre d'origine austro-hongroise, formé à Berlin et vivant aux Etats-Unis, soit le premier à faire une description clinique de l'autisme basée sur l'observation de onze enfants. L'autisme apparaît ainsi comme une « inaptitude des enfants à établir des relations normales avec les personnes et à réagir normalement aux situations », accompagnée d'un « trouble du contact affectif », et apparaissant dès le début de la vie (Kanner, 1943).

Interactions sociales	Incapacité à interagir avec des personnes, notamment des membres de la propre famille de l'enfant, dès le début de la vie.
Langage	Incapacité à développer la parole, ou utilisation anormale, essentiellement non-communicative du langage pour ceux qui parviennent à parler. Chez tous les enfants ayant acquis le langage (huit cas), on observe une inversion de l'utilisation des pronoms, accompagnée dans certains cas d'écholalie, d'un questionnement obsessionnel et d'une utilisation rituelle de la parole.
Comportement	Réactions anormales face aux objets environnementaux et aux événements, tels que la nourriture, les bruits forts et les objets en mouvement. Kanner constate que le comportement de l'enfant semble régi par un désir obsessionnel anxieux du maintien de l'uniformité, qui a conduit à une limitation de la diversité des activités spontanées.
Capacités intellectuelles	Bon potentiel cognitif avec une excellente mémoire reflex et des performances normales au test non-verbal de Seguin.
Santé physique	Etat physique normal. Plusieurs enfants ont une démarche maladroite, mais tous présentent une bonne coordination musculaire fine.

Tableau 1: Caractéristiques cliniques décrites par Kanner en 1943 sur la base de l'étude de onze enfants autistes.

Leo Kanner met en cause l'attitude et la qualité des contacts des parents envers leurs enfants ; il parle de mères froides, de pères absents. En cette fin de guerre, la conjoncture sociale est favorable à l'émergence de telles théories. Mais dès sa première publication, Kanner évoque des causes « innées » : « We must, then assume that these children have come into the world with innate inability to form the usual, biologically provided affective contact with people, just as other children come into the world with innate physical or intellectual handicaps. » (Kanner, 1943). Les études s'orientent sur les conséquences des carences de soins maternels pour les enfants orphelins élevés en pouponnière. En 1969, Bruno Bettelheim renforce cette théorie de la « mère réfrigérateur » et assimile les perturbations précoces de la relation mère-enfant au rejet maternel inconscient : un enfant devient autiste parce qu'il ne peut supporter son environnement menaçant qui manque d'amour.

Pendant longtemps cette idée du rôle prépondérant du comportement des parents restera la principale cause de cette apparente réaction de défense de l'enfant face à son environnement qu'il juge trop hostile, faisant de l'autisme une maladie purement psychologique et psychogène.

Progressivement l'évolution des mentalités va se faire, la classification européenne des maladies mentales sera jugée trop subjective : le diagnostic des maladies doit être inattaquable, y compris dans le domaine de la psychiatrie. En 1968, Rutter est le premier à proposer une approche plus scientifique de l'autisme avec une élaboration de réels critères diagnostiques. Pour tous les patients diagnostiqués autistes, les symptômes doivent apparaître avant l'âge de 3 ans et doivent correspondre à trois grandes catégories : problèmes de socialisation ; défauts de communication ; activités limitées et comportements rituels.

Cette démarche statistique, certes moins riche sur le plan intellectuel, mais objective et donc opposable notamment en cas de procès, remplace ainsi les tableaux cliniques. Pour être déclaré autiste, il est nécessaire de présenter un certain score, obtenu en cochant sur une liste préétablie. C'est donc en 1968 qu'apparaît le terme « autisme » dans la seconde édition du DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) ; il y est tout d'abord classifié comme une schizophrénie infantile. C'est dans la 3^{ème} version du DSM en 1980 que l'autisme est considéré comme une maladie à part entière et qu'il apparaît sous la dénomination « autisme infantile ». L'autisme, ainsi que trois autres pathologies, sont regroupés dans une nouvelle rubrique intitulée « Troubles Envahissants du Développement (TED) ».

C'est à la fin des années 70 que Rutter et Folstein effectuent la première étude génétique sur 21 paires de jumeaux répondant aux critères du DSM pour un diagnostic d'autisme et démontrent une forte implication génétique dans l'étiologie de l'autisme (Folstein et Rutter, 1977).

Définition

L'autisme est une maladie définie du point de vue du comportement, caractérisée par une altération de la communication, des interactions sociales, et de l'imagination, avec un champ d'intérêts restreint, et des comportements répétitifs et stéréotypés.

D'après le Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders version IV, ou DSM-IV, l'autisme est classé parmi les troubles envahissants du développement (TED). Envahissant dans la mesure où il affecte de nombreux aspects cognitifs et comportementaux, et développemental car les syndromes autistiques apparaissent au cours du développement, durant la petite enfance ou même dès la naissance, par définition avant 3 ans.

Concernant une définition des signes précoces de la maladie, les premiers symptômes repérables de l'autisme sont un regard fuyant, le corps qui se raidit ou reste sans réaction quand on porte l'enfant, les bras qui ne se tendent pas vers l'adulte qui s'occupe de lui (Johnson *et al.*, 2007). En grandissant, l'enfant s'isole, s'absorbe dans une tâche répétitive. La première impression est que l'enfant ne paraît pas entendre son entourage, mais le froissement d'une feuille peut le faire réagir de façon démesurée. La moitié des autistes n'apprennent jamais à parler, ni même à montrer du doigt ce qu'ils veulent. D'autres acquièrent le langage, mais un langage particulier, sous forme d'écholalie (répétition de ce qui vient d'être entendu) ou de phrases toutes faites, telles les slogans publicitaires. Le regard semble vide, mais chaque objet n'ayant pas été remis à sa place provoque un grand trouble. Les stimulations sensorielles (bruit, lumière, chaleur) sont perçues de façon disproportionnée, ce qui provoque soit une stimulation très intense, soit une absence de réaction. Ils sont parfois violents, envers les autres comme envers eux-mêmes, sans raison apparente. Seul un geste ou une parole, répété à l'infini, semble pouvoir les rassurer.

L'autisme répond actuellement à trois principaux critères communément appelés triade autistique :

- déficits des interactions sociales

- déficits de la communication verbale et gestuelle
- problèmes moteurs, stéréotypies, comportements répétitifs

Au cours de ces vingt dernières années, afin d'établir à partir de quel niveau de déficit il est possible de parler d'autisme, des échelles avec des cotations universelles ont été élaborées, permettant notamment de constituer les cohortes qui font l'objet d'études d'associations génétiques. Il existe ainsi le Childhood Autism Rating Scale (CARS) (Schopler *et al.*, 1980), l'Autism Diagnostic Interview (ADI) et l'Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) (Lord *et al.*, 1994), et l'Autism Diagnostic Observation Schedule-Generic (ADOS-G) (Lord *et al.*, 2000). En parallèle à ces échelles d'évaluation d'autres outils peuvent être utilisés, telle que la BSE-R (Behavioral Summarized Evaluation-Revised) (Barthélémy *et al.*, 1997) développée dans notre unité INSERM. Toutes ces évaluations sont basées sur les critères recensés dans le DSM-IV et la classification internationale des maladies version 10 (CIM-10, ou ICD-10 pour International Classification of Diseases).

Le questionnaire de diagnostic F84.0 (299.00) du syndrome autistique établi par le DSM-IV est le suivant :

A. Un total de six (ou plus) parmi les éléments décrits en (1), (2) et (3), dont au moins deux de (1), un de (2) et un de (3) :	(1) Altération qualitative des interactions sociales, comme en témoignent au moins deux des éléments suivants :	(a) altération marquée dans l'utilisation, pour réguler les interactions sociales, de comportements non verbaux multiples, tels que le contact oculaire, la mimique faciale, les postures corporelles, les gestes
		(b) incapacité à établir des relations avec les pairs correspondant au niveau de développement
		(c) le sujet ne cherche pas spontanément à partager ses plaisirs, ses intérêts, ou ses réussites avec d'autres personnes (par exemple, il ne cherche pas à montrer, à désigner du doigt ou à apporter les objets qui l'intéressent)
		(d) manque de réciprocité sociale ou émotionnelle
	(2) altération qualitative de la communication, comme en témoigne au moins un des éléments suivants :	(a) retard ou absence totale de développement du langage parlé (sans tentative de compensation par d'autres modes de communication, comme le geste ou la mimique)
		(b) chez les sujets maîtrisant suffisamment le langage, incapacité marquée à engager ou à soutenir une conversation avec autrui
		(c) usage stéréotypé et répétitif du langage, ou langage idiosyncrasique
		(d) absence d'un jeu de « faire semblant » varié et spontané, ou d'un jeu d'imitation sociale correspondant au niveau du développement
	(3) caractère restreint, répétitif et stéréotypé des comportements, des intérêts et des activités, comme en témoigne au moins un des éléments suivants :	(a) préoccupation circonscrite à un ou plusieurs centres d'intérêt stéréotypés et restreints, anormale soit dans son intensité, soit dans son orientation
		(b) adhésion apparemment inflexible à des habitudes ou à des rituels spécifiques et non fonctionnels
		(c) maniérismes moteurs stéréotypés et répétitifs (par exemple, battements ou torsions des mains ou des doigts, mouvements complexes de tout le corps)
		(d) préoccupations persistantes pour certaines parties des objets
B. Retard ou caractère anormal du fonctionnement, débutant avant l'âge de trois ans, dans au moins l'un des domaines suivants : (1) interactions sociales, (2) langage nécessaire à la communication sociale, (3) jeu symbolique ou d'imagination.		
C. La perturbation n'est pas mieux expliquée par le diagnostic de Syndrome de Rett ou de Trouble désintégratif de l'enfance.		

Tableau 2 : Questionnaire de diagnostic F84.0 (299.00) du syndrome autistique établi par le DSM-IV

L'hétérogénéité de la pathologie

Ce sont là les traits communs, mais les différences entre autistes sont grandes. L'autisme est une maladie du comportement et de la cognition. Dans la mesure où l'autisme est caractérisé par des groupes de symptômes et de signes, même dans sa définition la plus étroite, il s'agit d'un syndrome neurodéveloppemental très variable et non pas d'un état unique. Les enfants diagnostiqués autistes diffèrent sensiblement dans la gravité de la maladie, à de nombreux niveaux de capacités cognitives et comportementales.

Contrairement à de nombreux autres pathologies touchant le cerveau, par exemple les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer, l'autisme n'est pas donc clairement défini comme une pathologie unique aux niveaux moléculaire, cellulaire, ou au niveau des mécanismes. Dans le domaine intellectuel, on estime que près de la moitié d'entre eux présente des performances inférieures à 50 (correspondant à une déficience mentale modérée, selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé), le tiers développe un Quotient Intellectuel de 70 (déficience mentale légère) et 5 % seulement dépasseraient les 80 (déficience mentale limite), même si on constate parfois des performances spécifiques dans un domaine particulier, ou une connaissance approfondie d'un sujet bien circonscrit, toujours à la limite de l'obsessionnel. En outre, comme nous allons le voir dans un paragraphe suivant, l'étiologie des TED est complexe, impliquant probablement de nombreux facteurs. Ainsi, la recherche sur les TED doit composer non seulement avec la complexité et la grande amplitude du phénotype lui-même, mais également avec la complexité des origines possibles. Malgré ces difficultés, des progrès notables ont été réalisés.

Par ailleurs, pour ajouter à cette complexité, il existe également en plus du terme de TED le terme de « troubles du spectre autistique » (TSA, ou ASD pour autistic spectrum disorders), utilisé pour la première fois par Allen en 1988, et malheureusement souvent employés indifféremment. Ces deux notions étaient pourtant distinctes à l'origine, et le spectre autistique correspond en réalité à une image permettant d'englober les personnes présentant des traits autistiques mais ne répondant pas exactement à tous les critères exigés par le DSM-IV pour entrer dans la catégorie des TED. Cette notion revient donc à une appréciation plus subjective de l'autisme, considérant à la fois les TED mais aussi d'autres pathologies pour lesquelles la triade n'est pas totalement respectée, ou lorsque les symptômes sont apparus plus tardivement, ce qui permet d'atténuer les diagnostics binaires malade/sains, dissipant la frontière entre la pathologie et le phénotype variable de la population générale, et dessinant

ainsi un dégradé de phénotypes possibles formant une sorte de *continuum* parmi la diversité des individus.

Les troubles envahissants du développement (TED) : complexité d'une classification

La classification des différents troubles envahissants du développement évolue constamment en fonction de l'avancée des recherches et diffère sensiblement selon les types d'évaluation considérés (annexes pour les critères officiels CIM-10 et DSM-IV). La classification internationale des maladies mentales et des perturbations du comportement établie par l'Organisation Mondiale de la Santé (CIM 10, 1993) définit les TED dans sa rubrique F84, tout en précisant que le retard mental est une pathologie distincte dont les symptômes sont répertoriés dans d'autres catégories. D'après la CIM-10, les TED sont regroupés en 8 catégories :

- L'autisme infantile (F84.0), dont nous avons déjà largement discuté les symptômes.
- L'autisme atypique (F84.1), qui se distingue de l'autisme soit par une apparition plus tardive, soit par le défaut d'un des critères de la triade autistique.
- Le syndrome de Rett (F84.2), dont l'évolution neurologique est particulière dans la mesure où ce n'est que vers 2 ans que surviennent des altérations des interactions sociales et de la communication, ainsi que des pertes importantes des facultés motrices.
- Le trouble désintégratif de l'enfance (F84.3), qui comme pour le syndrome de Rett permet à l'enfant un développement normal au moins jusqu'à l'âge de deux ans, mais qui provoque avant l'âge de 10 ans une perte importante des facultés dans plusieurs domaines de développements précédemment acquis.
- L'hyperactivité associée à un retard mental et à des mouvements stéréotypés (F84.4).
- Le syndrome d'Asperger (F84.5), dont le diagnostic repose sur la présence d'altérations qualitatives des interactions sociales réciproques et d'un aspect restreint, répétitif et stéréotypé du comportement, des intérêts et des activités (comme dans l'autisme), mais sans retard cliniquement significatif du langage ou du développement cognitif.

- Les autres troubles envahissants du développement (F84.8), qui représentent les TED individualisées qui ne peuvent appartenir aux catégories suscitées (le syndrome Rett-like par exemple).

- Le trouble envahissant du développement non spécifié (TED-NS, ou PDD-NOS pour Pervasive Developmental Disorder - Not Otherwise Specified) (F84.9).

D'après la classification du DSM-IV de 1994, les TED sont aujourd'hui divisés en cinq catégories.

On retrouve ainsi l'autisme infantile (F84.0) dans la catégorie des syndromes autistiques, souvent réduits au terme autisme. Les syndromes de Rett (F84.2) et d'Asperger (F84.5) ainsi que le trouble désintégratif de l'enfance (F84.3) font également l'objet de catégories distinctes. Cependant l'autisme atypique (F84.1) et les autres troubles envahissants du développement (F84.8) sont ici inclus parmi les troubles envahissants du développement non spécifiés (F84.9) qui forment ainsi un large groupe hétérogène de symptômes plus ou moins variés mais pour lesquels l'appartenance à l'une des maladies précédemment identifiées a été écartée.

Pour clarifier ces classifications, voici un tableau reprenant les différentes catégories :

CIM-10	DSM-IV
Autisme infantile	Troubles autistiques
Syndrome de Rett	Syndrome de Rett
Trouble désintégratif de l'enfance	Trouble désintégratif de l'enfance
Syndrome d'Asperger	Syndrome d'Asperger
Autisme atypique	TED non spécifié
TED non spécifié	
Autres TED	
Hyperactivité associée à un retard mental et des mouvements stéréotypés	-

Tableau 3 : Tableau comparatif des deux principales classifications utilisées pour la description des troubles envahissants du développement.

Épidémiologie

L'incidence de la pathologie autistique est actuellement évaluée à 1/166 (soit 6,0 / 1000) d'après une récente étude du Centre for Disease Control and Prevention (CDCP, 2007), mais

la prévalence de la maladie reste toujours un point délicat à établir dans la mesure où il est possible de se placer d'un point de vue des syndromes autistiques ou du spectre autistiques plus globalement représentant l'ensemble des TED, les deux termes étant souvent comme nous l'avons déjà dit employés indifféremment dans les études. La méta-analyse de l'équipe de Fombonne publiée en 2003 établit clairement l'incidence des perturbations distinctes du spectre autistique (incluant donc l'autisme) à 6 ‰ (Tidmarsh et Volkmar, 2003), chiffre concordant avec l'évaluation récente du CDCP.

Le sex-ratio reste lui inchangé depuis le début des études épidémiologiques et se trouve donc estimé à 3 ou 4 garçons atteints pour 1 fille (Fombonne, 2003 ; Yeargin-Allsopp *et al.*, 2003), avec une déficience mentale plus importante pour les filles atteintes (Lenoir et Bodier, 2000).

Données anatomopathologiques

Nous disposons actuellement de très peu d'études directes de cerveaux de personnes autistes décédées. Cependant les rares études *post mortem* ont pu être enrichies grâce aux récents progrès de l'imagerie. Celles-ci ont ainsi pu révéler des anomalies variées, mais toutes ces informations restent délicates d'utilisation dans la mesure où elles ne se trouvent pas chez tous les patients atteints, et existent dans d'autres pathologies, différentes de l'autisme. Même s'il semble difficile de proposer une vue unifiée de l'anatomie du cerveau des autistes, nous allons examiner les diverses anomalies décrites, région par région.

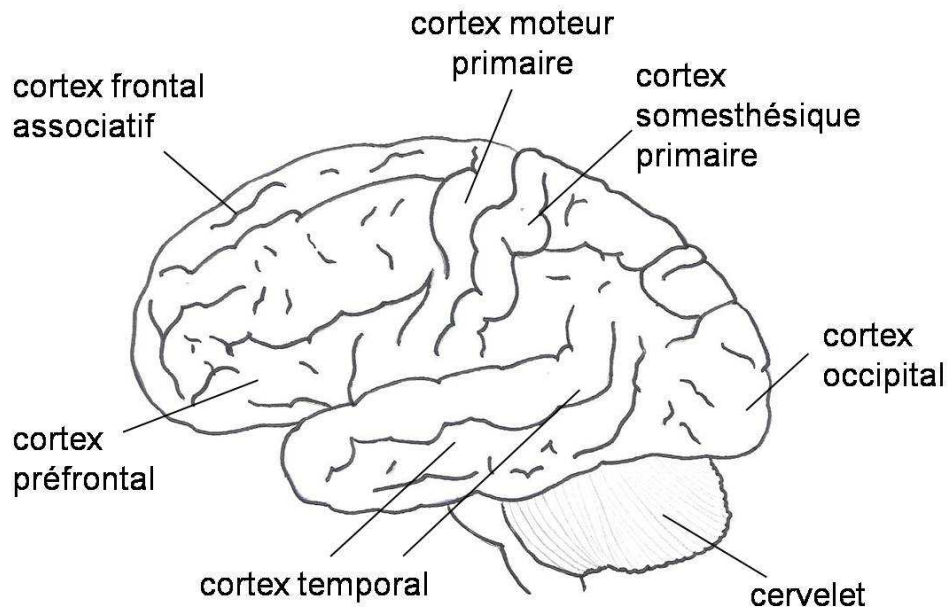


Figure 1 : Schéma du cerveau humain permettant la localisation de différentes régions d'intérêt dans l'autisme.

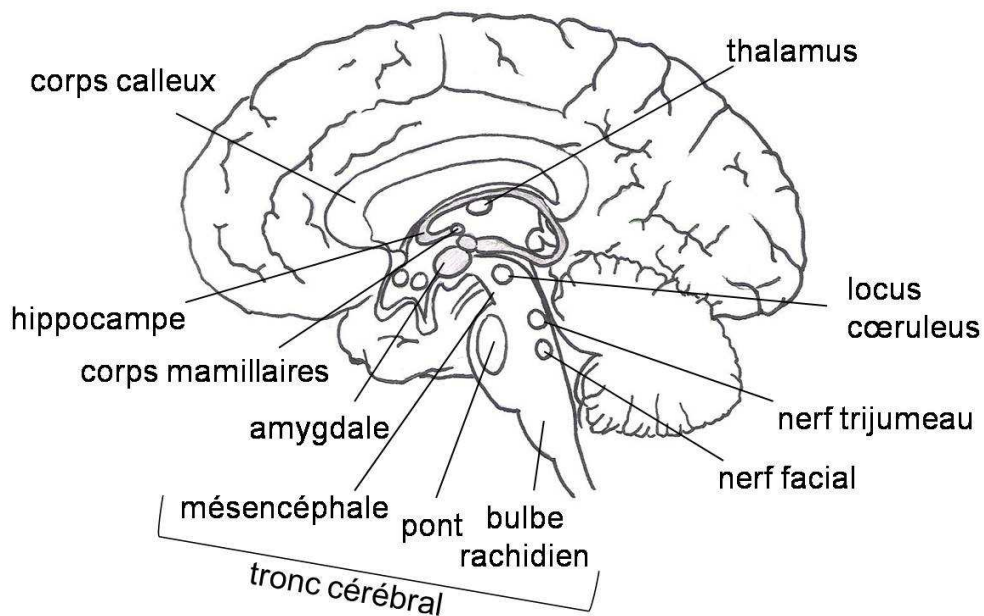


Figure 2 : Schéma d'une coupe sagittale du cerveau humain permettant la localisation des principales structures d'intérêt dans l'autisme.

Le volume cérébral

Dans sa description initiale du syndrome autistique, Kanner observait déjà une augmentation du périmètre crânien (Kanner, 1943). Les diverses études effectuées (Woodhouse *et al.*, 1996 ; Lainhart *et al.*, 1997 ; Ghaziuddin *et al.*, 1999) rapportent une augmentation de la circonférence de la tête chez 20 à 30 % des autistes de moins de 30 ans, contre 2 % chez la population témoin. La relation entre périmètre crânien et volume ou masse du cerveau est cependant complexe, l'âge étant particulièrement important pour ces comparaisons. C'est ainsi que l'équipe de Bauman a pu démontrer que les cerveaux des autistes de moins de 12 ans étaient plus lourds (100 à 200 g) que ceux des contrôles, mais que ceux des autistes adultes se trouvaient au contraire plus légers (Bauman, 1996). Il semble donc que la croissance soit plus rapide au début du développement puis diminue ou s'arrête chez les autistes, alors qu'elle se poursuit chez les témoins normaux. Une autre étude précise que la croissance du cerveau semble anormalement rapide dans la petite enfance, entre 6 et 14 mois après la naissance (Courchesne *et al.*, 2003). L'équipe de Bailey a également rapporté trois cas de cerveau nettement plus lourd que la normale, de 1600 à 1800 g au lieu de 1250 à 1350 g (Bailey, 1998). D'autres études ont pu retrouver cette augmentation de masse du cerveau (dans 3 cas sur 21 pour Courchesne *et al.*, 1999), confirmée par plusieurs études utilisant l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (Brambilla, 2003), mais aussi un cas de microcéphalie (Courchesne *et al.*, 1999). De plus même si cette anomalie n'est pas observée dans le retard mental ou les perturbations du langage, elle n'est pas spécifique de l'autisme : on la retrouve aussi dans les défauts d'attention et l'hyperactivité par exemple (Ghaziuddin, 1999), et dans plusieurs maladies génétiques s'accompagnant d'autisme ou de déficience mentale, telles que le syndrome MOMO (Moretti-Ferreira *et al.*, 1993) ou les mutations *PTEN* (Waite et Eng, 2002).

Le cervelet

Le cervelet a très rapidement fait l'objet d'études morphologiques, notamment en raison de son implication dans les interactions sociales et le traitement des informations sensorielles et motrices (Schmahman et Sherman, 1998), mis en cause dans l'autisme. L'équipe de Courchesne a largement exploré cette partie anatomique des autistes. Grâce au développement des techniques d'étude *in vivo* par imagerie à résonance magnétique nucléaire, il a ainsi pu observer qu'une région particulière du cervelet, le vermis cérébelleux, était diminuée de volume (Courchesne *et al.*, 1988), touchant en particulier le lobule VI (intervenant dans la

motricité oculaire, déficiente chez certains autistes) et le lobule VII qui sont réduits de 25 % chez les autistes. Là encore le phénotype observé n'est pas homogène : 87 % des patients présentent une réduction de volume, alors que 13 % montrent une augmentation (Courchesne *et al.*, 1994). On note cependant une particularité chez les autistes jeunes qui présentent davantage de substance blanche cérébelleuse au détriment de la substance grise, comparés à des sujets normaux (Courchesne *et al.*, 2001). Cette hypoplasie pourrait être due à une perte cellulaire mais qui ne serait cependant pas associée à un phénomène de gliose (Courchesne *et al.*, 1994), suggérant que la lésion se serait manifestée lors des premiers stades du développement embryonnaire. C'est ainsi qu'en se basant uniquement sur les données neuropathologiques du cervelet, certains chercheurs ont proposé que la 5^{ème} semaine de gestation soit la période de plus grande vulnérabilité du fœtus à certains facteurs affectant le développement normal du cerveau, pouvant conduire à l'apparition de comportements autistiques (Courchesne, 2002). Plusieurs autres chercheurs ont observé une augmentation du volume des hémisphères cérébelleux, et proposent que le volume vermien, en fonction du volume total du cerveau, soit plutôt corrélé au niveau intellectuel qu'à la présence de l'autisme (Brambilla, 2003).

Par ailleurs, on a pu noter une diminution du nombre de cellules de Purkinje dans le cortex cérébelleux (Williams, 1980 ; Bauman et Kemper, 1985 ; Ritvo *et al.*, 1986 ; Bailey *et al.*, 1998). La taille de ces cellules de Purkinje semble également réduite de 24 % en moyenne, tout en montrant une grande hétérogénéité interindividuelle (Fatemi *et al.*, 2002a). La perte précoce de cellules de Purkinje s'accompagnerait de la perturbation des circuits normaux, avec une hyperplasie des cellules des noyaux reliés au cortex cérébelleux. Par la suite, les neurones des noyaux, ne recevant pas d'influx du cortex, s'atrophieraient. Là encore il se manifeste donc des variations dans les observations en fonction de l'âge considéré : les neurones des noyaux profonds du cervelet ainsi que les neurones de l'olive inférieure dans le tronc cérébral sont trop grands chez les patients jeunes et trop petits chez les patients plus âgés (Bauman et Kemper, 1985).

Même si ces altérations du cervelet sont fréquentes, elles ne sont pas retrouvées dans toutes les études (Rumsey, 1988 ; Garber *et al.*, 1989 ; Piven *et al.*, 1990 ; Holttum, 1992), et surtout elles ne sont pas spécifiques de l'autisme puisqu'elles peuvent être retrouvées dans d'autres pathologies neurologiques tels que le syndrome de Rett et le syndrome de Down (Schaefer *et al.*, 1996). Le rapport entre les modifications de la structure du cervelet et l'expression des symptômes de l'autisme reste flou (Webb *et al.*, 2009).

Les régions corticales

L'étude histologique du cortex a montré un épaississement local ou des irrégularités (Bailey *et al.*, 1998). Entre 2 et 4 ans, les enfants autistes montrent ainsi un épaississement anormal de la matière blanche, puis cet épaississement se stabilise jusqu'à se réduire à une épaisseur inférieure à la normale (Courchesne *et al.*, 2004). L'épaisseur de la couche corticale entre 7 et 19 ans a pu être associée avec les facultés intellectuelles (Shaw et Greenstein, 2006), ce qui permettrait d'expliquer le déficit chez les patients autistes.

Un autre niveau d'étude concerne l'organisation des neurones corticaux. Lors de la corticogénèse, ces neurones se répartissent en six couches, et leur migration radiale forme entre les couches II et IV des structures verticales appelées minicolonnes, définies par la densité cellulaire des neurones qui les compose et par la répartition de ces cellules le long de la colonne. L'architecture cérébrale est elle même définie par le nombre de minicolonnes et leur répartition. On observe ainsi une augmentation du nombre de ces minicolonnes accompagnée d'une diminution de leur taille et de leur densité cellulaire dans l'aire 9 du cortex préfrontal et dans les aires 21 et 22 du cortex temporal des patients autistes, formant des minicolonnes nettement plus compactes chez les autistes que chez les témoins (Casanova *et al.*, 2002). La même observation a été faite dans le cortex somesthésique primaire (aire 3b) ainsi que dans les régions du cortex moteur primaire (aire 4), du cortex frontal associatif (aire 9) et du cortex occipital (aire 17), confirmant la modification de l'organisation structurale des minicolonnes chez les autistes (Casanova *et al.*, 2006).

Le lobe frontal

Là encore le lobe frontal est intéressant à étudier dans la mesure où il semble jouer un rôle dans la régulation du comportement émotionnel durant la petite enfance. Comme pour les observations effectuées sur le périmètre crânien dans sa globalité, on a pu mettre en évidence une légère augmentation relative de son volume chez les sujets autistes (Carper et Courchesne, 2000) mais cette hypertrophie disparaît avec l'âge, d'où l'idée d'une phase de croissance cérébrale plus rapide que chez les sujets normaux suivie d'une croissance plus lente (Carper *et al.*, 2002 ; Carper et Courchesne, 2005). Par ailleurs, un hypodébit sanguin de la région frontale du cortex a été trouvé chez des enfants autistes de moins de 5 ans (Zilbovicius *et al.*, 1995) qui elle aussi disparaît avec l'âge, s'interprétant donc comme un

retard de la maturation frontale. Cependant, les anomalies du lobe frontal dans l'autisme restent rares et semblent transitoires.

Le lobe temporal

La première observation intéressante à noter chez les patients autistes est la perte de l'asymétrie normale des deux parties les plus hautes du cortex temporal, le planum temporal. En temps normal chez les sujets sains, le côté gauche a une taille inférieure à celui du côté droit, alors que dans l'autisme, cette asymétrie disparaît (Rojas *et al.*, 2002). Cette zone temporale haute est impliquée dans la perception du langage, et pourrait expliquer les défauts de communication rencontrés chez les autistes.

La perturbation des réactions émotionnelles spécifiques peut également être due à des modifications au niveau des neurones du sillon temporal supérieur (STS), où un défaut d'activation de cette zone spécifique a pu être observé chez des autistes (Gervais *et al.*, 2004). Les trois quarts des patients autistes présenteraient en fait une hypoperfusion bilatérale des lobes temporaux, et plus particulièrement au niveau de ce STS mais aussi du gyrus temporal supérieur (GTS) (Zilbovicius *et al.*, 2000 ; Ohnishi *et al.*, 2000), pouvant refléter une diminution localisée de l'activité synaptique chez les autistes.

Enfin on a pu noter chez des enfants autistes de plus de cinq ans une hyporéactivité temporale gauche contrastant avec une augmentation du débit sanguin dans la zone temporale droite (Bruneau *et al.*, 2003).

Le tronc cérébral

Le tronc cérébral a été très rapidement mis en cause dans l'autisme (Gaffney *et al.*, 1988 ; Hashimoto *et al.*, 1992), et la preuve morphologique de son implication a été apportée par l'observation d'une réduction du tronc cérébral et de ses trois composantes (mésencéphale, pont et région bulbaire) chez les patients autistes (Hashimoto *et al.*, 1993). Des malformations de l'olive inférieure, située dans le bulbe rachidien, en relation avec le cortex cérébelleux, et des ectopies neuronales ont été aussi décrites (Kemper et Bauman, 1993 ; Bailey, 1998). Enfin d'un point de vue purement anatomique, en se basant sur l'hypothèse d'un problème de fermeture du tube neural établie suite aux études des effets d'une exposition à la thalidomide, l'équipe de Rodier a pu mettre en évidence une atrophie du noyau du nerf facial lors de

l'étude *post mortem* du cerveau d'un patient autiste (Rodier *et al.*, 1996), soutenue par des études de modèles animaux chez le rat.

Le système limbique

L'implication de cette structure dans l'affectivité et l'émotion suggère que là encore des perturbations organisationnelles et/ou fonctionnelles permettraient d'expliquer certaines caractéristiques observées chez les autistes. L'hippocampe et l'amygdale, structures profondes du système limbique, semblent initialement plus grands chez le jeune patient autiste, mais là encore cette hypertrophie disparaît à l'adolescence (Schumann *et al.*, 2004). Malheureusement les différentes études menées sur le système limbique grâce à l'imagerie par résonance magnétique nucléaire sont contradictoires, constatant un volume de l'amygdale augmenté, normal ou diminué (Brambilla, 2003). Une activation atypique de l'amygdale et des structures environnantes a été rapportée en réponse à des stimuli sociaux (Szatmari, 2003). Les neurones de l'hippocampe (région CA4), du cortex entorhinal, de portions de l'amygdale et des corps mamillaires semblent par ailleurs plus petits et plus densément groupés (Bauman, 1991), accompagnant une diminution de l'arborisation dendritique des neurones des régions CA1 et CA4 de l'hippocampe (Raymond *et al.*, 1996).

Le corps calleux

Une réduction du corps calleux avait tout d'abord été mis en évidence au cours de divers études d'IRM (Egaas, 1995 ; Piven, 1997 ; Manes *et al.*, 1999 ; Hardan *et al.*, 2000), l'hypoplasie observée étant d'autant plus importante que l'on tient compte de l'augmentation du volume cérébral total, traduisant soit une diminution des fibres reliant les deux hémisphères, soit un défaut de myélinisation de ces fibres. C'est ainsi qu'utilisant une nouvelle forme d'imagerie cérébrale appelée « diffusion tensor imaging », basée sur le suivi du mouvement de l'eau à travers les différents tissus cérébraux, des chercheurs du Centre d'Imagerie Cognitive du Cerveau de l'université Carnegie Mellon ont découvert en 2006 que la matière blanche du cerveau des personnes autistes présentait une intégrité structurelle plus faible que celle des individus normaux (Alexander *et al.*, 2007). Les molécules d'eau, guidées par la myélinisation des fibres nerveuses qui crée une gaine autour de ces fibres afin de permettre un accroissement de la vitesse de l'influx nerveux, se déplacent parallèlement à l'orientation des fibres nerveuses de la matière blanche. Le défaut de myélinisation trouvé chez certains autistes provoque ainsi une dispersion du mouvement de l'eau. Cette

démyélinisation a ainsi pu être observée dans les aires situées à proximité du corps calleux, mettant en cause une défaillance de la connectivité cérébrale entre les deux hémisphères cérébraux (Just *et al.*, 2004), suggérant un manque de coordination entre les aires cérébrales chez les personnes autistes mais pouvant expliquer la capacité normale ou même supérieure de certains autistes dans un domaine particulier tandis que leurs autres modes de pensée sont désordonnés.

Anomalies neurochimiques : de grandes controverses

Le système dopaminergique

Historiquement, le système dopaminergique est l'un des premiers à avoir été mis en cause dans l'autisme, sur la base de caractères comportementaux, biologiques et pharmacologiques. La dopamine (ou DA), neurotransmetteur appartenant à la catégorie des catécholamines, est synthétisée à partir de l'acide aminé tyrosine issu de l'alimentation. Elle possède différents récepteurs notés de D1 à D5, jouant un rôle dans ce système qui touche un large éventail de comportements et de fonctions, comprenant la cognition, la motricité, les mécanismes de récompense, les comportements alimentaires, le comportement sexuel, la régulation endocrine, et l'attention sélective (Calne *et al.*, 1975). L'intérêt pour le rôle de la DA dans l'autisme a commencé suite à l'observation de l'efficacité de certains bloquants dopaminergiques (c'est-à-dire, des antipsychotiques) dans le traitement de certains aspects de l'autisme (Anderson et Hoshino, 1997). Plus précisément, les antipsychotiques semblent atténuer l'hyperactivité, la stéréotypie, l'agressivité, et les automutilations (Young *et al.*, 1982).

Une fois libérée des neurones, la DA est dégradée en acide homovanillique (HVA) et acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC). Les mesures de l'excrétion urinaire de la DA et de l'HVA dans l'autisme restent équivoques. Bien que certains chercheurs aient signalé une augmentation des niveaux dans des sous-populations d'autistes (Martineau *et al.*, 1992), aucune différence n'a été constatée dans d'autres études (Minderaa *et al.*, 1989). À ce stade, il ne semble donc pas y avoir de preuve d'anomalies dopaminergiques périphériques chez les patients autistes. Cependant, il semble difficile de corrélérer ces mesures périphériques avec le fonctionnement dopaminergique central (Anderson et Hoshino, 1997), dans la mesure où il a été suggéré que seulement près de 25 % de l'HVA trouvé dans le sang ou l'urine est d'origine centrale (Aizenstein et Korf, 1978 ; Maas *et al.*, 1980).

C'est pourquoi, afin d'évaluer le fonctionnement dopaminergique central, des dosages de l'HVA ont été effectués dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Sur les sept études menées sur les personnes atteintes d'autisme, deux (Gillberg *et al.*, 1983 ; Gillberg et Svennerholm, 1987) indiquent qu'environ 50 % des sujets autistes présenteraient des niveaux significativement élevés de l'HVA dans le LCR, tandis que les cinq autres études n'ont pas montré de différences entre les moyennes des sujets contrôles et les sujets autistes (Cohen *et al.*, 1974 ; Cohen *et al.*, 1977 ; Winsberg *et al.*, 1980 ; Ross *et al.*, 1985 ; Narayan *et al.*, 1992). L'implication du système dopaminergique dans l'autisme reste donc toujours controversée.

Le système adrénargique

La noradrénaline (ou norépinephrine, NA) est une catécholamine synthétisée à partir de la DA par le biais de l'enzyme DA bêta-hydroxylase. Le système adrénargique semble jouer un rôle essentiel dans l'attention, le filtrage des stimuli non pertinents, la réponse au stress, l'anxiété, et de la mémoire (Amaral et Sinnamon, 1977 ; Moore et Bloom, 1979), d'où l'intérêt de certains chercheurs pour l'étude de cette voie dans l'autisme.

La fonction noradrénargique peut être étudiée par la mesure des taux sanguins de NA ou de son principal métabolite central, le 3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol (MHPG). Contrairement à d'autres systèmes de neurotransmetteurs, les systèmes noradrénargiques central et périphérique sont étroitement couplés, avec des concentrations dans le sang et dans le LCR fortement corrélées (Raskind *et al.*, 1984 ; Roy *et al.*, 1988 ; Ziegler *et al.*, 1977). Cinq études de mesure de la NA ont montré des concentrations plus élevées chez les sujets autistes par rapport aux contrôles (Lake *et al.*, 1977 ; Launay *et al.*, 1987 ; Cook *et al.*, 1990 ; Leventhal *et al.*, 1990 ; Leboyer *et al.*, 1992). En contrepartie, deux autres études portant sur la mesure des taux de MHPG n'ont pas réussi à montrer de différences entre autistes et contrôles (Young *et al.*, 1981 ; Minderaa *et al.*, 1994).

Dans les urines également les études sur l'excrétion de la NA et de ses métabolites chez les patients autistes ont donné les résultats discordants. Les taux d'excrétion de noradrénaline chez les autistes sont trouvés augmentés (Barthelemy *et al.*, 1988), ou diminués (Young *et al.*, 1978), ou normaux (Launay *et al.*, 1987 ; Martineau *et al.*, 1992 ; Minderaa *et al.*, 1994 ; Croonenberghs *et al.*, 2000), par rapport aux sujets contrôles. Les études portant sur les taux d'excrétion du MHPG concluent à des activités diminuées (Young *et al.*, 1978 ; Barthélemy *et*

al., 1988) ou normales (Launay *et al.*, 1987 ; Minderaa *et al.*, 1994) du système adrénergique chez les patients autistes. Enfin, les études examinant les taux du métabolite périphérique prédominant de la noradrénaline, l'acide vanillyl-mandélique (VMA), n'aboutissent pas à des différences significatives entre les sujets autistes et contrôles (Minderaa *et al.*, 1994).

Même dans le LCR, deux études mesurant les concentrations de MHPG n'ont pu montrer de différences significatives entre les sujets autistes et les contrôles (Young *et al.*, 1981 ; Gillberg et Svennerholm, 1987). Globalement, tous ces résultats ne laissent guère supposer de rôle causal à la NA dans l'expression ou la genèse du syndrome autistique.

Le système sérotoninergique

Parmi toutes les études neurochimiques de l'autisme, la sérotonine (5-hydroxytryptamine ou 5-HT) a suscité le plus de recherches. La sérotonine est une indolamine dérivée de l'acide aminé tryptophane. Le tryptophane est hydroxylé par la tryptophane hydroxylase en 5-hydroxytryptophane (5-HTP), pour subir ensuite une décarboxylation (par la 5-HTP décarboxylase) en sérotonine. Découvert au début des années 1950, le système sérotoninergique joue un rôle majeur dans la régulation - normale ou pathologique - de phénomènes aussi divers que la douleur, l'anxiété, la régulation thermique, la pression artérielle, les comportements alimentaires et sexuels ou encore le cycle veille-sommeil. La 5-HT a ainsi été étudiée dans l'autisme pour son rôle dans la perception (Bauman et Kemper, 1994). D'autres éléments laissant penser à un rôle de la sérotonine dans l'expression de du syndrome autistique ont été apportés par l'observation d'une aggravation de la symptomatologie autistique lorsque l'on supprime l'apport alimentaire en tryptophane (McDougle *et al.*, 1996a et McDougle *et al.*, 1996b).

Les premières études des concentrations de sérotonine dans le sang ont pu trouver une hypersérotoninémie chez un tiers des personnes atteintes d'autisme, ce qui a été confirmé dans plus de 25 études publiées (par exemple, Shain et Freedman, 1961 ; Ritvo *et al.*, 1970 ; Campbell *et al.*, 1974 ; Takahashi *et al.*, 1976 ; McBride *et al.*, 1998), l'élévation en 5-HT dans le sang étant généralement d'environ 50 % supérieure de la normale (McBride *et al.*, 1998). Par la suite, les études ont pu établir que plus de 99 % de cette sérotonine issue du sang est contenue dans les plaquettes (Anderson *et al.*, 1987) et que c'est cette sérotonine plaquettaire qui est responsable de l'hypersérotoninémie observée dans l'autisme (Cook *et al.*, 1988).

Toutefois, l'origine et l'importance de ces niveaux élevés de sérotonine dans le sang des autistes demeurent obscures. Deux études n'ont pas démontré de relation entre l'hypersérotolinémie et le déficit de la capacité d'expression verbale (Cook *et al.*, 1990 ; Cuccaro *et al.*, 1993) chez les individus atteints d'autisme. Il est cependant difficile de tirer des conclusions sur le lien entre ces mesures périphériques et d'éventuelles variations centrales dans l'autisme, la quasi-totalité de la 5-HT dans le sang étant fabriquée dans l'intestin avant transport dans les plaquettes. En outre, l'hypersérotolinémie ne se retrouve pas exclusivement dans l'autisme : elle est également constatée dans une variété de pathologies neuropsychiatriques, tels que la schizophrénie (Freedman *et al.*, 1981), la maladie de Huntington (Belendiuk *et al.*, 1980), et une déficience mentale sévère (Hanley *et al.*, 1977; Pare *et al.*, 1960; Partington *et al.*, 1973). L'équipe de McBride a également souligné l'importance de l'adéquation du stade de puberté et du groupe ethnique entre patients et contrôles lors de recherches neurochimiques, car elle montre qu'il est possible que l'hypersérotolinémie signalée chez les personnes autistes ait pu être surestimée en raison des variations individuelles possibles des contrôles (McBride *et al.*, 1998).

Pour évaluer le fonctionnement sérotoninergique central dans l'autisme, différentes études (Cohen *et al.*, 1974 ; Cohen *et al.*, 1977 ; Winsberg *et al.*, 1980 ; Gillberg *et al.*, 1983 ; Ross *et al.*, 1985 ; Narayan *et al.*, 1992) ont examiné les niveaux de l'acide 5-hydroxyindole acétique (5-HIAA, métabolite principal de la sérotonine) dans le liquide céphalo-rachidien. Aucune différence n'a pu être observée dans les taux de 5-HIAA contenus dans le LCR entre les autistes et les contrôles. Ces résultats suggèrent que, s'il existe une anomalie sérotoninergique centrale dans l'autisme, il ne s'agit pas d'une modification dans le turn-over de la 5-HT (Anderson, 1994).

Enfin par la suite, grâce à un traceur développé pour la mesure de la synthèse de sérotonine dans le cerveau, la tomographie par émission de positons a été utilisée pour observer les variations régionales de la synthèse de 5-HT et mesure donc de façon beaucoup plus précise et plus informative le fonctionnement sérotoninergique central dans l'autisme. La première étude utilisant la tomographie par émission de positons, menée par l'équipe de Chugani, a pu mettre en évidence chez les garçons autistes une diminution unilatérale de la synthèse de 5-HT dans le cortex frontal et le thalamus, couplée à une augmentation de ces taux dans le noyau denté contralatéral du cervelet, en comparaison avec les frères et sœurs non atteints. L'observation d'une augmentation de la synthèse de la 5-HT dans une zone et d'une diminution dans une autre zone pourrait expliquer pourquoi les concentrations de 5-HIAA

dans le LCR sont normales (Chugani *et al.*, 1997). Une seconde étude de la même équipe (Chugani *et al.*, 1999) a montré que les enfants non autistes âgés de 2 à 5 ans présentaient des taux élevés de synthèse de la 5-HT, qui ont ensuite baissé entre 5 et 14 ans vers des valeurs identiques à celles des adultes. Les enfants atteints d'autisme en revanche ne montrent pas cette diminution progressive de la synthèse de sérotonine : les niveaux sont nettement plus faibles chez ces enfants à l'âge de 2 à 5 ans par rapport aux contrôles et légèrement augmentés avec l'âge. Cela suggère que la régulation de la synthèse de la sérotonine au cours du développement pourrait être impliquée dans la pathogénie de l'autisme. Cependant la même étude a montré que les sujets souffrant d'épilepsie présentaient également des régions associées à leur foyers épileptiques où la synthèse de la 5-HT était augmentée, mettant là encore en doute la spécificité de la perturbation du système sérotoninergique dans l'autisme.

Le système glutamatergique

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur de la communication synaptique du cerveau humain, et possède différents récepteurs répartis sur tout le cerveau et la moelle épinière : les récepteurs AMPA, les récepteurs kaïnate, les récepteurs NMDA et divers sous-types de récepteurs métabotropes (Dingledine *et al.*, 1999). Les études sur ce système ont débuté par la découverte *post mortem* d'anomalies du développement cellulaire dans le système limbique et le cervelet (Bauman et Kemper, 1994 ; Raymond *et al.*, 1996), zones particulièrement riches en récepteurs glutamatergiques. Le récepteur à glutamate AMPA1 a ainsi été trouvé surexprimé dans le cerveau de patients autistes, tout en notant une diminution de la densité de ces récepteurs AMPA dans le cervelet (Purcell *et al.*, 2001). On a alors supposé que l'hyperactivité glutamatergique pourrait entraîner une sorte d'excitotoxicité, qui provoquerait des aberrations du développement neuronal (Bittigau et Ikonomidou, 1997). En outre, l'activité glutamatergique est maximale au cours de la deuxième année de vie (Kornhuber *et al.*, 1989), qui est le moment où les symptômes de l'autisme apparaissent le plus souvent. Si ce système est hyperfonctionnel, il est possible que la croissance et la connectivité des neurones soient endommagées durant les périodes critiques de développement. On a ainsi pu retrouver concentrations plasmatiques de glutamate augmentées chez les patients autistes par rapport aux contrôles (Alfred *et al.*, 2003). Une stimulation glutamatergique excessive est également associée aux crises d'épilepsie, qui sont courantes chez les personnes autistes (Hussman, 2001). D'autres approches ont renforcé l'implication de la voie glutamatergique dans l'autisme (voir plus loin la revue génétique).

Le système GABAergique

L'acide gamma-aminobutyrique (GABA) est un neurotransmetteur principalement inhibiteur. Sa distribution dans le cerveau est très étendue (Carlson *et al.*, 2001). La recherche sur le GABA est étroitement liée à celle du glutamate, dans la mesure où le GABA est synthétisé à partir du glutamate par l'enzyme acide glutamique décarboxylase (GAD). Dans une étude sur les taux de GAD de cerveaux *post mortem*, l'activité de GAD, étape limitante de la synthèse du GABA, était réduite de 48 à 61 % dans les zones pariétales et cérébelleuses du cerveau des personnes autiste par rapport aux contrôles (Fatemi *et al.*, 2002b). L'inactivation du système GABAergique pourrait entraîner une stimulation excessive du système glutamatergique. Nous parlerons également plus loin d'autres arguments en faveur d'une implication du système GABAergique dans l'autisme dans la revue génétique.

Le système cholinergique

L'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur possédant deux types de récepteurs : les récepteurs nicotiniques et muscariniques, tous deux présents dans le cerveau. Globalement, le système cholinergique, entre autres nombreuses propriétés, aiderait à développer la capacité de se concentrer sur l'environnement et de parvenir à une réponse comportementale cohérente (Stahl, 1996).

Des anomalies neuropathologiques décrites dans les neurones cholinergiques situés dans le cerveau des individus atteints d'autisme ont suscité l'intérêt de l'étude de l'acétylcholine (Bauman et Kemper, 1994). Une étude *post mortem* sur l'activité cholinergique dans l'autisme (Perry *et al.*, 2001) comparant le cerveau des personnes atteintes d'autisme au cerveau des personnes souffrant de retard mental, ainsi qu'au cerveau des personnes contrôles, n'a pas montré de différences significatives entre les groupes concernant les taux d'acétylcholinestérase et d'acétylcholine transférase, qui sont deux marqueurs enzymatiques cholinergiques. Cependant, l'analyse de la liaison aux récepteurs a révélé une importante réduction de la liaison de l'ACh (d'environ 70 %) aux récepteurs nicotiniques (alpha 4 et beta 2) dans les cortex pariétal et frontal des patients autistes, tout comme une réduction (30 %) de la liaison aux récepteurs muscariniques (M1) dans le cortex pariétal des autistes. D'autres études ont été menées sur de nouvelles anomalies potentielles des récepteurs nicotiniques dans l'autisme (Lee *et al.*, 2002 ; Martin-Ruiz *et al.*, 2004), mais il est difficile de savoir comment ces variations pourraient être liées à l'étiologie de l'autisme.

Le système opioïde

Les opiacés endogènes sont des peptides agissant comme des neuromodulateurs sur le système nerveux central. On décrit classiquement trois type d'opiacés endogènes : les bêta-endorphines, les enképhalines et les dynorphines, se fixant sur les récepteurs mu pour les bêta-endorphines et les enképhalines, delta pour les enképhalines, et kappa pour les dynorphines ; les opiacés correspondent aux ligands endogènes des récepteurs activés par la morphine et ses dérivés (Anderson et Hoshino, 1997). L'administration d'opiacés provoque une désensibilisation à la douleur, une instabilité affective, des comportements stéréotypés, et une diminution de la socialisation (Kalat, 1978 ; Panksepp, 1979 ; Sandman *et al.*, 1991), compatibles avec certains symptômes de l'autisme.

Là encore, les études des taux d'opiacés endogènes, essentiellement de bêta-endorphines, dans le sang ont abouti à des résultats contradictoires. Certaines ont montré des taux élevés chez les sujets atteints d'autisme (Leboyer *et al.*, 1994 ; Willesem-Swinkles *et al.*, 1996 ; Tordjman *et al.*, 1997), tandis que d'autres rapportent une baisse des niveaux par rapport aux contrôles (Weizman *et al.*, 1984 ; Weizman *et al.*, 1988 ; Sandman *et al.*, 1991), voire normaux (Herman et Stachura, 1986 ; Ernst *et al.*, 1993). Il est à noter que la bêta-endorphine plasmatique n'est pas un indicateur clair de la fonction centrale car elle est dérivée de la glande pituitaire, et ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique. Les études de mesure des opiacés endogènes dans le liquide céphalorachidien sont moins nombreuses, et concluent également soit à des concentrations plus élevées chez les autistes par rapport aux contrôles (Ross *et al.*, 1987), soit à des taux plus bas (Gillberg *et al.*, 1990), soit à des niveaux similaires (Nagamitsu, 1993). Malgré la difficulté de tirer des conclusions de ces études, la récente étude de l'équipe de Tordjman permet par sa méta-analyse d'expliquer ces différences par des problèmes méthodologiques, à savoir la spécificité des tests immunologiques, la petite taille des échantillons et l'hétérogénéité clinique de l'autisme (Tordjman *et al.*, 2009). Ses travaux permettent par ailleurs de conclure à la présence de taux plasmatiques de bêta-endorphines significativement plus élevés chez les patients atteints d'autisme par rapport aux contrôles normaux, une augmentation qui semble associée à la sévérité de l'autisme, mais pas à la réaction de douleur des patients suite au prélèvement (Tordjman *et al.*, 2009).

L'ocytocine

L'ocytocine est un peptide synthétisé dans le noyau paraventriculaire et le noyau supraoptique dans le cerveau, et dont les récepteurs sont situés sur l'ensemble du système limbique et dans les centres autonomes dans le tronc cérébral (Barberis et Tribollet, 1996). L'ocytocine a été impliquée dans le comportement maternel, le stress de séparation infantile, le comportement sexuel, et dans le développement des liens sociaux (Insel et Shapiro, 1992 ; Insel *et al.*, 1999), ce dernier point étant évidemment l'un des principaux symptômes du syndrome autistique. Une étude menée sur les concentrations sanguines d'ocytocine (Modahl *et al.*, 1998), en corrélation avec des estimations du comportement social et du niveau de développement, a pu montrer une diminution significative des taux d'ocytocine chez les patients autistes. En outre, les taux plasmatiques d'ocytocine ont été positivement associés non seulement à l'âge mais aussi à la capacité de socialisation chez les enfants normaux, alors qu'ils sont négativement corrélés pour ces deux éléments chez les enfants autistes, ce qui suggère qu'un simple modèle de déficit de l'ocytocine dans l'autisme n'est pas suffisant. Au contraire, ces faibles taux sanguins d'ocytocine peuvent refléter des mécanismes compensatoires provoqués par des anomalies de récepteurs ou par des substances en amont de l'ocytocine (Modahl *et al.*, 1998). Ces études préliminaires suggèrent que le dérèglement de l'ocytocine pourrait jouer un rôle dans le syndrome autistique mais devront être répliquées.

Le cortisol

Le cortisol est un glucocorticoïde excrété par le cortex surrénal en réponse au stress, sous le contrôle de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) qui est libéré par l'hypophyse. Le cortisol a été étudié dans l'autisme afin d'évaluer la théorie selon laquelle certaines perturbations du comportement pourraient être dues à un niveau chroniquement accru d'activation et d'hyperexcitation de l'individu, qui pourrait se traduire par des niveaux élevés de cette hormone de stress. Alors que la plupart des études portant sur les mesures de cortisol ou d'ACTH dans le sang (Brambillia *et al.*, 1969 ; Goodwin *et al.*, 1971 ; Maher *et al.*, 1975 ; Sandman *et al.*, 1991) n'ont pas trouvé de différences entre les sujets autistes et contrôles, une étude réalisée sur une grande cohorte de patients a pu trouver une augmentation significative des taux d'ACTH parallèlement à des niveaux normaux de cortisol (Tordjman *et al.*, 1997). La concentration d'ACTH plasmatique est considérée comme un bon marqueur de stress aigu, contrairement au cortisol qui présente une longue demi-vie et a une latence de réponse au stress plus grande, représentant davantage le niveau de stress basal (Tordjman *et al.*, 1997).

Par conséquent, ces résultats suggèrent que les personnes autistes présenteraient une plus grande réaction de stress face aux procédures expérimentales telles que les prises de sang. Dans sa récente étude, l'équipe de Torjman montre une forte prévalence des réponses comportementales anormales aux *stimuli* douloureux chez les personnes autistes de fonctionnement faible à modéré, le plus souvent sous forme d'hyporéactivité ou d'absence de réaction à la douleur (Torjman *et al.*, 2009). Ces deux résultats permettent de bien souligner l'importance de la distinction entre réaction et sensibilité à la douleur, qui apparaissent clairement dissociés pour une majorité de patients autistes. Davantage d'études seront donc nécessaires en tenant compte de ces paramètres pour impliquer ce système dans la pathologie.

Les traitements de l'autisme

Il n'existe pas de consensus actuel sur le traitement, sauf dans les cas rares où l'autisme résulte d'une pathologie identifiée (maladie métabolique par ex.). Il est en revanche possible d'atténuer quelques uns des symptômes, en améliorant les comportements par exemple, ou en traitant les syndromes associés, comme l'épilepsie ou l'hyperactivité. Il n'existe aucun médicament spécifique du syndrome autistique, et les méthodes de traitements sont variées. Après la psychanalyse ou la psychothérapie, les chercheurs se sont tournés vers des essais de médicaments, tandis que sous l'influence notamment des parents se sont également développées des méthodes éducatives venues principalement des États-Unis.

Les médicaments

Comme nous l'avons dit, il n'existe pas traitement médical permettant de guérir complètement l'autisme. Il existe en revanche un certain nombre de perturbations dans les systèmes de neurotransmetteurs qui peuvent être traitées. C'est ainsi que les médicaments les plus utilisés sont les neuroleptiques et antidépresseurs. Les neuroleptiques permettent de réduire l'agressivité et les automutilations par inhibition des récepteurs dopaminergiques, mais leurs effets secondaires importants limitent leur emploi au long cours. Les taux de sérotonine peuvent être modifiés notamment via l'utilisation d'inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (ou IRS) tandis que les bêtabloquants agissent sur le système noradrénergique et que les benzodiazépines stimulent le système GABAergique. Il apparaît cependant évident que ces traitements sont spécifiques de certaines anomalies et doivent être administrés au cas-par-cas, avec un dosage juste permettant de limiter les effets secondaires. La naloxone et la

naltrexone, antagonistes opioïdes, sont également utilisées pour traiter les enfants atteints d'autisme dans le but de réduire les comportements d'automutilation (pour revue, voir Elchaar *et al.*, 2006). Ce traitement aurait permis d'observer également une diminution de l'hyperactivité, des stéréotypies, des accès de rage ou de panique, et de l'agressivité, une amélioration du comportement social et de la production verbale (Malone *et al.*, 2005 ; Cazzullo *et al.*, 1999).

Parmi tous les traitements médicamenteux, seuls les psychotropes et les IRS ont pu montrer des actions bénéfiques sur des caractéristiques de la triade elle-même.

Les psychothérapies

Ces approches peuvent aider certains patients autistes à exprimer leurs angoisses et à donner un sens à leurs expériences. Elles ne concernent pas les patients trop lourdement atteints, et les résultats sont mitigés : un sondage réalisé en 1988 auprès de 800 familles d'enfants autistes a montré que seulement 35 % d'entre elles ont constaté une amélioration après la psychothérapie. Aucune étude scientifique n'a pu démontrer un effet de ces approches.

Les traitements comportementaux

Ces approches provenant des pays anglo-saxons sont basées sur le mécanisme de récompense des actions accomplies par le patient autiste. Ce conditionnement à l'état pur reste controversé en France, et même si des progrès ont pu être constatés concernant la réduction des conduites indésirables ou des gains en quotient intellectuel apparent, l'impact sur des traits aussi importants que la sociabilité, l'anxiété ou les stéréotypies n'a pas été évalué.

Les méthodes éducatives

La plus connue et la plus appliquée des approches éducatives est la méthode TEACCH (Treatment and Education of Autistic and related Communication handicapped CHildren) qui a été créée en Caroline du Nord (Etats-Unis) en 1966. Elève de Bettelheim, Éric Schopler s'oppose diamétralement à son maître en souhaitant impliquer les parents qu'il considère comme des partenaires indispensables des éducateurs. Ce programme repose ainsi sur une prise en charge cognitive et comportementale dans laquelle l'accent est mis sur les compétences émergentes que l'on s'attachera à développer en priorité en suivant un programme de travail individualisé basé sur des stratégies de compensation. Un autre principe

de base est la structuration de l'espace et du temps : l'enfant suit un emploi du temps rigoureux et les tâches sont décomposées de façon claire. Enfin, l'équipe s'attache à doter l'enfant, s'il ne parle pas, d'un autre mode de communication : gestes, objets, photos...

En France, cette méthode est légèrement adaptée en y réintroduisant une réflexion sur les aspects psychologiques, voire en l'associant à une psychothérapie individuelle. Les principales critiques à cette thérapie concernent les risques de mécanisation de l'enfant, si elle est appliquée de façon trop rigide, et le risque de culpabiliser les parents qui doivent impérativement s'investir dans la méthode, les transformant en co-thérapeutes, et donc en coresponsables en cas d'échec.

Les autres méthodes

Les familles touchées par l'autisme étant ouvertes à toutes thérapies possibles qui seraient susceptible d'améliorer les symptômes de leurs enfants, des voies ont été explorées dans divers domaines. D'autres traitements non conventionnels sont ainsi proposés comme, par exemple, un régime alimentaire spécifique consistant en une suppression de la caséine et du gluten de l'alimentation. Il est en effet rapporté très fréquemment des intolérances alimentaires chez ces enfants et ce régime particulier semble apporter des améliorations du comportement des enfants autistes, du point de vue de certains professionnels et de parents. Cependant, comme le démontre l'étude de Cornish (2002), aucun effet bénéfique de cette diète sur les comportements autistiques n'a pu être mis en évidence ; les effets de ce type de régime restent donc encore à prouver. De même, la vitamine B6, associée au magnésium, est couramment utilisée, et ce traitement semblerait améliorer le comportement de près la moitié des enfants autistes qui l'ont suivi.

Les rééducations en langage et en psychomotricité semblent avoir un bilan plutôt favorable. La communication facilitée propose de communiquer avec autrui par l'intermédiaire d'un support : ordinateur, tableau constitué d'images ou de lettres, ... Cette méthode a fait l'objet d'études expérimentales visant à tester sa validité, qui concluent généralement que les réponses obtenues sont en réalité induites, volontairement ou non, par l'accompagnateur. Moins connue, la musicothérapie semble diminuer l'anxiété face à la réalité extérieure et améliorer le comportement socio-affectif.

Sans n'avoir apporté aucune preuve de leurs effets bénéfiques, le développement de ces approches parallèles se nourrit de l'espoir des parents, prêts à tout pour atténuer le handicap de leur enfant.

Étiologie du syndrome autistique

La recherche dans le domaine des TED a connu une croissance exponentielle, probablement pour de nombreuses raisons, y compris grâce à la sensibilisation du public et à la prise de conscience que les TED sont une cause importante de handicap neuropsychiatrique, affectant près d'une naissance sur 150.

Cependant, depuis son identification, la question de l'origine de l'autisme demeure sans réponse incontestablement établie. La recherche dans une seule et même direction a très vite été abandonnée, et il est ainsi apparu une multiplicité des causes possibles et une dynamique multifactorielle dans la tentative d'expliquer son origine.

Causes psychopathologiques

Même si l'idée d'une influence parentale, en particulier maternelle, sur l'apparition de comportements autistiques chez leurs enfants, est peu étayée, plusieurs études récentes ont tout de même montré que le comportement autistique chez des garçons atteints du syndrome de X fragile était inversement corrélé avec le niveau de qualité de l'environnement familial (Hessl *et al.*, 2005), alors que chez les filles atteintes de la même pathologie, l'unique indice de prédiction des comportements autistiques est le niveau du quotient intellectuel. De même, dans la famille d'enfants autistes présentant un nombre important de comportements stéréotypés, il est intéressant de noter que les parents sont plus enclins à présenter des traits obsessionnels compulsifs (Hollander *et al.*, 2003). Les études chez des enfants roumains abandonnés puis adoptés, révèlent qu'une proportion importante de ces enfants (entre 6 et 10 %) montrent des signes autistiques (Rutter *et al.*, 1999) avec un niveau de déficit cognitif corrélé à la durée de privation de contacts parentaux. Ces données sont difficiles à interpréter dans la mesure où l'on ignore si ce sont les comportements autistiques de ces enfants qui ont amené leurs parents à les abandonner ou si les symptômes sont consécutifs de l'abandon. De plus, une étude à distance montre que beaucoup de ces enfants après prise en charge ont évolué soit vers la guérison soit ont développé d'autres atteintes neurodéveloppementales non typiquement autistiques (Rutter *et al.*, 2007).

Il ne faut cependant pas nécessairement interpréter ces résultats comme un phénomène de cause à effet, c'est-à-dire que le trait pathologique observé chez les parents n'est pas forcément ce qui va engendrer des comportements autistiques chez leurs enfants. Dans ces cas, il faut davantage raisonner en termes de prédisposition, les parents présentant des traits de personnalités particuliers qui vont être exacerbés chez leur descendance, ce que semblent aussi indiquer certaines études de génétique (voir plus loin).

Causes *in utero*

Intoxications

Rétrospectivement, on a pu associer une exposition directe ou indirecte *via* le milieu intra-utérin de substances prises pendant la grossesse à des cas d'autisme, de part leur action sur le développement neuropsychologique des enfants. Les facteurs environnementaux tels que l'exposition à l'acide valproïque ou à la thalidomide au cours de la grossesse sont considérés comme importants dans l'étiologie du syndrome autistique. La thalidomide, aux propriétés tératogènes, développée à la fin des années 50 pour soulager les femmes enceintes des nausées fréquentes au cours des premiers mois, ainsi que l'acide valproïque (ou valproate de sodium), un médicament anticonvulsif prescrit en particulier aux femmes épileptiques, ont été pointés du doigt comme étant à l'origine d'un nombre accru de naissances d'enfants diagnostiqués comme autistes par la suite. Le large spectre de syndromes provoqués par une exposition fœtale prolongée à ces substances en fait des facteurs de prédisposition aux désordres psychiatriques en générale (Williams *et al.*, 2001).

Ainsi, l'équipe de Narita (2002) a pu démontrer que la thalidomide et l'acide valproïque causent une augmentation de sérotonine dans l'hippocampe, une augmentation de dopamine dans le cortex frontal et une hypersérotinémie lorsque ces toxiques sont administrés à des rats à un âge embryonnaire de 9 jours. Ces aspects altérés de la neurotransmission ont été rapportés chez plus de 25 % des enfants autistes (Cook *et al.*, 1990), en particulier en ce qui concerne l'hypersérotinémie.

L'exposition à l'alcool *in utero* a également été associée à l'autisme (Aronson *et al.*, 1997), soulignant une association entre alcoolisme maternel et l'apparition d'un comportement autistique avec une perte du langage. Des travaux sont également menés dans la recherche

d'une hypothèse d'intoxication aux neurotoxiques liée soit à des champignons intestinaux, soit à des allergies alimentaires.

Déséquilibre de la balance dopamine/noradrénaline chez la mère

Tout a débuté en 1977 par les travaux de Lake *et al.*, qui rapportaient un niveau anormalement bas dopamine β hydroxylase, enzyme permettant la conversion de la dopamine en noradrénaline, chez des familles de patients autistes. Le génotypage d'un motif de 19 paires de bases présent ou absent dans le promoteur du gène de la dopamine β hydroxylase, DBH, chez 37 familles possédant au moins deux enfants atteints, n'a conduit à aucune association entre l'autisme et une forme du promoteur (Robinson *et al.*, 2001). En revanche, la même équipe a poursuivi son étude chez les mères et a ainsi pu constater que la forme courte de ce promoteur (dépourvue du motif de 19 pb) était alors significativement retrouvée, indiquant que cet allèle est un important facteur de risque d'avoir un enfant autiste. Cette idée est renforcée par l'observation d'une activité diminuée de la dopamine β hydroxylase chez les mères d'enfants autistes, diminution elle même associée à l'allèle court du promoteur. Ces résultats suggèrent donc qu'une activité sérique diminuée de la dopamine β hydroxylase chez la mère pourrait déséquilibrer les conditions environnementales utérines (noradrénaline diminuée par rapport à la dopamine) qui, en association avec une susceptibilité génétique du fœtus, provoquerait l'apparition de la pathologie autistique chez certaines familles.

Hypersérotoninémie maternelle

Le rôle de la sérotonine dans le développement neurologique précoce a également été récemment étudié comme un possible facteur étiologique dans le développement de syndromes autistiques. Avant d'assumer son rôle de neurotransmetteur dans le cerveau mature, la sérotonine régule à la fois le développement des neurones sérotoninergiques, ainsi que le développement des tissus cibles, comme l'hippocampe et le cortex cérébral. Des équipes ont montré des fréquences plus élevées de syndromes autistiques chez les enfants qui ont été exposés *in utero* à des médicaments connus pour augmenter les niveaux de sérotonine, notamment la cocaïne (Davis *et al.*, 1992 ; Kramer *et al.*, 1994) et l'alcool (Nanson, 1992). Dans sa revue sur le rôle de la sérotonine sur les maladies neurodéveloppementales, Whitaker-Azimitia (2001) suggère que des niveaux élevés de sérotonine pendant le développement précoce pourrait provoquer une perte de sérotonine et les terminaux du développement neuronal. Ces conclusions corroborent les résultats de l'équipe de Côté *et al.*

impliquant la sérotonine maternelle dans le contrôle de la morphogénèse au cours du développement avant apparition des neurones sérotoninergiques (Coté *et al.*, 2007). Cette étude indique que la sérotonine est critique pour le développement murin normal et que la sérotonine maternelle pourrait être apparentée à une molécule de signalisation d'action comparable à un morphogène, et que c'est donc le génotype de la mère qui importe plus que celui de la descendance dans l'apparition d'anomalies chez les embryons.

Hypothyroïdisme maternel

Cette hypothèse a émergé suite à l'analyse rétrospective des dossiers cliniques de cinq enfants autistes et de leurs mères, révélant un hypothyroïdisme congénital pour trois des enfants (Gillberg *et al.*, 1992), et suggérant ainsi que le déficit en hormones thyroïdiennes lors du développement précoce pourrait provoquer des dommages du système nerveux central qui seraient responsables de l'apparition de symptômes autistiques. De même, le quotient intellectuel d'enfants dont les mères présentaient un niveau sérique de thyrotropine élevé durant leur grossesse apparaît significativement diminué (Haddow *et al.*, 1999). Cette hypothèse est confirmée par les effets d'un traitement précoce des enfants souffrant d'hypothyroïdisme congénital pour lesquels on a pu noter une amélioration des facultés intellectuelles (Rovet et Ehrlich, 2000).

Une autre explication pourrait être la présence de facteurs auto-immuns liant l'hypothyroïdisme à l'autisme. Les causes immunitaires seront développées dans un des paragraphes suivants.

Infections

De nombreuses études ont été menées sur les effets d'une infection sur le développement de traits autistiques. C'est ainsi qu'une première étude, au décours d'une épidémie, a pu estimer que 10 % des enfants présentant une rubéole congénitale sont atteints d'autisme (Chess, 1977). L'exposition au virus de la rubéole au cours de la grossesse et en particulier avant la maturation de la fonction immunitaire fœtale semblerait donc être responsable de l'apparition de l'autisme (Lotspeich et Ciaranello, 1993). Une méta-analyse de Fombonne (2003) montre que 0,3 % des cas d'autisme peuvent être reliés à une rubéole congénitale. Actuellement la vaccination permet de diminuer fortement l'incidence de cette maladie chez les femmes enceintes.

Une autre infection *in utero* a été mise en cause dans l'apparition de symptômes autistiques, la maladie des inclusions au cytomégalo virus (Sweeten *et al.*, 2004 ; Yamashita *et al.*, 2003). C'est un virus qui contamine 1 à 3 % des femmes en cours de grossesse et pour lesquelles l'infection sera transmise au fœtus dans 40 à 50 % des cas. La contamination *in utero* par le cytomégalo virus semblerait être responsable de l'apparition de l'autisme à condition que cette infection se situe à un moment bien précis du développement du SNC, en l'occurrence vers le troisième trimestre (Barkovich *et al.*, 1994), au moment de la myélinisation.

Certaines études montrent que la réaction inflammatoire maternelle pourrait être à l'origine des séquelles dans certaines régions du cerveau, provoquant une augmentation significative de la mort cellulaire dans la zone striatale subventriculaire, dans le striatum périventriculaire, dans la substance blanche périventriculaire, et dans la zone germinative ventriculaire. Une astrogliose et une forte hypomyélinisation dans la capsule externe et interne ont également été observées, mettant en évidence les conséquences de réactions inflammatoires sur des lésions importantes de la matière blanche cérébrale des nouveau-nés, et pouvant expliquer l'apparition de pathologies neurologiques suite à l'infection maternelle (Rousset *et al.*, 2006).

Causes périnatales

Différents facteurs périnataux semblent associés avec le développement ultérieur de comportements autistiques : l'accouchement par le siège, un épisode anoxique lors de l'accouchement, un score d'Apgar bas à 5 minutes, l'âge gestationnel au moment de la naissance inférieur à 35 semaines d'aménorrhée et une histoire parentale psychiatrique (Larsson *et al.*, 2005). Ces associations sont cependant non spécifiques et mériteraient d'être reproduites dans des populations plus étendues.

Causes immunitaires

Les anomalies du système immunitaire retrouvées dans des cas d'autisme se traduisent par des variations quantitatives et qualitatives des macrophages, des cellules T, des cellules B, ainsi qu'une perturbation de l'activité des cellules tueuses NK (natural killer) (Warren *et al.*, 1986 ; Warren *et al.*, 1987). Une autre étude a indiqué que les réponses immunitaires innées et acquises chez les enfants atteints d'autisme sont associées à des valeurs élevées de facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-alpha pour Tumor Necrosis Factor-alpha), d'IL-1 β et/ou d'IL-6 (Jyonouchi *et al.*, 2001).

D'une manière générale, l'augmentation de la prévalence des maladies auto-immunes chez les apparentés est courante pour les sujets présentant des maladies auto-immunes ; mais si l'augmentation des cas familiaux de maladies auto-immunes est vérifiées dans les familles présentant des cas d'autisme, des recherches supplémentaires sur les contributions immunologiques dans la physiopathologie de l'autisme sembleraient être justifiées.

Il a également été rapporté la présence significative dans les séra d'anticorps préférentiellement dirigés contre des structures cérébrales, telles que le noyau caudé, le cortex cérébral et le cervelet (Singh *et al.*, 2004) ; il peut être proposé qu'une réaction immunitaire dans cette région du cerveau, entre autres, peut causer des dégâts neurologiques chez les enfants autistes.

D'un point de vue immunitaire, il est également possible d'évoquer la polémique qui est apparue ces dernières années concernant le rôle potentiel de la vaccination dans l'apparition du syndrome autistique (en particulier avec le vaccin rougeole-oreillons-rubéole (ROR)). Cependant les récentes revues de la littérature (Doja et Roberts, 2006 ; DeStefano, 2007) ont trouvé très peu d'études appuyant cette théorie, avec une écrasante majorité ne montrant aucune association causale entre le ROR et l'autisme.

Génétique de l'autisme

Il est donc admis que plusieurs mécanismes non-génétiques peuvent contribuer à l'apparition du syndrome autistique. Les arguments disponibles indiquent cependant que la part génétique de cette pathologie est probablement prépondérante et incontestable. Un peu paradoxalement l'identification sans équivoque des gènes impliqués dans l'autisme reste un objectif difficile à atteindre, mais nous verrons que cela peut être expliqué par certains des modèles génétiques proposés.

Les arguments en faveur d'une étiologie génétique

Les études familiales

De fortes preuves indirectes soutiennent l'hypothèse du rôle des facteurs génétiques dans l'étiologie de l'autisme. Les études menées sur les jumeaux indiquent qu'il existe une concordance de près de 60 % chez les jumeaux monozygotes contre seulement 3 à 5 % chez

les jumeaux dizygotes, accompagné d'une héritabilité estimée à environ 90 % (Steffenburg *et al.*, 1989 ; Folstein et Rutter, 1977 ; Bailey *et al.*, 1995 ; Le Couteur *et al.*, 1996).

Les études familiales montrent un taux de récurrence au sein de la famille de 5 à 8 % (Szatmari *et al.*, 1998), ce qui se traduit par un risque dix fois plus important que dans la population générale (CDC, 2007 ; Chakrabarti et Fombonne, 2005). Les études cliniques détaillées effectuées sur ces jumeaux et leur famille ont également mis en évidence chez les apparentés des caractéristiques phénotypiques autistiques, mais exprimées de façon beaucoup plus atténuée. On retrouve ainsi une variété de légères perturbations de la communication (telles que des retards d'acquisition du langage ou de développement des interactions sociales), ou des comportements restreints se traduisant par une personnalité rigide ou perfectionniste (pour revue, voir Losh *et al.*, 2008). La concordance de ce phénotype élargi grimpe à près de 80 % dans les jumeaux monozygotes contre 10 % chez les jumeaux dizygotes, renforçant l'hypothèse d'une implication génétique dans l'apparition de ces traits.

La littérature révèle l'observation de multiples anomalies comportementales qui apparaissent de façon indépendante chez les apparentés non autistes (Szatmari *et al.*, 2000 ; Constantino *et al.*, 2006 ; Losh *et al.*, 2008). De telles caractéristiques pourraient fournir une preuve supplémentaire pour des causes génétiques dans l'étiologie de l'autisme. L'utilisation de ces informations phénotypiques chez les apparentés pourrait représenter une approche complémentaire pour la détection des gènes à l'origine de l'autisme.

La recherche génétique sur les familles avec plusieurs enfants touchés et les études des mécanismes biochimiques représentent les bases de l'identification des gènes de susceptibilité à l'autisme. Les enfants avec dysmorphies, anomalies congénitales, retard mental, ou les membres de famille souffrant de perturbations du développement sont les plus susceptibles de bénéficier d'explorations médicales approfondies et de consultations génétiques.

Les maladies génétiques associées à l'autisme

Lorsque les traits phénotypiques qui définissent la triade autistique sont observés chez des patients présentant également une autre pathologie pour laquelle l'origine génétique a été démontrée, on parle d'autisme syndromique. L'étude de ces pathologies peut contribuer à une meilleure compréhension des processus physiopathologiques moléculaires, cellulaires et comportementaux à l'origine de l'autisme.

On peut citer parmi les différents autismes syndromiques le syndrome de Rett, la sclérose tubéreuse de Bourneville, les syndromes d'Angelman et de Prader Willi (implications du chromosome 15q), et le syndrome de l'X fragile.

Il est cependant important de souligner les conclusions de la récente revue de Moss et Howlin constatant qu'il existe des différences qualitatives subtiles dans la présentation des syndromes autistiques dans les maladies associées (Moss et Howlin, 2009). D'après leurs analyses, la déficience mentale de l'individu a clairement un rôle à jouer en ce qui concerne la présentation de caractéristiques de type autistique, et des précautions doivent être prises lors de l'évaluation des symptômes autistiques dans les maladies génétiquement déterminées associées à des déficiences mentales sévères. Même si le degré de déficience mentale ne peut être le seul indicateur de la prévalence élevée des caractéristiques d'autisme dans certains syndromes spécifiques, il reste nécessaire d'interpréter avec prudence les similitudes entre l'autisme et les phénotypes comportementaux de certaines maladies génétiques associées (Moss et Howlin, 2009).

Le syndrome de Rett

Nous avons déjà évoqué cette pathologie dans le cadre de la classification des TED par la CIM-10 et le DSM-IV (F84.2). Le syndrome de Rett (MIM n°312750) est une pathologie neurologique progressive et l'une des causes les plus fréquentes de retard mental chez les femmes. Son nom vient d'Andreas Rett qui décrivit cette pathologie pour la première fois en 1966 (Rett, 1966), mais le syndrome a été reconnu à l'échelle internationale suite à la description de 35 cas par Hagberg *et al.* en 1983. Comme nous l'avons vu, le syndrome de Rett est caractérisé par un développement normal au cours des 6 à 18 premiers mois de la vie, suivi d'une période de régression du langage et de la motricité accompagné de stéréotypies. Ils présentent généralement un périmètre crânien normal à la naissance, suivi d'un ralentissement postnatal de la croissance cérébrale. En réalité les patientes atteintes de ce syndrome ne ressemblent que très peu à des autistes, même si le retrait social, les défauts de communication, la perte des acquis du langage et les déficits cognitifs sont également des caractéristiques communes des patients atteints du syndrome de Rett mais de façon transitoire et par des traits isolés. Les autres caractéristiques comprennent des attaques de panique, des dysfonctionnements respiratoires (épisodes d'apnée et/ou d'hyperpnée), du bruxisme, une détérioration du sommeil, une cyphose ou une scoliose progressive, une diminution de la

croissance somatique et des pieds et/ou des mains hypotrophiques petits et froids (Weaving *et al.*, 2005 ; Williamson et Christodoulou, 2006).

Les mutations dans le gène *MeCP2* qui code une protéine de liaison aux CpG méthylés (MeCP2 pour methyl-CpG-binding protein) provoquent environ 80 % des cas de syndrome de Rett (Amir *et al.*, 1999). *MeCP2* est impliquée dans l'inhibition de la transcription grâce à la méthylation de l'ADN. Elle est exprimée dans tous les tissus, ce qui est relativement surprenant dans la mesure où le syndrome de Rett apparaît avant tout comme une maladie neurologique. Le gène *MeCP2* est localisé sur le chromosome X, et les mutations dans ce gène sont généralement létales chez les hommes. La survenue de mutations dans le gène *MeCP2* d'hommes vivants est généralement en rapport avec différents types de mosaïcisme ou des formes légères de mutations : ils présentent soit un mosaïcisme somatique de la mutation (Clayton-Smith *et al.*, 2000), soit un caryotype partiel ou complet de Klinefelter (47, XXY) (Schwartzman *et al.*, 1998).

La sclérose tubéreuse de Bourneville

La sclérose tubéreuse de Bourneville (ou TSC pour Tuberous Sclerosis Complex) est une maladie essentiellement héréditaire à forte pénétrance, caractérisée par la présence de lésions tumorales (hamartomes) dans plusieurs organes, provoquées par des mutations dans l'un des gènes suppresseurs de tumeurs, *TSC1* (9q34) codant l'hamartine ou *TSC2* (16p13.3) codant la tubérine (Curatolo, 2003). Le complexe TSC1/TSC2 joue un rôle important lors du développement cortical et concernant le contrôle de la croissance des cellules nerveuses.

Le plus souvent, les manifestations neurologiques de la sclérose tubéreuse de Bourneville sont une épilepsie, un retard mental, des déficits cognitifs, des problèmes comportementaux, et des caractéristiques autistiques dans environ 15 % à 60 % des cas (Asato et Hardan, 2004 ; Curatolo *et al.*, 2004 ; Curatolo *et al.*, 2008). Les progrès dans l'imagerie structurale et fonctionnelle ont conduit à la caractérisation de lésions cérébrales, comprenant les tubercules corticaux, les nodules sub-épendymaux, les cellules tumorales géantes sub-épendymales et les anomalies de matière blanche (DiMario Jr, 2004 ; Luat *et al.*, 2007). Dans la mesure où la TSC implique des lésions corticales facilement identifiables, des études ont tenté d'établir une corrélation entre la localisation des lésions et la présence des symptômes d'autisme. Mais alors que plusieurs études ont signalé des lésions dans le lobe temporal associées à l'autisme (Bolton et Griffiths, 1997 ; Seri *et al.*, 1999), d'autres ont rapporté des associations avec des

lésions plus diffuses (Asano *et al.*, 2001 ; Eluvathingal *et al.*, 2006) ; dans d'autres cas, la présence d'autisme dans la TSC n'a pas été corrélée avec des lésions dans des régions particulières du cerveau (Goorden *et al.*, 2007).

Les anomalies du chromosome 15q

La prévalence des anomalies de structure chromosomique chez les individus autistes est de 5 à 10 %, tous les chromosomes ayant été au moins une fois mis en cause l'autisme. Parmi toutes les anomalies chromosomiques décrites, celles impliquant le bras long du chromosome 15 ainsi que celles concernant le nombre et la structure des chromosomes sexuels restent de loin les plus fréquemment rapportées. La région chromosomique 15q11-q13, également connu sous le nom de région PWS/AS (pour Prader-Willi Syndrome/Angelman Syndrome), contient des gènes soumis à empreinte épigénétique.

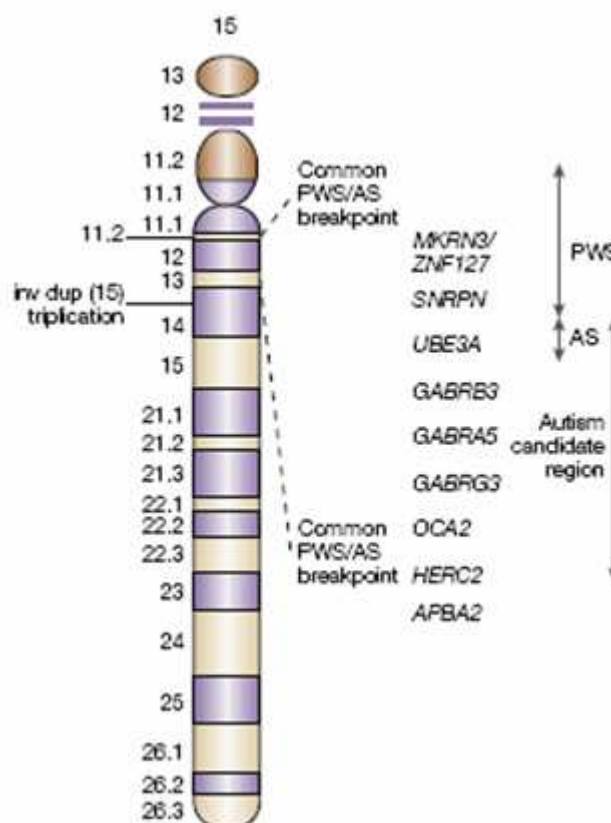


Figure 3 : Régions du chromosome 15 potentiellement impliquées dans l'autisme (extrait de Folstein et Rosen-Sheidley, 2001). Schéma du chromosome 15 indiquant la position des gènes de la région 15q11-q13, incluant ceux des régions critiques pour les syndromes d'Angelman (AS) et de Prader-Willi (PWS) chevauchant la zone candidate pour l'autisme.

Le syndrome de Prader Willi

Le syndrome de Prader-Willi est une maladie génétique rare, congénitale et héréditaire, qui a été décrite pour la première fois par Down (1887) et présentée par Prader *et al.* en 1956 comme une maladie causant des perturbations du système neuroendocrinien, avec une altération de la fonction hypothalamique aboutissant à l'apparition d'une obésité. La prévalence de cette maladie est estimée entre 1/10 000 à 1/22 000 (Butler *et al.*, 2002). Elle est caractérisée par une hypotonie sévère et des difficultés d'alimentation qui conduit à la mise en place progressive d'une obésité morbide, une déficience mentale variable, un retard de développement, un comportement distinctif, un hypogonadisme, voire une stérilité. Les symptômes comportementaux caractéristiques comprennent des crises de colère, de la révolte et de l'entêtement, une fragilité émotionnelle, et des comportements compulsifs comme des automutilations (Dykens *et al.*, 1999).

Le syndrome de Prader-Willi est associé avec la région chromosomique 15q11-13. Ce syndrome est dû à l'absence d'expression des gènes d'origine paternelle de cette région suite, entre autre, à une délétion chromosomique ou une disomie uniparentale maternelle (Robinson *et al.*, 1991). Dans environ 70 % des cas, le syndrome de Prader-Willi est le résultat de la perte de la région 15q11-13 paternelle ; environ 28 % des cas sont attribués à une disomie uniparentale maternelle, et pour moins de 2 % des cas, il est le résultat d'une mutation, délétion ou autre défaut dans la région soumise à empreinte (Robinson *et al.*, 1991). Parmi les gènes situés dans cette région 15q11-13, on peut citer le gène SNRPN (Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptid N) codant deux protéines (SNURF (SNRPN upstream reading frame) et le facteur d'épissage SmN), ou le gène NDN (Necdine) jouant un rôle dans la différenciation neuronale (Lalande et Calciano, 2007).

Le syndrome d'Angelman

Les principales caractéristiques cliniques du syndrome d'Angelman sont des perturbations cognitives graves, un visage d'aspect joyeux, une ataxie, une épilepsie avec un tracé typique d'électro-encéphalogramme, peu ou pas de capacités de communication, et un visage dysmorphique. Le syndrome d'Angelman a de nombreux points communs avec le syndrome de Rett, avec notamment un état neurologique et un périmètre crânien apparemment normaux à la naissance, suivis d'une microcéphalie acquise, des perturbations graves de la parole, des comportements autistiques, des épilepsies et une scoliose. Cependant contrairement au syndrome de Rett, le syndrome d'Angelman touche de manière égale les deux sexes, sans

régression du développement. Le syndrome d'Angelman a une prévalence de 1 pour 12 000 à 1 pour 20 000 dans la population générale (Guerrini *et al.*, 2003) et peut être à l'origine de près de 6 % des cas de retard de développement profond et des épilepsies chez les enfants (Kyllerman, 1995). Il est provoqué par une variété de mécanismes affectant le segment chromosomique 15q11-q13, région soumise à une différence de désactivation des gènes par méthylation au cours de la gamétogenèse chez les parents et qui contient un certain nombre de gènes, y compris le gène codant la protéine ubiquitine-ligase UBE3A, mis en cause dans le syndrome d'Angelman. La perte de fonction d'UBE3A est à l'origine de plus de 80 % des syndromes d'Angelman (Jedele, 2007) et elle peut se produire par au moins quatre mécanismes différents : la suppression de l'allèle maternel d'UBE3A et des gènes environnants, comprenant des délétions d'environ 4 Mb ; la disomie uniparentale ne conservant que les copies d'origine paternelle ; la présence de mutation dans le centre de contrôle de cette région soumise à empreinte parentale, provoquant un profil de méthylation anormal permettant aux deux copies d'être actives comme si il s'agissait de deux copies paternelles ; ou une mutation du gène UBE3A maternel inactivant sa fonction mais laissant les deux profils de méthylation paternel et maternel intacts (Jiang *et al.*, 1999).

Le syndrome de l'X fragile

Le syndrome de l'X fragile est la cause la plus fréquente de retard mental héréditaire (Cohen *et al.*, 2005), touchant environ 1 homme sur 4 000 et 1 femme sur 6 000 (Sherman *et al.*, 2002). Le syndrome de l'X fragile est associé à un nombre trop élevé de répétitions du trinuécléotide CGG au sein de la région 5' non traduite du gène *FMR1*, situé sur le chromosome X (Kaufmann et Reiss, 1999). Selon le nombre de répétitions CGG (Maddalena *et al.*, 2001), les allèles sont classés comme normal (5 à 40 répétitions), intermédiaire ou en zone grise (environ 45 à 54 répétitions), en prémutation (environ 55 à 200 répétitions), ou en mutation complète (plus de 200 répétitions), ce dernier nombre correspondant au diagnostic biologique du syndrome de l'X fragile (Hagerman *et al.*, 2009). Un mosaïcisme de tailles, présentant un profil mixte d'allèles avec des mutations complètes et des prémutations est également inclus dans la dénomination de syndrome de l'X fragile (Rousseau *et al.*, 1994 ; Kaufmann *et al.*, 1999). La mutation complète conduit à une hyperméthylation du gène *FMR1* entraînant l'inactivation du gène, exprimée phénotypiquement chez les hommes par des déficits cognitifs et des anomalies comportementales (Hagerman *et al.*, 2009). Les allèles correspondant à des prémutations sont associés à une déficience cognitive plus légère que

pour la mutation complète (Kaufmann *et al.*, 1999), et à un meilleur développement des capacités d'adaptation (Cohen *et al.*, 1996). Le syndrome de l'X fragile affecte hommes et femmes, mais les hommes, avec un seul chromosome X, sont généralement plus sévèrement touchés.

L'autisme est l'une des plus graves anomalies comportementales observées dans le syndrome de l'X fragile (Hall *et al.*, 2008), avec des taux de prévalence allant de 25 % à 52 % chez les hommes (Kaufmann *et al.*, 2004 ; Hatton *et al.*, 2006 ; Clifford *et al.*, 2007 ; Hall *et al.*, 2008), en fonction des critères et des méthodes utilisées pour le diagnostic. Jusqu'à 90 % des hommes présentant un syndrome de l'X fragile affichent une certaine forme de comportement atypique caractéristique de l'autisme, incluant l'évitement du regard, le retrait et l'anxiété sociale, ainsi que des comportements répétitifs ou stéréotypés (comme le battement des mains ou les automutilations) (Hall *et al.*, 2008). Les garçons atteints à la fois du syndrome de l'X fragile et d'autisme affichent globalement une plus grande perte de cognition et des capacités d'adaptation ainsi que des altérations du comportement plus graves par rapport aux garçons touchés par le syndrome de l'X fragile sans autisme (Hernandez *et al.*, 2009).

Les stratégies de recherche directe de gènes impliqués dans l'autisme

Il existe différentes approches pour considérer les maladies génétiques, en fonction du type de génopathie.

Dans le cas des maladies monogéniques mendéliennes, un seul gène anormal est responsable de la maladie ; on parle de gène de causalité. La mutation du gène de causalité peut avoir différentes conséquences fonctionnelles : il existe des mutations aboutissant à des pertes ou au contraire à des gains de fonction, ainsi que des mutations à effet dominant négatif pour lesquelles la protéine anormale interfère avec la protéine normale en diminuant voire en supprimant son activité. La mutation donne naissance à un allèle dont l'expressivité peut être variable. L'allèle aura une influence variable sur le phénotype selon que cet allèle présente un effet dominant ou récessif.

Cependant la majorité des génopathies appartiennent au groupe des maladies complexes, maladies multifactorielles pour lesquelles l'influence polygénique est prouvée ou supposée, c'est-à-dire que l'apparition de la maladie est occasionnée par l'anomalie de plusieurs gènes. On parle alors de gènes de susceptibilité. Contrairement aux gènes de causalité, les allèles des

gènes de susceptibilité ne suffisent pas pour induire une maladie : les allèles de susceptibilité confèrent uniquement un risque accru de développer la maladie.

Les marqueurs étudiés dans le cadre de maladies complexes sont les polymorphismes, séquences d'ADN variables intra ou extragéniques. On distingue les polymorphismes multialléliques, comme les microsatellites ou les répétitions en tandem (VNTR pour variable number tandem repeat), ou bialléliques, appelés également SNP, qui sont les plus largement utilisés. Quelque soit le type de polymorphisme, ils peuvent avoir des effets fonctionnels (modification structurale ou conformationnelle, modulation de l'activité de la protéine correspondante, modulation de l'expression du gène, modification des sites d'épissage) ou rester neutres (aucune conséquence fonctionnelle) mais servir d'outils pour identifier une région d'intérêt.

L'exploration de ce type de génopathie peut s'effectuer grâce aux études d'association, dont le principe est de comparer les fréquences des allèles d'un marqueur génétique chez des malades et chez des témoins appariés ; si pour un des allèles on trouve un excès ou un déficit chez les malades, on peut conclure à l'association. Soit le marqueur associé est directement impliqué dans la maladie (variant fonctionnel), soit il est en déséquilibre de liaison avec le gène. Pour éviter les biais dus au groupe témoin, les tests de déséquilibre de transmission (TDT) sont également utilisés en étudiant le malade et ses deux parents. Le test TDT compare la fréquence avec laquelle un allèle particulier est transmis par un parent hétérozygote à l'enfant atteint. Si l'allèle n'est pas associé à la maladie, il est transmis dans 50 % des cas. En revanche, s'il est transmis dans plus de la moitié des cas, on peut conclure à l'association. Ce test étudie en même temps l'association et la liaison génétique.

Le cas de l'autisme est complexe car il est difficile de trancher entre maladie monogénique ou complexe. Certaines mutations ont été identifiées comme étant à l'origine de la maladie, avec en parallèle l'identification de nombreux gènes de susceptibilité. La vérité se situe probablement entre les deux, et les études doivent donc être poursuivies dans les deux sens.

Les méthodes d'exploration

La dernière décennie a vu naître un arsenal de techniques et d'outils génétiques permettant d'étudier la base génétique des maladies, tels que le séquençage du génome humain, l'identification de variants génétiques par le biais du projet HapMap, et le développement du

génotypage à haut débit. Selon les anomalies génétiques recherchées, la méthode d'analyse utilisée sera différente.

Les anomalies cytogénétiques

Les anomalies cytogénétiques correspondent à des modifications du nombre ou de la structure des chromosomes, ou à des remaniements de fragments chromosomiques. Les techniques permettant l'étude des anomalies chromosomiques correspondent aux méthodes de cytogénétique classique (réalisation de caryotype) ou d'hybridation *in situ* par des sondes fluorescentes FISH (Fluorescent In-Situ Hybridation) qui impose une recherche ciblée. Enfin plus récemment l'hybridation génomique comparative (CGH) (Solinas-Toldo *et al.*, 1997) et les analyses par micropuces oligonucléotidiques (Lucito *et al.*, 2003) permettent d'identifier des *loci* génomiques liés à l'autisme par criblage de plus grands échantillons de patients pour de plus petites régions de duplication ou de délétion.

Les anomalies chromosomiques détectées par les techniques cytogénétiques sont souvent la principale source de localisation des gènes des maladies monogéniques ou polygéniques. Un certain nombre de ces points de cassure, translocations, duplications et délétions visibles ont été signalés principalement pour des cas d'autisme, s'étendant sur tous les chromosomes comme cela a été largement décrit dans les dernières revues sur le sujet (Martin et Ledbetter, 2007 ; Vorstman *et al.*, 2006 ; Castermans *et al.*, 2004). Les intégrations des données des analyses de liaison et des rapports d'anomalies chromosomiques sont utiles pour affiner les régions génomiques d'intérêt pour la cartographie fine de gènes de susceptibilité.

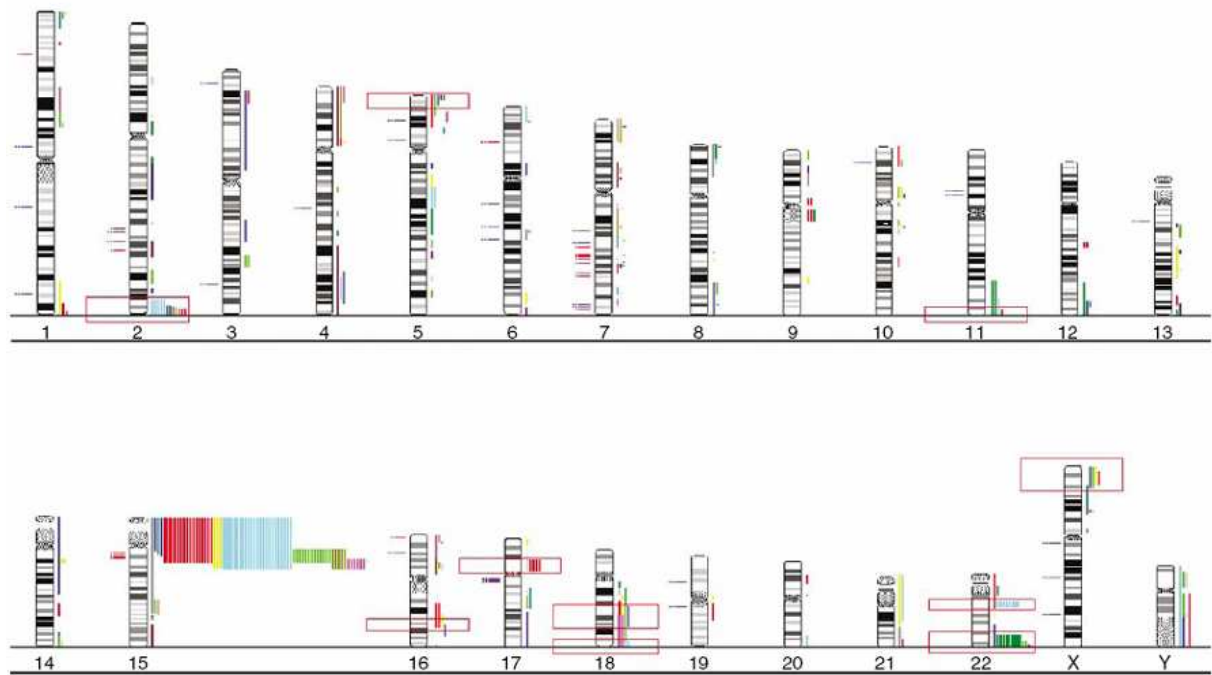


Figure 4 : Représentation générale de toutes les régions cytogénétiques d'intérêt (CROIs: Cytogenetic regions Of Interest) associées à l'autisme (extrait de Vorstman *et al.*, 2006). A gauche des chromosomes : les régions liées (Lod score > 2) sont représentées par des traits bleus, celles associées ($P < 0,05$) par des traits rouges. A droite des chromosomes : les barres verticales représentent les CROIs ; les barres de même couleur indiquent que cette CROI a été rapportée plus qu'une fois dans la littérature. Les rectangles rouges indiquent les nouvelles régions d'intérêt potentiel quand un locus commun est rapporté plus de quatre fois associé à des anomalies chromosomiques, sans qu'il soit préalablement lié ou associé.

La région chromosomique 15q11-q13 fait l'objet d'une attention particulière en raison de fréquentes descriptions de duplications d'origine essentiellement maternelle (Vorstman *et al.*, 2006). La région d'intérêt comporte un groupe de gènes des sous-unités des récepteurs à l'acide gamma-amino butyrique (GABAA) : *GABRB3*, *GABRA5* et *GABRG3*. Tout dysfonctionnement de ces gènes peut avoir des implications concernant l'inhibition des voies neuronales excitatrices ainsi que durant le développement cérébral précoce. Des études de liaison et d'association ont rapporté des preuves limitées de l'implication des récepteurs GABAA, sauf pour le gène *GABRB3* retrouvé plusieurs fois associé à l'autisme (Cook *et al.*, 1998 ; Martin *et al.*, 2000 ; Buxbaum *et al.*, 2002 ; McCauley *et al.*, 2004 ; Curran *et al.*, 2005).

Une autre région d'intérêt est la région sub-télomérique de 2q37 avec une fréquence plus élevée de délétions par rapport à d'autres régions chromosomiques (Ghaziuddin et Burmeister, 1999 ; Wolff *et al.*, 2002 ; Lukusa *et al.*, 2004). Une analyse détaillée d'un vaste échantillon de patients concernant les variants présents dans le gène *CENTG2* a révélé un nombre limité de variants non-synonymes spécifiques de l'autisme (Wassink *et al.*, 2005). L'implication d'autres gènes dans la région 2q37 pourrait également être envisagée.

Les anomalies génomiques

Les anomalies génomiques correspondent à des modifications chromosomiques infracytogénétiques, trop petites pour être visibles par les techniques cytogénétiques, incluant les microremaniements, les microdélétions et les microduplications, et impliquant donc souvent plusieurs gènes. Ces microdélétions et microduplications (ou variations du nombre de copies, CNV) se produisent en abondance dans la population générale et semblent très répandues dans l'ensemble du génome. Par exemple, l'équipe de Sebat a trouvé des CNV d'une moyenne proche de 400 kb de longueur et couvrant 12 % du génome des échantillons HapMap (Sebat *et al.*, 2004).

Ces anomalies génomiques peuvent être étudiées par des techniques de PCR quantitative ou de CGH ; les techniques de criblage anonyme du génome permettent également de mettre en évidence des zones et des gènes de susceptibilité à l'autisme.

L'équipe de Jacquemont a détecté des CNV de novo chez 24 % des personnes autistes (Jacquemont *et al.*, 2006), et deux frères autistes présentaient des CNV dans le gène de la neurexine *NRXN1* (Szatmari *et al.*, 2007). Récemment, un article paru dans Nature a pu mettre en évidence la présence de nouveaux CNV dans des gènes de la voie de l'ubiquitine (*UBE3A*, *PARK2*, *RFWD2* et *FBXO40*) (Glessner *et al.*, 2009). Une autre étude menée sur 912 familles touchées par l'autisme et 1488 contrôles a identifié plus de 150 *loci* contenant des variants rares chez plusieurs patients autistes, retrouvant des variants rares à des *loci* connus (délétion exonique du gène *NRXN1*, duplications de gènes entiers comprenant *UBE3A* et plusieurs autres gènes de la région 15q11-q13), mais identifiant également de nouveaux gènes, comme *BZRAP1* (molécule de régulation de la transmission synaptique) ou *MDGA2*.

L'équipe de Weiss a également décrit un CNV récurrent dans l'autisme dans plusieurs échantillons (Weiss *et al.*, 2008). Des chercheurs ont trouvé des duplications et délétions en 16p11.2 associées à l'autisme dans 1 % des cas, absentes dans deux différents groupes de

contrôle psychiatrique, et détectées dans seulement 0,01 % des contrôles sains. Une délétion identique de 593 kb et une microduplication réciproque ont été trouvées dans deux échantillons distincts. Les variations du nombre de copies dans cette région ont été détectées dans deux autres études sur l'autisme (Marshall *et al.*, 2008 ; Sebat *et al.*, 2007). Bien que ces résultats soient convaincants, ils ne sont pas nécessairement spécifiques à l'autisme dans la mesure où des délétions et duplications en 16p11.2 ont également été observées à des taux élevés chez les personnes présentant des retards de développement.

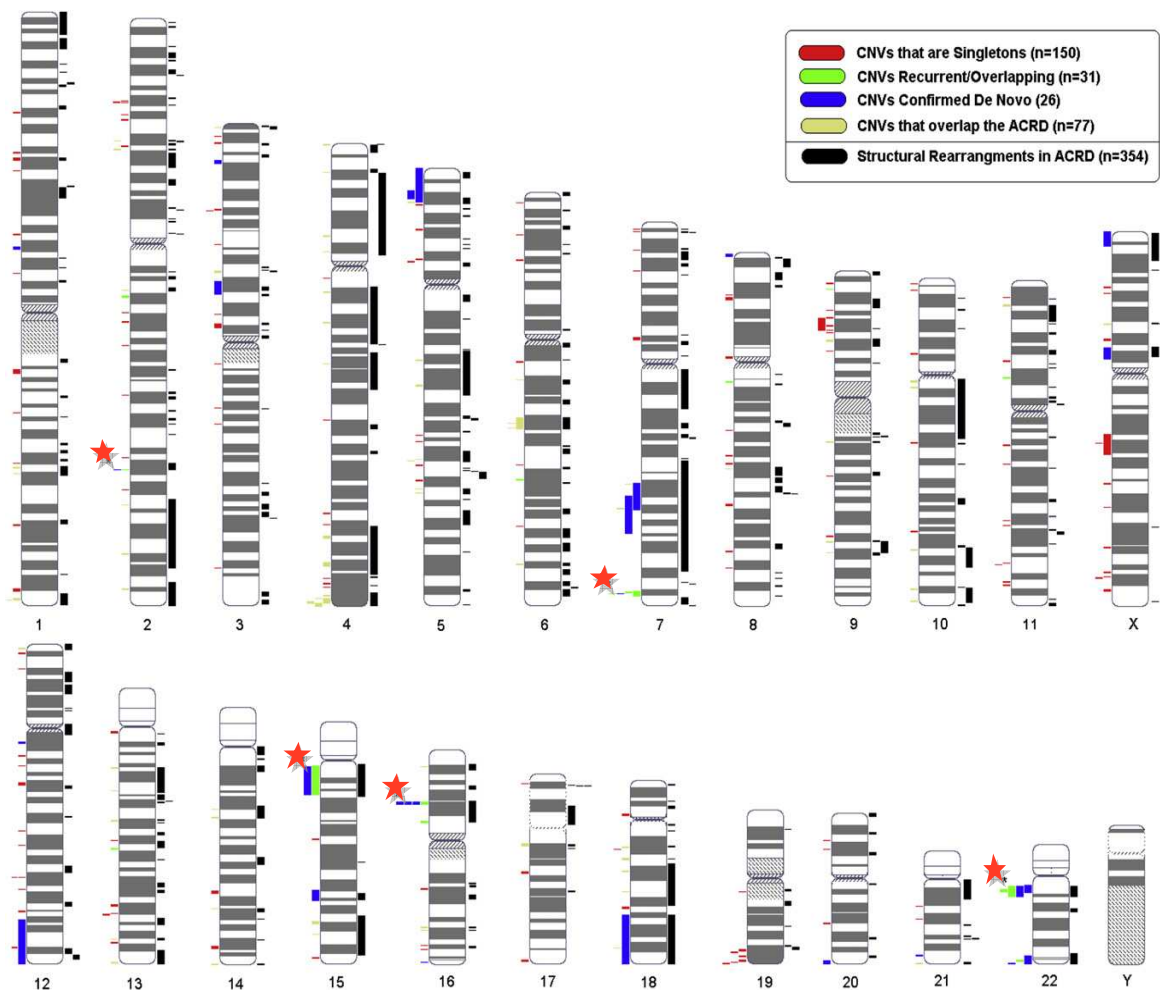


Figure 5 : Répartition génomique des CNV dans l'autisme (extrait de Marshall *et al.*, 2008). Les CNV issus de la base de données ACRD (Autism Chromosome Rearrangement Database) sont en noir. Les CNV issus de données strictement spécifiques de l'autisme répertoriés par l'équipe de Marshall sont à gauche des chromosomes (couleur légendée). Les étoiles rouges soulignent la présence de cinq CNV appartenant à la fois aux catégories *de novo* et récurrents.

Des mutations rares, spontanées et à forte pénétrance pourraient expliquer une partie des cas d'autisme (Sebat *et al.*, 2007), ce qui est compatible avec la plupart des cas sporadiques d'autisme, tandis que les modèles multiplicatifs prennent mieux en compte les familles dans lesquelles plusieurs cas d'autisme et/ou de phénotypes plus larges se retrouvent parmi les apparentés (Beaudet, 2007). À l'appui de ce point de vue, les récents travaux de l'équipe de Sebat suggèrent que les CNV *de novo* sont présents beaucoup plus fréquemment dans les familles avec un seul cas de l'autisme que dans les familles multiplex (Sebat *et al.*, 2007). Dans leur étude, les CNV spontanés étaient présents dans 10 % des cas sporadiques d'autisme, contrastant avec des taux sensiblement plus faibles observés chez les contrôles (1 %) et chez les cas d'autistes issus de familles multiplex (3 %). Dans une autre étude, les CNV *de novo* ont été détectés chez 7 % des cas sporadiques d'autisme, contre 2 % des cas issus de familles multiplex (Marshall *et al.*, 2008).

Enfin on peut noter qu'une étude récente (Guilmatre *et al.*, 2009) a pu montrer que la fréquence de CNV est significativement augmentée dans les cas d'autisme, dans les cas de schizophrénie, et dans les cas de déficience mentale par rapport aux témoins, et que la plupart de ces CNV (qui contiennent des gènes impliqués dans la neurotransmission ou dans la formation et la maintenance des synapses) sont présents dans les 3 pathologies (schizophrénie, autisme, déficience mentale), soutenant l'existence de voies biologiques partagées dans ces maladies neurodéveloppementales.

Les anomalies géniques

Les anomalies géniques correspondent à des anomalies ponctuelles, nécessitant l'analyse de la séquence d'ADN. Ces anomalies peuvent être étudiées à l'échelle du génome entier, ou être découvertes suite à des approches ciblées par gènes candidats.

Les approches par gènes candidats

Les premières études de génétique moléculaire dans l'autisme ont pris la forme d'études d'association de gènes candidats. Différents critères interviennent dans le choix des candidats, sélectionnés sur la base de leur implication dans des voies liées au neurodéveloppement ou autres voies moléculaires spécifiques mises en cause sur des bases pharmacologiques ou dans les études de modèles animaux, jouant un rôle dans le comportement humain, ou identifiés par le biais d'anomalies chromosomiques et/ou de leur localisation à proximité de régions liées à

l'autisme. Sur plus de 100 gènes étudiés pour leur implication dans l'autisme, seuls quelques-uns ont pu être retrouvés lors de répliques de l'étude, en raison probablement de l'hétérogénéité des échantillons ou de leur petite taille, du bruit de fond dû aux différences ethniques, ou de faux positifs. Les gènes apparus comme candidats les plus plausibles sont : le transporteur de la sérotonine *SLC6A4* ; le gène *MET* ; le gène de la reeline *RELN* ; les gènes suppresseurs de tumeur *PTEN*, *TSC1* et *TSC2* ; et les neuroligues ainsi que leurs partenaires.

SLC6A4

Le gène *SLC6A4* code le transporteur de la sérotonine exprimé dans le cerveau et les plaquettes. Impliqué par des preuves pharmacologiques (McDougle *et al.*, 1996) et par les observations répétées de niveaux élevés de sérotonine plaquettaire dans environ 25 % à 30 % des cas d'autisme (Cook *et al.*, 1990 ; voir le chapitre plus haut), la voie de la sérotonine est l'une des cibles initiales des études de gènes candidats de l'autisme. Les études sur le locus de *SLC6A4* confirment généralement son implication dans l'autisme, mais les résultats n'ont pas convergé sur un allèle spécifique du même polymorphisme (Tordjman *et al.*, 2001 ; McCauley *et al.*, 2004 ; Sutcliffe *et al.*, 2005 ; Mulder *et al.*, 2005 ; Wassink *et al.*, 2007). Plusieurs travaux ont mis l'accent sur un polymorphisme dans la région promotrice, *5HTTLPR*. Même si un déséquilibre de transmission des allèles de *5HTTLPR* a été signalé dans plusieurs études (Kim *et al.*, 2002 ; Cook *et al.*, 1997), ces résultats ne sont pas toujours confirmés (Yirmiya *et al.*, 2001 ; Maestrini *et al.*, 1999 ; Klauck *et al.*, 1997). Cependant les méta-analyses semblent confirmer l'association entre l'allèle court de *5HTTLPR* et l'autisme.

MET

Le gène *MET*, qui est situé dans la région candidate 7q31, est également un candidat fonctionnel pour son implication dans l'autisme, car il code un récepteur du facteur de croissance des hépatocytes à activité tyrosine kinase impliqué dans la croissance et l'organisation neuronale, ainsi que dans le fonctionnement immunitaire et gastro-intestinal, qui sont des systèmes dans lesquels des anomalies ont été suggérées dans l'autisme. Des variants dans la région promotrice de *MET* montrent une forte association avec l'autisme. En particulier, Campbell *et al.* en 2006 ont constaté d'importantes sur-transmissions de l'allèle C dans les cas d'autisme parmi plusieurs échantillons. Les comparaisons cas-témoins ont démontré une surreprésentation significative de l'allèle C dans l'autisme. Dans une autre étude, des concentrations de protéines MET considérablement diminuées ont été trouvées

dans le tissu cortical post-mortem de personnes autistes (Campbell *et al.*, 2007). L'allèle C est considéré comme un régulateur fonctionnel du gène *MET*. La même équipe avait précédemment également constaté dans des cellules de souris transfectées avec des variants humains du promoteur de *MET* que l'activité de ce promoteur associé à l'allèle C était divisée par 2 (Campbell *et al.*, 2006).

RELN

Le gène *RELN* code la protéine reeline qui contrôle les interactions intercellulaires impliquées dans la migration et le positionnement neuronal au cours du développement cérébral (Rice et Curran, 2001). *RELN* est localisé dans la région chromosomique 7q22, où des liaisons à l'autisme ont été rapportées dans plusieurs études. Les études d'association basées sur les familles et sur les populations indiquent également que les variations de *RELN* peuvent constituer un facteur de risque d'autisme. En particulier, une grande répétition polymorphe d'un trinucléotide dans la région 5'UTR du gène *RELN* a été impliquée dans l'autisme dans plusieurs études (Ashley-Koch *et al.*, 2007 ; Persico *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2002). La transmission préférentielle du polymorphisme comportant un nombre élevé de répétitions dans les fratries autistes a également été rapportée (Persico *et al.*, 2001 ; Dutta *et al.*, 2007). Mais là encore plusieurs études n'ont pu confirmer cette association dans diverses autres populations (Bonora *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2004 ; Devlin *et al.*, 2004 ; Dutta *et al.*, 2008).

Le gène suppresseur de tumeur *PTEN*

PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la voie biochimique qui empêche la croissance et la division incontrôlées des cellules. Des mutations de *PTEN* provoquent le syndrome de Cowden et d'autres maladies, et sont souvent associées à une macrocéphalie. S'appuyant sur l'observation d'une association entre l'autisme et le syndrome de Cowden, l'équipe de Butler a initialement examiné le gène *PTEN* chez les personnes atteintes d'autisme et de macrocéphalie. Ils ont séquencé le gène *PTEN* chez 18 de ces patients et ont ainsi constaté que 3 individus portaient des mutations de *PTEN* (Butler *et al.*, 2005). Plusieurs autres études ont également rapporté des mutations de *PTEN* dans des cas d'autisme et de macrocéphalie (Buxbaum *et al.*, 2007 ; Boccone *et al.*, 2006 ; Herman *et al.*, 2007).

Neuroligines et neurexines

Les neuroligues sont des molécules d'adhésion cellulaire qui jouent un rôle dans la maturation et le fonctionnement synaptique, ce qui en font des candidats dans des pathologies neurodéveloppementales telles que l'autisme (Zoghbi, 2003). Un lien entre l'autisme et les neuroligues a d'abord été mis en évidence par les découvertes de mutations dans les gènes de neuroligues liées à l'X, *NLGN3* et *NLGN4*, dans 2 paires de frères autistes (Jamain *et al.*, 2003). Par la suite, notre équipe a détecté une délétion de 2 paires de bases dans le gène de la *NLGN4* chez des personnes atteintes de déficience mentale au sein d'une grande famille française comportant trois garçons atteints d'autisme (Laumonnier *et al.*, 2004). Une autre étude a détecté des mutations faux-sens dans le gène *NLGN4* chez 4 des 148 personnes autistes testées, alors qu'aucune mutation n'a été retrouvée chez les contrôles atteints de pathologies psychiatriques ou sains (Yan *et al.*, 2005). Plus récemment, l'équipe de Lawson-Yuen (Lawson-Yuen *et al.*, 2008) a signalé des délétions exoniques de *NLGN4* dans une famille touchée par de l'autisme et par une série d'autres maladies psychiatriques et de l'apprentissage. Une mutation ponctuelle dans le gène *NLGN3* a été identifiée dans une famille suédoise (Jamain *et al.*, 2003) ; cette substitution d'une arginine en cystéine dans le domaine estérase de la protéine semble modifier l'efficacité de l'interaction de cette protéine avec ses ligands, les neurexines (Nguyen et Sudhof, 1997). Cependant toutes les études ne rapportent pas de résultats significatifs concernant les neuroligues (Vincent *et al.*, 2004 ; Gauthier *et al.*, 2005 ; Blasi *et al.*, 2006), même si des preuves impliquant les partenaires de liaison aux neuroligues, incluant neurexines, *CNTNAP2* et *SHANK3*, confortent l'hypothèse d'un rôle possible des neuroligues dans l'autisme. Enfin ces mutations restent rares : en méta-analyse, il s'avère que moins de 1 % des patients autistes testés porte une mutation de ce gène.

Les neurexines appartiennent à une famille très polymorphe de protéines neuronales dont certaines interagissent avec les neuroligues pour favoriser la mise en place et le fonctionnement synaptique (Ushkaryov *et al.*, 1992). Les preuves d'une implication des neurexines dans l'autisme proviennent d'un certain nombre d'études récentes. L'équipe de Feng a criblé le gène de la neurexine bêta chez 72 personnes autistes et 535 contrôles, suivie du séquençage de l'exon 1 de *NRXN1β* dans 192 autres cas (Feng *et al.*, 2006). Des mutations faux-sens ont été trouvées chez 4 personnes atteintes d'autisme et des délétions et insertions ont été détectées dans 9 cas supplémentaires. Aucune de ces variations n'a été retrouvée chez les contrôles. Des mutations des neurexines ont également été détectées dans le récent criblage d'un génome entier mené par le consortium Autism Genome Project (Szatmari *et al.*,

2007) ; une délétion hémizygote d'exons codants de *NRXN1* a été trouvée chez deux frères autistes. Enfin, l'équipe de Kim (Kim *et al.*, 2008) a récemment identifié un certain nombre de variants codants rares lors du criblage des exons codant de *NRXN1* chez 57 personnes atteintes d'autisme.

La contactin-associated protein-like 2 (*CNTNAP2*) fait partie de la superfamille des neurexines (mais si elle ne se lie pas aux neuroligines) qui code CASPR2, une protéine de structure transmembranaire (Poliak *et al.*, 2003). Le gène *CNTNAP2* a récemment été associé à l'autisme au cours de l'étude d'une communauté d'Amish fortement touchée par une dysplasie corticale avec épilepsie focale ; le syndrome a été associé à l'autisme dans 67 % des cas (Strauss *et al.*, 2006). Les chercheurs ont détecté une mutation décalant le cadre de lecture dans l'exon 22 de *CNTNAP2* présente chez les 9 personnes touchées. L'étude de 105 Amish sains a révélé 4 porteurs hétérozygotes de la mutation. Trois études récentes confirment le rôle de *CNTNAP2* dans l'autisme. Dans une étude en deux étapes, l'équipe d'Arking (Arking *et al.*, 2008) a détecté une liaison significative au locus 7q35 (qui couvre *CNTNAP2*), puis par une étude d'association dans 72 familles multiplex l'équipe a permis de constater d'importantes sur-transmissions de l'allèle T d'un polymorphisme commun présent au niveau de l'intron situé entre les exons 2 et 3 de *CNTNAP2*. Ce résultat a ensuite été reproduit dans un échantillon indépendant de 1295 trios parents-enfant. Dans un autre article, l'équipe de Bakaloglu (Bakaloglu *et al.*, 2008) a re-séquéncé *CNTNAP2* dans une cohorte de 635 personnes avec autisme et 942 contrôles, trouvant plusieurs variants rares chez des personnes autistes qui n'étaient pas présents chez les contrôles. L'équipe d'Alarcon (Alarcon *et al.*, 2008) a signalé d'autres éléments de preuve impliquant *CNTNAP2* comme un gène de susceptibilité à l'autisme et elle a plus particulièrement étudié l'association de *CNTNAP2* avec un phénotype particulier d'acquisition du langage dans l'autisme. Par étude d'association les chercheurs ont trouvé une association significative entre des variants de *CNTNAP2* et un index de retard de langage chez des enfants autistes. En outre, une micro-délétion dans *CNTNAP2* a été identifiée chez un enfant et son père, mais n'a pas été retrouvée chez les 1000 contrôles. Une étude d'expression sur le développement du cerveau fœtal a ensuite été réalisée, avec des résultats indiquant une expression préférentielle de *CNTNAP2* dans les centres du langage du cerveau (c'est-à-dire les lobes frontal et temporal antérieurs).

SHANK3 est un partenaire de liaison aux neuroligines qui a été associé à l'autisme. SHANK3 appartient à une famille de protéines de structure neuronales qui jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement synaptique et qui régulent également la morphologie des

épines dendritiques. L'équipe de Durand a trouvé des mutations de *SHANK3* chez 3 des 226 familles de personnes autistes testées. Dans une famille, l'enfant autiste portait une délétion *de novo* dans *SHANK3* (Durand *et al.*, 2007). Deux frères dans une autre famille portaient une mutation décalant le cadre de lecture ; et dans une troisième famille l'enfant présentait une délétion dans *SHANK3* tandis que son frère autiste possédait une copie supplémentaire. Dans une autre étude évaluant la séquence et le nombre de copies de *SHANK3*, l'équipe de Moessner a détecté une mutation *de novo* et deux délétions de gène dans un groupe de 400 personnes atteintes d'autisme (Moessner *et al.*, 2007). Bien que les mutations de *SHANK3* puissent être seulement responsables d'une minorité de cas, en les considérant conjointement avec les conclusions sur plusieurs autres partenaires de liaison aux neuroligues SLC6A4 et MET, il semble y avoir une accumulation de preuves concernant le rôle des gènes de la fonction synaptique dans l'autisme, même si la fréquence d'implication de cette voie reste faible.

Les analyses de liaison sur génome entier

Les analyses de liaison sur génome entier possèdent l'avantage du criblage du génome en absence d'*a priori* sur les hypothèses génétiques de la maladie. L'analyse est basée sur l'utilisation de familles présentant plusieurs membres touchés. Le principal objectif de ces études sur génome entier est de définir des régions comportant des gènes liés à l'autisme pour aboutir à une cartographie plus fine par des études d'association et enfin au criblage détaillé des gènes candidats déduits. Pour cela, entre 300 et 400 marqueurs génétiques le plus souvent répartis uniformément sur l'ensemble des chromosomes sont génotypés pour chaque famille étudiée, et l'augmentation de la fréquence d'un allèle en corrélation avec le statut malade des apparentés affectés est calculée selon un Lod score multipoint (MLS) indicateur d'une région de susceptibilité potentielle. Depuis le premier criblage sur génome entier en 1998 (IMGSAC, 1998), près d'une vingtaine d'études de liaison sur génome entier dans l'autisme ont été réalisées (Barrett *et al.*, 1999 ; Phillippe *et al.*, 1999 ; Risch *et al.*, 1999 ; IMGSAC, 2001 ; Liu *et al.*, 2001 ; Buxbaum *et al.*, 2001 ; Alarcon *et al.*, 2001 ; Auranen *et al.*, 2002 ; Shao *et al.*, 2002 ; Yonan *et al.*, 2003 ; Alarcon *et al.*, 2005 ; Cantor *et al.*, 2005 ; Schellenberg *et al.*, 2006 ; Trikalinos *et al.*, 2006 ; Duvall *et al.*, 2007 ; Szatmari *et al.*, 2007 ; Ma *et al.*, 2007). Dans la mesure où la plupart de ces études ont appliqué différents outils d'analyse et de génotypage et utilisent des échantillons qui se chevauchent considérablement, les comparaisons entre elles sont complexes. La liaison la plus fréquemment identifiée se

situé au niveau du chromosome 7q, et notamment dans la région 7q22-q32 (Trikalinos *et al.*, 2006). Cependant cette région n'a pas été liée à l'autisme dans le plus grand échantillon analysé à ce jour (Szatmari *et al.*, 2007). Le problème de cette incompatibilité des résultats peut se situer dans la complexité phénotypique et étiologique de la maladie elle-même, qui peut être aggravée par des définitions phénotypiques variables utilisées dans les études (par exemple, stricte versus large), mais peut aussi correspondre aux puissances statistiques trop faibles de nombreuses études (effectifs trop petits).

Les études d'association sur génome entier

Comme dans les études d'association de gènes candidats, les études d'association sur génome entier comparent la répartition des polymorphismes dans les cas et les contrôles, mais les marqueurs sont répartis sur l'ensemble du génome plutôt que limités aux régions candidates, fournissant ainsi une prospection du génome plus objective. Dans l'article de 1996, Risch et Merikangas ont démontré que l'association offre une plus grande puissance par rapport à la liaison concernant la détection de *loci* de susceptibilité à faible effet, ce qui indique que l'étude d'association sur génome entier est théoriquement une approche plus appropriée pour les études génétiques de pathologies complexes comme l'autisme. Début 2009, l'équipe de Hakonarson a génotypés plus de 10000 personnes (3101 personnes issues de 780 familles touchées par l'autisme, ainsi que 1204 patients autistes et 6491 contrôles) pour tenter de découvrir les variations génétiques SNP et les CNV liés à l'autisme. Près d'un demi-million de SNP ont été génotypés chez ces 780 familles en utilisant les puces Illumina HumanHap550 BeadChip (Wang *et al.*, 2009). Six SNP localisés sur une zone du chromosome 5 entre CDH9 et CDH10, des gènes cadhérine codant pour des protéines d'adhésion des cellules neuronales, ont pu être associés. Un de ces SNP (rs4307059) atteint une forte significativité ($p = 3,4 \cdot 10^{-8}$). Ces travaux soutiennent l'idée que l'autisme serait dû à des modifications de connexion entre les cellules neuronales.

Conclusion sur ce chapitre génétique

Ce tour d'horizon des résultats obtenus sur la génétique de l'autisme montre bien que nous sommes face à une situation complexe à différents points de vue.

Tout d'abord, il est important de garder à l'esprit l'hétérogénéité de la maladie. Non seulement les traits phénotypiques observés sont variables, mais en plus les symptômes

associés peuvent apparaître tardivement que le diagnostic des traits autistiques établi vers 2 ou 3 ans. La déficience mentale concerne 75 % des autistes, à des degrés variables (Volkmar et Pauls, 2003), la présence de crises d'épilepsie est observée chez seulement 3 à 38 % des autistes, selon les études (Tuchman et Rapin, 2002), le retard de langage n'est présent que pour 50 % des enfants autistes (Alarcón et al., 2002), et la macrocéphalie concerne 10 à 30 % des patients autistes (Lainhart et al., 2006 ; Sacco et al., 2007 ; Amaral et al., 2008).

Ensuite, les limites entre les manifestations des troubles envahissants du développement et le comportement normal sont imprécises, tout comme les frontières au sein même de ces différents TED (figure 6). On se trouve donc dans la situation de gènes jouant un rôle quantitatif (QTL pour Quantitative Trait Loci).

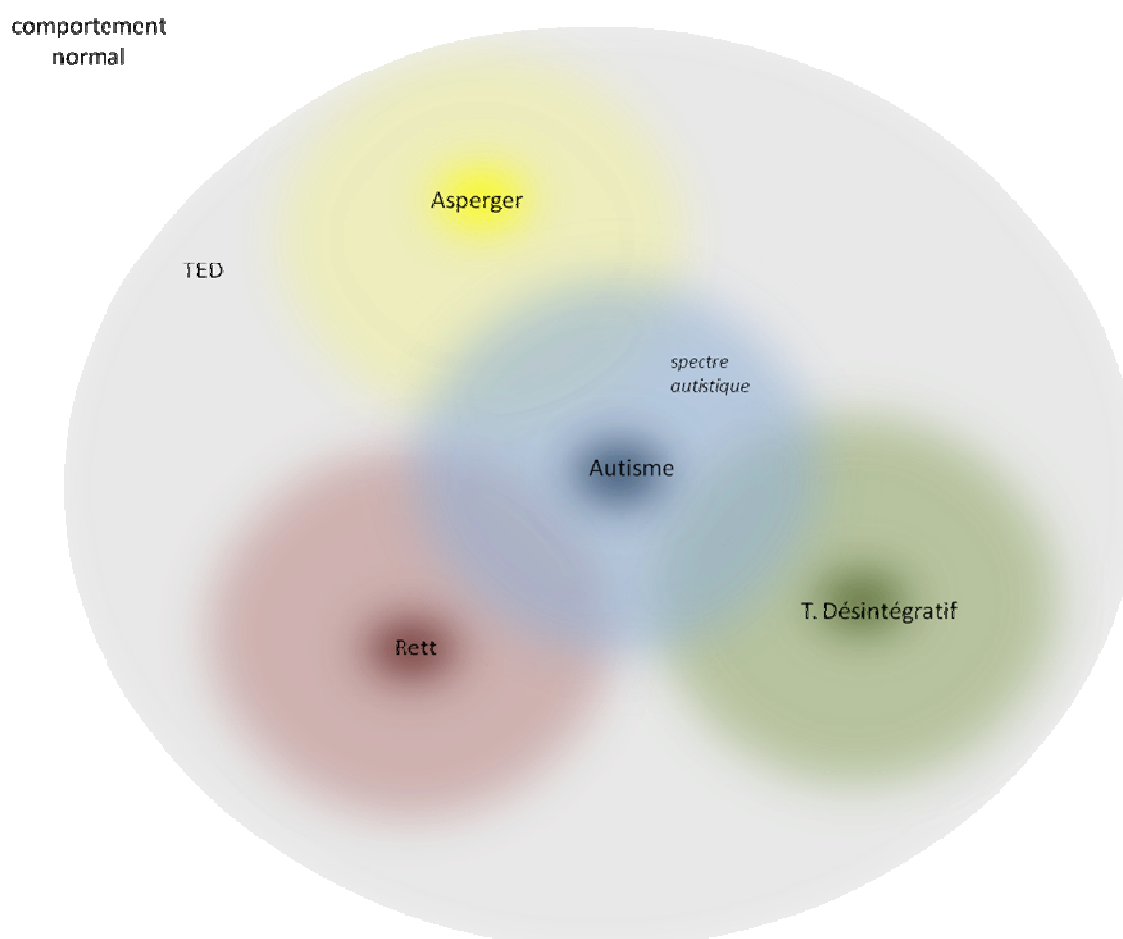


Figure 6 : La « nébuleuse » des TED mettant en évidence la complexité des phénotypes, avec des limites floues et se chevauchant.

Cette hétérogénéité concerne également les causes. Par exemple, plusieurs douzaines de pathologies génétiques distinctes ou d'anomalies chromosomiques identifiées peuvent provoquer de l'autisme, chaque maladie ne contribuant pas en moyenne à plus de 1 % des cas (Abrahams et Geschwind, 2008). Aucune des associations publiées ne compte pour une grande part du risque génétique de l'autisme. Les études de liaison et d'association dans l'autisme impliquent donc d'atteindre des tailles d'échantillons massives par de grands efforts de collaboration et le partage des échantillons.

Le modèle génétique même de l'autisme reste à établir. Actuellement, le modèle génétique le plus souvent proposé suppose la présence d'un héritage multigénique de polymorphismes communs contribuant chacun au risque d'autisme par des effets modérés (Abrahams et Geschwind, 2008). La rareté de familles multigénérationnelles présentant des TED va à l'encontre d'un héritage mendélien, et plus précisément dominant. Toutefois, l'équipe de Zhao a pu réévaluer cette notion par l'identification de CNV rares qui contribueraient significativement aux risques génétiques de l'autisme (Zhao *et al.*, 2007). Néanmoins, les données actuelles sont compatibles avec la notion selon laquelle les perturbations du spectre autistique sont causées par une proportion plus élevée que prévue de mutations rares.

Enfin il faut considérer les effets dans le cerveau des protéines identifiées, car les gènes de susceptibilité à l'autisme semblent avoir de nombreux rôles distincts dans le développement neural et la fonction neuronale, allant du métabolisme de base, de la transmission synaptique, et de l'épissage de l'ARN à la migration neuronale. Les effets sont donc non seulement multiples mais surviennent à diverses étapes du développement. Il reste donc à découvrir comment des mutations dans des gènes impliqués dans ces catégories fonctionnelles peuvent provoquer l'autisme : soit elles convergent vers un petit nombre de voies moléculaires communes, soit elles représentent des étiologies biologiques diverses, et là encore le mécanisme aboutissant au développement de l'autisme doit être éclairci. Les fonctions moléculaires et biologiques connues des gènes de susceptibilité à l'autisme devraient converger vers la perturbation de fonctions dans les régions du cerveau impliquant le langage, la cognition sociale, et la flexibilité comportementale. La plupart des gènes de susceptibilité à l'autisme ne montrant pas de telle expression restreinte au niveau régional, d'autres facteurs doivent également intervenir.

Geschwind et Levitt (2007) ont tenté de souligner les nombreuses caractéristiques étiologiques génétiques et environnementales possibles ainsi que l'hétérogénéité clinique ou

syndromique dans les troubles du spectre autistique, en plus de la multitude de processus neurodéveloppementaux qui pourraient être perturbés. C'est la raison pour laquelle les auteurs tiennent à rappeler qu'il serait plus juste de parler « des autismes » pour mettre en évidence le fait que non seulement les pathologies sont basées sur les étiologies multiples, mais aussi qu'il existe des caractéristiques cliniques distinctes dont le chevauchement phénotypique reste à définir.

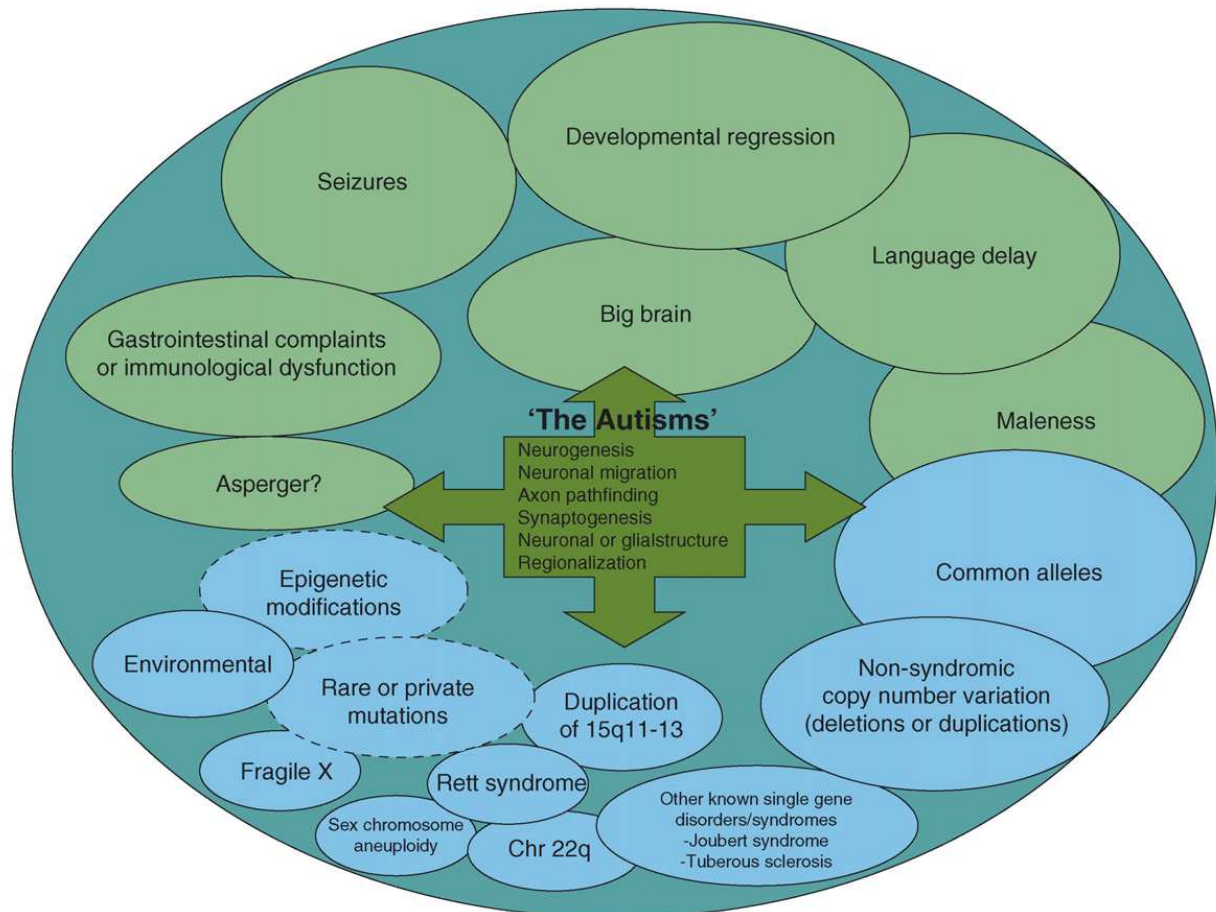


Figure 7 : Schéma des caractéristiques étiologiques possibles (cercles bleus) et de l'hétérogénéité clinique ou syndromique (cercles verts) dans les troubles du spectre autistique ; les processus neurodéveloppementaux qui pourraient être perturbés figurent dans la boîte centrale fléchée (Geschwind et Levitt, 2007).

Les modèles animaux

Malgré la spécificité humaine de l'autisme, la compréhension des mécanismes mis en jeu dans l'étiologie de cette pathologie nécessite l'utilisation de modèles. Tandis que les modèles cellulaires vont permettre d'étudier les interactions basiques, les modèles animaux sont indispensables pour traiter les mécanismes à l'échelle de l'organisme et observer les modifications comportementales et cognitives. En outre, les modèles de rongeur sont utiles dans les études précliniques pour évaluer l'efficacité du traitement : les tests comportementaux sur les rongeurs fournissent les outils précliniques pour la découverte de traitements psychopharmacologiques dans de nombreuses maladies neurologiques. Se pose donc le problème de trouver le modèle animal qui permettra de refléter au mieux cette maladie caractéristiquement humaine.

Le modèle animal doit mimer les facteurs génétiques et environnementaux impliqués dans l'autisme, et doit présenter des modifications neurochimiques, neuroanatomiques, comportementales et cognitives identiques à la maladie. En cas de modèle valide, les traitements qui permettent de supprimer ou de réduire certains symptômes de la maladie chez l'homme devraient également réduire les symptômes trouvés chez le modèle animal (Belzung *et al.*, 2005).

Quatre catégories de modèles de rongeurs ont été utilisées :

- Les animaux mutants présentant des anomalies des neuropeptides impliqués dans le comportement social et l'attachement, comme des souris présentant une mutation dans l'ocytocine (souris invalidée pour l'ocytocine) ou dans certains récepteurs opioïdes (souris avec une délétion ciblée du récepteur opioïde μ). Les souris knockout ocytocine présentaient des déficits dans la reconnaissance et la mémoire sociale (Ferguson *et al.*, 2000 ; Ferguson *et al.*, 2001 ; Choleris *et al.*, 2003).
- Les modèles animaux simulant certains facteurs épigénétiques qui augmentent le risque d'autisme chez les humains, comme l'exposition fœtale aux anticonvulsivants, l'embryopathie due à la thalidomide, ou les déficits développementaux dans la synthèse de sérotonine. Par exemple, l'équipe de Rodier a traité des rates gestantes avec de l'acide valproïque pendant la phase de développement fœtale de fermeture du tube neural (Rodier *et al.*, 1996 ; Ingram *et al.*, 2000). Les nerfs crâniens III, V, VI et XII présentent un nombre diminué de motoneurones, similaire à celui observé dans le

cas de l'homme. En outre, des réductions de volume du cervelet et du nombre de cellules de Purkinje ont été trouvées en parallèle à ceux observés dans les cas d'autisme.

- Les modèles obtenus après des lésions cérébrales néonatales des zones anormales chez les patients autistes, comme le cervelet (Bobee *et al.*, 2000), l'amygdale (Wolterink *et al.*, 2001 ; Diergaarde *et al.*, 2005) et le cortex préfrontal (Vicedomini *et al.*, 1982 ; Schneider *et al.*, 2005).
- Les modèles animaux de maladies génétiques humaines associées à l'autisme. Des lignées de souris ont ainsi été générées avec des mutations de gène pertinentes pour le syndrome d'Angelman (Sinkkonen *et al.*, 2003), le syndrome Smith-Lemli-Opitz (Wassif *et al.*, 2001 ; Waage-Baudet *et al.*, 2003), l'X fragile (Comery *et al.*, 1997 ; Nielsen *et al.*, 2002 ; Kooy, 2003 ; Watase et Zoghbi, 2003 ; Frankland *et al.*, 2004 ; Chen et Toth, 2006), le syndrome de Rett (Berger-Sweeney, 2003 ; Moretti *et al.*, 2005 ; Zoghbi, 2003) et le syndrome de Down (Dierssen *et al.*, 2001 ; Hill *et al.*, 2003 ; Moran *et al.*, 2002 ; Turner *et al.*, 2001).

Puisqu'environ 99 % des gènes humains présentent des homologues chez la souris (Tecott, 2003), et au fur et à mesure de l'avancée des découvertes concernant les gènes candidats dans l'autisme, des souris invalidées pour ces gènes continuent d'être générées afin de tester des hypothèses sur les fonctions de ces gènes candidats (Crawley, 2007).

Cependant tous ces modèles miment une partie seulement de l'étiologie de l'autisme, et peuvent donc être considérée comme réducteurs. En outre, dans certains cas, il est difficile de savoir si les symptômes imités sont la cause ou la conséquence de l'autisme. La construction de modèles animaux reste un domaine très complexe à explorer en raison même de la pathologie étudiée, et la méthodologie permettant de valider ces modèles doit être extrêmement rigoureuse afin de prendre en compte un maximum d'aspects caractéristiques de l'autisme observables chez les rongeurs, tels les altérations du comportement social et les stéréotypies (Belzung *et al.*, 2005 ; Crawley, 2007).

Il reste important de garder à l'esprit que tous ces modèles sont des modèles pour des caractéristiques de l'autisme et ne peuvent pas par définition être considérés comme des modèles d'autisme.

Les systèmes ubiquitine et ubiquitine-like

L'attribution du prix Nobel de chimie à Avram Hershko, Aaron Ciechanover et Irwin Rose en 2004 pour la découverte du rôle d'une petite (76 résidus) protéine cellulaire eucaryote ubiquitaire, qui fut ainsi nommée « ubiquitine » est une récompense méritée pour cette découverte majeure en biochimie dans la seconde moitié du 20^{ème} siècle. Ces chercheurs permirent de décrire la dégradation protéique dépendant de la voie de l'ubiquitine par l'attachement covalent de l'ubiquitine sur des protéines cibles, signal de reconnaissance pour une protéase multi-compartimentée appelée protéasome 26S. Il est maintenant évident que l'ubiquitinylation et désubiquitinylation des protéines représentent, au même titre que la phosphorylation et déphosphorylation, une importante modification post-traductionnelle des protéines impliquée dans la régulation de la physiologie cellulaire.

La voie de l'ubiquitinylation

Les modifications post-traductionnelles des protéines jouent un rôle crucial dans de nombreux processus cellulaires, car ils peuvent provoquer des changements rapides dans les fonctions de protéines préexistantes.

La réaction d'ubiquitinylation

L'ubiquitinylation est caractérisée par une fixation covalente post-traductionnelle rapide et réversible de l'ubiquitine sur des protéines cibles via le groupe ϵ -amino d'un résidu lysine d'une protéine (Ciechanover, 2006). Cette réaction nécessite trois types d'enzymes. Tout d'abord, l'enzyme E1 d'activation de l'ubiquitine forme un pont thioester avec l'ubiquitine dans une réaction ATP-dépendante. Puis une enzyme E2 de conjugaison à l'ubiquitine (ou Ubc pour ubiquitin-conjugating enzyme) se lie à l'ubiquitine et la transfère soit directement sur le substrat protéique, soit sur un troisième type d'enzyme, l'enzyme E3 ligase. Ces enzymes ont pour rôle de faciliter la ligation de l'ubiquitine à la protéine cible. L'éventuelle intervention d'enzymes E4 a été rapportée dans la formation de chaînes polyubiquitines de plus de quatre unités ubiquitines (Koegl *et al.*, 1999). Alors que le marquage par une chaîne polyubiquitine adresse généralement une protéine à la dégradation par le protéasome, la

monoubiquitinylation est principalement impliquée dans la signalisation cellulaire. Enfin, un autre mécanisme d'une grande importance tant physiologique que pathologique permet la désubiquitinylation, exercée par plusieurs enzymes désubiquitinylantes (DUB) (Wilkinson, 1997).

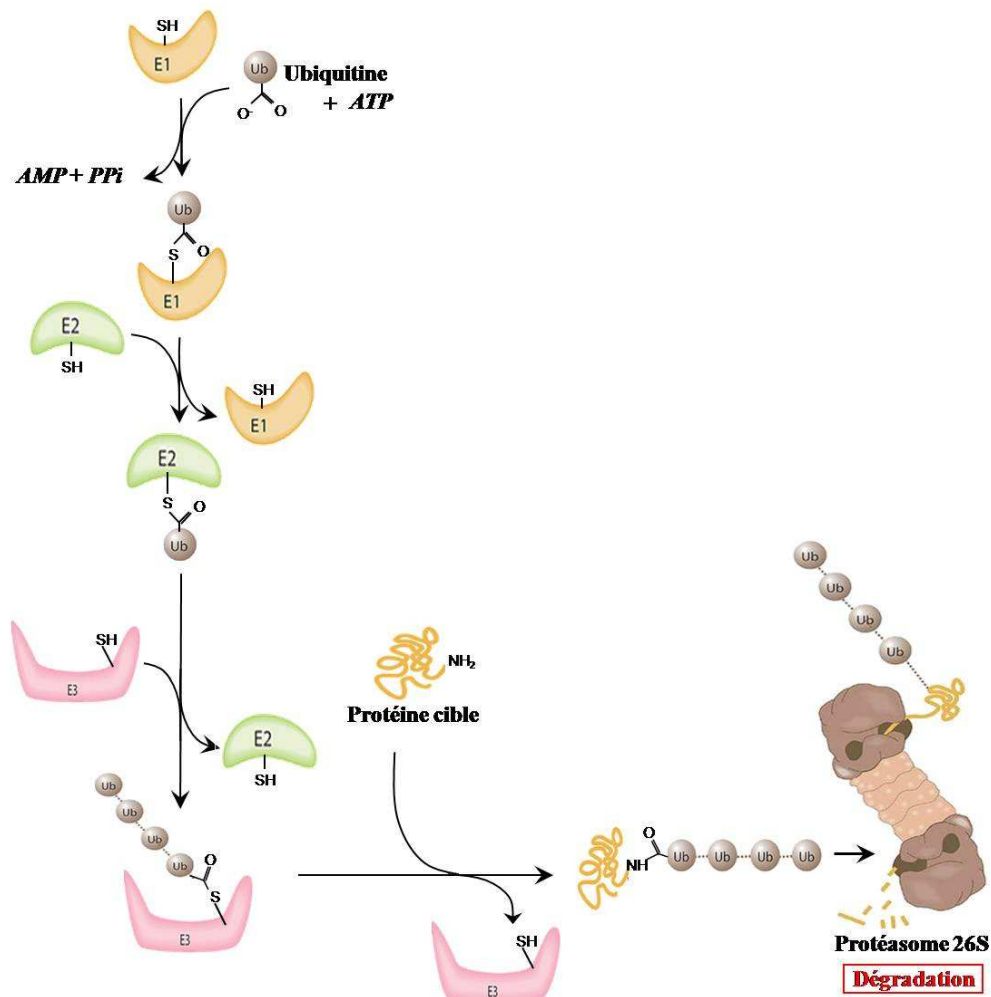


Figure 8 : Schéma du principal mécanisme d'ubiquitinylation aboutissant à la dégradation par le protéasome.

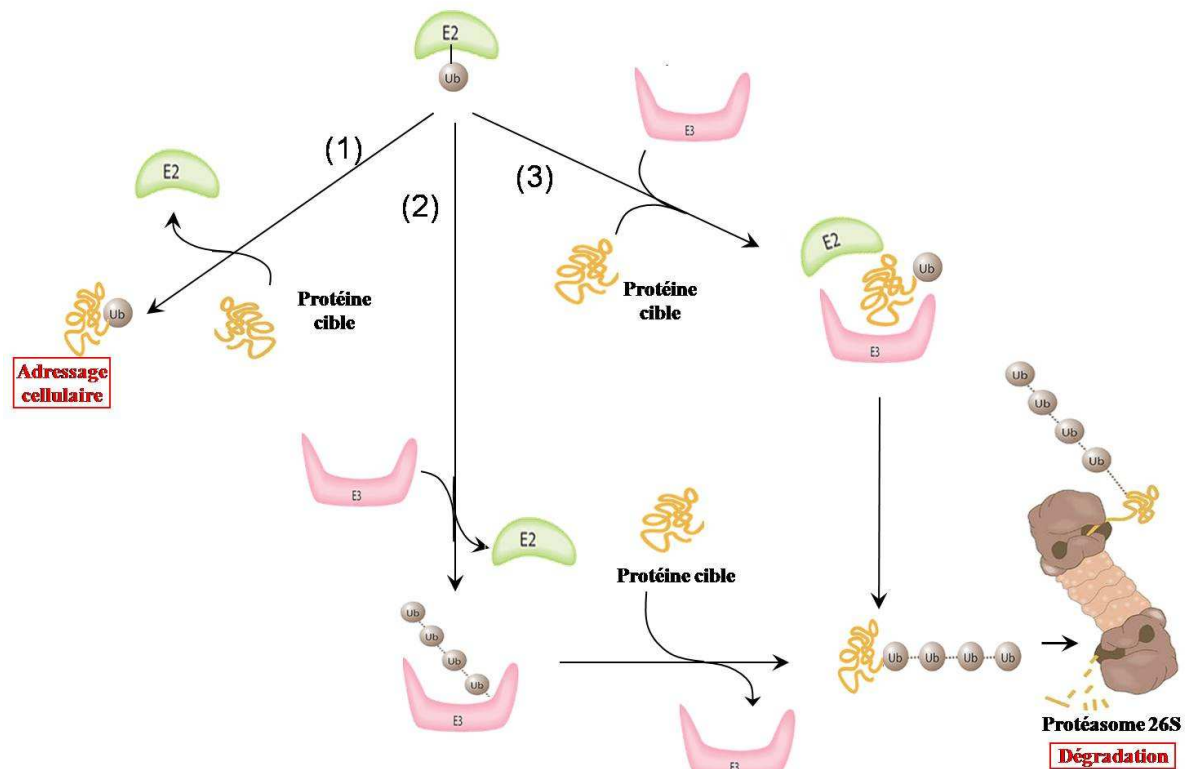


Figure 9 : Schéma des différents mécanismes possibles d'ubiquitylation du substrat après prise en charge de l'ubiquitine par l'enzyme E2. (1) Transfert direct de l'ubiquitine par l'enzyme E2 sur la protéine cible (signalisation d'adressage par monoubiquitylation du substrat) ; (2) Transfert à une enzyme E3 responsable de la reconnaissance du substrat (E3 de type HECT) ; (3) Formation d'un complexe avec les enzymes E2 et E3 (E3 de type RING). Les voies (2) et (3) permettent d'aboutir à la polyubiquitylation de la protéine cible en vue de son marquage pour une dégradation via le protéasome 26s.

L'ubiquitine et ses apparentées

L'ubiquitine (Ub) est une petite protéine de 76 acides aminés, très conservées chez les eucaryotes.

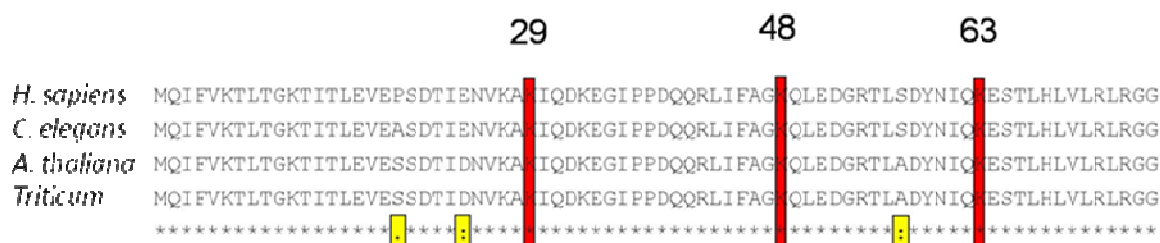


Figure 10 : Séquences en acides aminés de la molécule d'ubiquitine à travers différentes espèces eucaryotes. Les barres rouges mettent en évidence la position des résidus lysines, les cadres jaunes soulignent la présence des rares variations. Avec *H. sapiens* l'homme, *C. elegans* le ver nématode, *A. thaliana* la plante, et *Triticum* le blé.

L'Ub se lie à la protéine cible par l'intermédiaire d'un lien isopeptide entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine et un résidu lysine de la protéine (qui doit donc comporter au moins un résidu de ce type pour être ubiquitinylée). Il semblerait que trois lysines conservées dans l'Ub soient indispensables pour la formation de chaînes polyubiquitines. Comme le rapporte une revue parue dans *Nature*, l'ubiquitine était considérée comme une évolution des modifications post-traductionnelles, et cette idée s'est par la suite confirmée par l'identification de nombreuses formes conjuguables d'Ub, regroupées par certains auteurs sous le terme d'ubiquitons (Welchman *et al.*, 2005). Ces protéines plus ou moins proches de l'ubiquitine (ubiquitin-like ou Ubl), tels que SUMO, NEDD8, ATG8, ATG12 ou ISG15 pour les plus connues (voir Tableau 5), sont codées par des gènes différents et peuvent être utilisées dans des mécanismes similaires. Le marquage des protéines par une Ubl n'oriente généralement pas les protéines vers une voie de dégradation, mais il joue davantage un rôle dans l'activation de la transcription des gènes ainsi que dans la localisation et la stabilisation protéique. Chaque marquage par un ubiquiton possède sa propre combinaison d'enzymes E1, E2 et E3.

Protéine Ubl	Identité de séquence avec l'ubiquitine	Substrat(s)	Fonction(s)	Référence
NEDD8 (RUB1)	58 %	Cullins, p53, MDM2	Régulation des E3	Xirodimas <i>et al.</i> , 2004 ; Hori <i>et al.</i> , 1999
SUMO-1 (SMT3)	18 %	Nombreux	Localisation nucléaire, régulation transcriptionnelle, antagonisme de l'ubiquitinylation	Gill, 2004
SUMO-2 et -3	16 %	C/EBP β 1, topoisomérase II	Régulation transcriptionnelle, mitose	Eaton et Sealy, 2003 ; Azuma <i>et al.</i> , 2003
ISG15 / UCRP *	29 % ; 37 %	PLC γ 1, JAK1, STAT1, ERK1/2, serpine 2a	Réponses immunitaires, transduction du signal interféron	Malakhov <i>et al.</i> , 2003 ; Hamerman <i>et al.</i> , 2002
UBD (FAT10) *	29 % ; 36 %	MAD2, NUB1L	Apoptose, transduction du signal cytokine	Raasi <i>et al.</i> , 2001
FUB1	37 %	TCR- α -like protéine, Bcl-G	Activation des cellules T	Nakamura <i>et al.</i> , 1995
UBL5 (HUB1, BEACON)	22 %	SART1 (Snu66), CLK1, CLK2, CLK4, HSPB2	Epissage des pré-ARNm, régulation du métabolisme énergétique	Lüders <i>et al.</i> , 2003 ; Dittmar <i>et al.</i> , 2002
URM1	12 %	ASCC2, Ahp1	Réponse au stress oxydatif, nutriment sensing (via la voie de signalisation TOR)	Goehring <i>et al.</i> , 2003
ATG8	10 %	Phosphatidyléthanolamine	Autophagie, ciblage du cytoplasme à la vacuole	Ichimura <i>et al.</i> , 2000
ATG12	17 %	Atg5	Autophagie, ciblage du cytoplasme à la vacuole	Mizushima <i>et al.</i> , 1998

Tableau 4 : Liste des ubiquitons connus à ce jour (le nom correspond à celui donné chez les mammifères, les synonymes apparaissent entre parenthèses).

* ISG15 / UCRP et FAT10 contiennent chacun deux sous-unités (Extrait de Welchman *et al.*, 2005).

Egalement extrait de Welchman *et al.*, 2005, la figure suivante montre une superposition de l'ubiquitine, SUMO-1 et NEDD8.

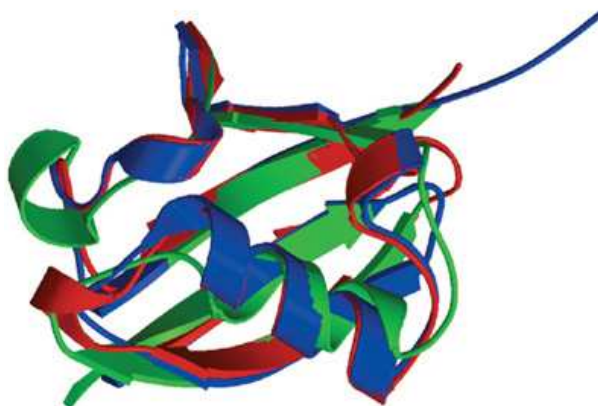


Figure 11 : Superposition de la structure 3D schématique de l'ubiquitine (bleu), SUMO-1 (vert) et NEDD8 (rouge) mettant en évidence la forte homologie de structure entre ces ubiquitons (extrait de Welchman *et al.*, 2005).

Cette représentation schématique permet très nettement de mettre en évidence la forte homologie structurelle qui peut exister entre certains ubiquitons : en effet, même avec seulement 10 % d'homologie de séquence, la structure 3D reste très conservée.

Les enzymes de la voie de l'ubiquitine

Le génome humain est composé de huit gènes codant des enzymes E1 d'activation de l'ubiquitine et des Ubl (Ensembl release 54, May 2009), complété par quatre gènes codant les deux sous-unités de l'enzyme E1 impliquée dans la sumoylation. Les enzymes E3 sont les plus nombreux, avec probablement plus d'un millier de membres (Pickart, 2004). Les enzymes E3 sont les plus spécifiques en termes de ciblage des protéines pour l'ubiquitinylation et peuvent être divisés en deux groupes principaux, les protéines RING (Really Interesting New Gene) et HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus), mais ces deux familles ne sont pas liées entre elles ni par leur séquence, ni par leur structure. Les enzymes E3 contenant un domaine HECT forment des thioesters intermédiaires avec l'ubiquitine au niveau de la cystéine de leur site actif avant de transférer l'ubiquitine sur les substrats, alors que la plupart des enzymes E3 contenant un domaine RING finger agissent comme des échafaudages qui se lient simultanément aux enzymes E2 et aux substrats (Özkan *et al.*, 2005) pour aboutir à la fixation de l'ubiquitine sur la protéine cible.

Le rôle fonctionnel de l'ubiquitylation

La modification post-traductionnelle des protéines par l'intermédiaire de la liaison covalente de l'ubiquitine fait partie de la voie de dégradation des protéines par le protéasome 26S. Elle est apparue comme un mécanisme essentiel pour la régulation de nombreux aspects de la physiologie cellulaire comme la réparation de l'ADN, la transcription, la transduction du signal, l'endocytose et l'adressage (Pickart et Fushman, 2004 ; Welchman *et al.*, 2005). Le rôle de l'ubiquitine dans la modulation de l'activité protéique est défini en partie par l'étendue et le type de modification. La liaison d'une seule molécule d'ubiquitine (monoubiquitylation), tout comme les chaînes d'ubiquitine produites par des ponts isopeptidiques entre l'amine primaire de la chaîne latérale de lysine d'une molécule d'Ub et de l'extrémité C terminale d'une autre Ub, encode des signaux qui sont déchiffrés pour déclencher différentes réponses cellulaires.

Le « code ubiquitylation » se traduit donc en fonction :

- du nombre et de la localisation des lysines de la protéine cible utilisées
- du nombre de molécules d'Ub utilisées pour le marquage (monoubiquitylation ou chaîne polyubiquitine)
- du type de liaison entre les Ub elles-mêmes au sein de la chaîne (plusieurs lysines utilisables)

Tandis que les protéines peuvent être phosphorylées sur les divers résidus sérine, thréonine et tyrosine, l'ubiquitylation des protéines se produit uniquement sur des résidus lysines. La richesse informative de l'ubiquitylation des protéines est considérablement élargie par le fait que les protéines peuvent être monoubiquitylées, polyubiquitylées ou multiubiquitylées. La richesse du signal post-traductionnel de l'ubiquitylation est augmentée par le fait que l'ubiquitine possède sept résidus lysine, chacun pouvant être utilisé dans la formation des chaînes polyubiquitines. Par exemple, une chaîne d'au moins quatre molécules d'ubiquitine liées en lysine 48 est principalement reconnues par le protéasome 26S pour une dégradation efficace de la protéine cible polyubiquitylée *in vitro* (Thrower *et al.*, 2000), tandis que les chaînes d'ubiquitine formées par la liaison au niveau de la lysine 63 sont reconnues par les protéines de liaison à l'ubiquitine impliquées dans des voies de signalisation intracellulaire (Chen, 2005 ; Hofmann et Pickart, 1999). Des données plus récentes soulignent également l'existence de chaînes polyubiquitine contenant des liaisons mixtes et des chaînes ramifiées

(Ben-Saadon *et al.*, 2006 ; Kirkpatrick *et al.*, 2006). Toutefois, celles-ci ont été principalement observées dans des études réalisées *in vitro* et leur signification physiologique n'est pas claire.

La voie de sumoylation

La sumoylation est un système de modification post-traductionnelle ubiquitin-like dynamique et réversible, dans lequel les protéines SUMO (small ubiquitin-related modifier) sont attachées de façon covalente à leurs substrats. Contrairement à l'ubiquitinylation qui peut conduire à la dégradation des protéines par l'intermédiaire du protéasome 26S, la sumoylation ne conduit pas à la dégradation, mais semble réguler les interactions protéines/protéines, la localisation intracellulaire, et protège certaines cibles modifiées de la dégradation dépendante de l'ubiquitine. La sumoylation correspond à une cascade enzymatique en trois étapes impliquant différentes enzymes : l'enzyme d'activation SUMO-E1 (SAE1/SAE2), l'enzyme E2 de conjugaison à SUMO UBE2I (ou UBC9), les SUMO ligases E3, et les enzymes de clivage de SUMO. Cette modification peut être réversée par l'action des isopeptidases.

Les différentes isoformes de SUMO

Chez l'homme, trois principales isoformes de SUMO sont exprimées et sont conservées au cours de l'évolution. SUMO1 (précédemment connue sous le nom de sentrine, Ubl1, GMP1, PIC1 et Smt3c) affiche environ 50 % de similarité avec les séquences hautement homologues de SUMO2 (également connu sous les noms de sentrin3 et Smt3a) et SUMO3 (également connu sous les noms de sentrin2 et Smt3b), SUMO2 et SUMO3 affichant près de 95 % de similarités. Toutes les isoformes de SUMO présentent des niveaux d'expression spécifiques du type cellulaire tout comme des localisations subcellulaires uniques, bien que non exclusives. SUMO1 est principalement présente sur la membrane nucléaire tandis que SUMO2 est essentiellement localisées dans le cytoplasme et SUMO3 dans les corps nucléaires. Une quatrième isoforme SUMO4 a été identifiée et présente une grande homologie avec SUMO3. Son messager est principalement exprimé dans des cellules de rein mais l'expression de la protéine endogène n'a pas encore été démontrée, c'est pourquoi elle reste pour l'instant considérée comme l'un des nombreux pseudogènes de SUMO3. Les gènes des différentes isoformes de SUMO sont répartis à travers le génome : *SUMO1* est localisé en 2q33, *SUMO2* en 17q25.1, *SUMO3* en 21q22.3 et *SUMO4* en 6q25.

Malgré la divergence de leurs séquences primaires, les protéines ubiquitine et SUMO présentent des structures comparables (voir figure 9 ci-dessus) et partagent les mécanismes biochimiques de conjugaison aux substrats. Tout comme l'ubiquitine et autres protéines de type ubiquitine, les isoformes SUMO sont exprimées sous forme de précurseurs protéiques. Afin d'exposer le motif diglycine C-terminal requis pour la conjugaison des cibles, SUMO subit un processus de maturation au cours duquel le clivage de l'extension C-terminale est effectué par l'une des protéases spécifiques de SUMO, SENP. La protéine SUMO mature résultante entre dans une voie enzymatique à plusieurs étapes qui est comparable, mais distincte, de l'ubiquitinylation.

La réaction de sumoylation

La réaction de sumoylation est initiée par la formation ATP-dépendente d'un pont thioester entre la glycine C-terminale exposée de SUMO et une cystéine interne de l'enzyme E1 d'activation de SUMO, hétérodimère composé des sous-unités SAE1 et SAE2. Grâce à une réaction de transestérification, SUMO activée est ensuite transférée sur la cystéine catalytique de l'unique enzyme E2 de conjugaison à SUMO connue, UBE2I. UBE2I a la capacité de reconnaître directement les protéines cibles et de catalyser la formation d'un pont isopeptide entre la glycine C-terminale de SUMO et le groupe ϵ -amino de la lysine cible. La conjugaison de SUMO est très spécifique en termes de résidus lysine (K) cibles, dont la majorité sont contenues dans un motif consensus de SUMO défini par Ψ KX(E/D), Ψ correspondant à un résidu hydrophobe, X à un acide aminé quelconque et E/D à un résidu soit glutamate soit aspartate (Rodriguez *et al.*, 2001). Ce motif de SUMO est donc reconnu par l'enzyme de conjugaison UBE2I. SUMO2 et SUMO3 contiennent ce motif de reconnaissance dans leur domaine N-terminal, ce qui leur permet de former des chaînes polySUMO. Cependant, toutes les protéines contenant ces séquences consensus SUMO ne sont pas sumoylées. Inversement, les substrats ne possédant pas de motif SUMO peuvent être modifiés par SUMO, ce qui est illustrée par la capacité de SUMO1 à également former des chaînes multimériques polySUMO. La formation de chaînes SUMO est réversible : les polymères SUMO sont fragmentés par les SUMO protéases *in vitro* et *in vivo*. Cependant, la plupart du temps, SUMO1 et ses homologues sont conjuguées aux protéines cibles sous forme monomérique.

Les ligases E3 de SUMO permettent d'accroître l'efficacité globale de la sumoylation, garantissant dans une certaine mesure la spécificité de substrat, et pouvant faciliter la modification par SUMO des cibles qui n'ont pas les motifs consensus. C'est ainsi que par

exemple chez l'homme, les membres de la famille PIAS, RanBP2, Pc2 (composant du complexe modifiant la chromatine polycomb), Topors et TRAF7 ont montré une activité SUMO ligase.

La régulation de la sumoylation

L'acétylation ou l'ubiquitinylation des lysines cibles régule de façon stérique la conjugaison de SUMO tandis que la phosphorylation du substrat semblerait alternativement stimuler et réprimer la sumoylation. Un motif de sumoylation dépendant de la phosphorylation (PDSM) dirigée par une proline a été identifié dans certains facteurs de transcription régulant la sumoylation. Ce motif est une variation de la séquence consensus de sumoylation et est défini par $\Psi K X E X X S P$, où S et P correspondent à des résidus sérine et proline. Des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ou ROS pour reactive oxygen species) ont également été identifiées comme facteurs de contrôle de la régulation des enzymes de sumoylation E1 et E2.

Les protéases impliquées dans la maturation des précurseurs de protéines (activité hydrolase C-terminal) sont également responsables de la déconjugaison et du recyclage des SUMO à partir de leurs substrats (activité isopeptidase). Ces SUMO protéases affichent une préférence envers certaines isoformes de SUMO, dont la sélectivité semble reposer sur la complémentarité des charges de surface entre la protéase et le domaine C-terminal de SUMO, qui est unique à chaque isoforme.

Un certain nombre de protéines sont conjuguées à la fois par SUMO et par l'ubiquitine en utilisant les mêmes résidus lysine, ce qui laisserait penser que la sumoylation pourrait agir comme un antagoniste de l'ubiquitinylation. Cependant la communication entre la sumoylation et l'ubiquitinylation semble beaucoup plus complexe qu'une simple compétition pour des cibles lysines communes ou des protéines substrats. Par exemple, la sumoylation de l'enzyme de conjugaison à l'ubiquitine UBE2K semblerait inhiber son activité. UBE2K est une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine exprimé à des niveaux élevés dans le cerveau qui interagit avec la protéine Huntingtine (Htt), et qui fonctionne aussi comme une E3 ubiquitine ligase produisant des chaînes polyubiquitines libres ou dimériques. UBE2K est une cible de la sumoylation et sa conjugaison perturbe la formation de thioester d'ubiquitine et, par conséquent, la génération de chaînes d'ubiquitines libres. Inversement, l'expression des enzymes E1 et E2 de SUMO est diminuée par le protéasome en présence de la protéine adénovirale Gam1, activateur transcriptionnel fort et global des gènes viraux et cellulaires.

Gam1 inhibe la voie SUMO en interférant avec l'activité de l'hétérodimère E1 (SAE1/SAE2), conduisant à l'accumulation de substrats non modifiés par SUMO et à la dégradation de SAE1-SAE2, ce qui expliquerait comment une infection virale peut cibler des voies biochimiques importantes en inactivant puis dégradant une enzyme cellulaire essentielle (Boggio et Chiocca, 2005). Par ailleurs, la relation entre les voies de sumoylation et d'ubiquitinylation n'est pas seulement antagoniste. Les deux voies de modification ont été présentées comme convergentes dans le cas de corps de leucémies promyélocytiques nucléaires (PML), également connu sous le nom de corps nucléaires (ou NB pour Nuclear Bodies), au sein desquels se produisent à la fois des mécanismes de sumoylation et de dégradation via le système ubiquitine-protéasome, deux voies nucléaires permettant la régulation de la concentration nucléoplasmique des régulateurs transcriptionnels (Villagra *et al.*, 2006).

Le rôle fonctionnel de la sumoylation

En termes d'effets fonctionnels, les données recueillies pour de nombreuses protéines cibles orientent vers deux processus cellulaires, le transport nucléocytoplasmique et le ciblage intranucléaire, dans lesquels SUMO joue un rôle actif. La modification par SUMO module l'activité transcriptionnelle d'un grand nombre de facteurs de transcription, notamment p53 et le récepteur des androgènes, ainsi que l'activité de régulateurs tel qu'I κ B α . L'interruption de la voie SUMO dans les cellules humaines, par exemple en interférant avec SENP5, conduit à des défauts de la division. La mutation de son homologue de levure, Ulp1, provoque un arrêt du cycle cellulaire en G2/M. Ces résultats impliquent la sumoylation dans la progression du cycle cellulaire.

SUMO participe également au maintien de l'intégrité du génome, par exemple en modifiant les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, tels que PCNA. Toutes ces fonctions sont compatibles avec de nombreux substrats connus de SUMO qui sont principalement situés dans le noyau.

Bien que la sumoylation ait été initialement considérée comme un processus purement nucléaire, les études protéomiques postérieures ont montré qu'une grande partie des protéines transmembranaires, telles que Glut1, Glut4 et ErbB3, et cytoplasmiques, associées à différents organites comme le réticulum endoplasmique et les mitochondries, sont également soumises à la modification par SUMO. Par conséquent, en plus de ses activités au sein du noyau, la

sumoylation pourrait également affecter le transport subcellulaire, la stabilité des protéines, les voies de transduction du signal et de la formation de complexes protéiques.

Mais la sumoylation est également capable de réguler des voies biochimiques sans passer par la conjugaison aux substrats cibles. L'interaction non-covalente de SUMO et UBE2I avec la dynamine atténue l'endocytose médiée par la dynamine de la transferrine. La protéine Parkine, mutée dans certaines formes de maladie de Parkinson, interagit également de façon non-covalente avec SUMO, agissant sur sa localisation nucléaire et son autoubiquitinylation. D'autres processus physiologiques impliquant la thymine ADN glycosylase et le récepteur des androgènes sont aussi médiés par des associations non-covalentes avec SUMO. Les motifs de liaison à SUMO (SBM) se composent d'un noyau hydrophobe adjacent à une série de résidus acides et qui contient des sites potentiels de phosphorylation. Ces observations indiquent que, même en l'absence de conjugaison directe, la liaison des monomères SUMO avec des protéines contenant des SBM peut avoir des effets importants sur la compartimentation des protéines à l'intérieur des cellules et sur l'assemblage des complexes protéiques.

Tout récemment, l'équipe de Feligioni a pu démontrer que la sumoylation permettait de moduler la réponse présynaptique de neurones glutamatergiques (les conséquences de la sumoylation variant en fonction du mode de stimulation considéré), mettant ainsi en évidence un des rôles de la protéine SUMO dans la synapse (Feligioni *et al.*, 2009).

Le système ubiquitine dans l'autisme

Le marquage des protéines par l'ubiquitine ou par un autre ubiquiton contrôle non seulement la dégradation des protéines, mais aussi la plupart des processus cellulaires, incluant la synthèse et la réparation de l'ADN, la division cellulaire, la transcription, la traduction, la biogenèse des organelles, l'autophagie et l'endocytose. Il peut être prédit avec confiance que les fonctions de l'ubiquitine et des protéines ubiquitin-like seront considérablement étendues dans l'avenir grâce aux nouvelles découvertes qui permettront d'élargir la compréhension de ces modifications protéiques dans la physiologie cellulaire.

Compte tenu de cette diversité fonctionnelle, il n'est pas surprenant que le dysfonctionnement du système ubiquitine soit de plus en plus considéré comme un facteur important dans des maladies humaines. Les défauts de la voie de l'ubiquitine et des autres processus médiés par l'ubiquitine sont au cœur de la physiopathologie de la maladie dans les organes, incluant le cœur, le cerveau, le muscle squelettique, le rein, l'intestin, le squelette et le foie ainsi que dans les maladies infectieuses. La voie de l'ubiquitine joue donc un rôle dans la pathogenèse de maladies touchant tous les systèmes physiologiques humains (Table).

	Gène	Conséquences d'un dysfonctionnement du gène	Référence
E1	<i>UBA1</i>	Amyotrophie spinale infantile liée à l'X ; spermatogenèse et fertilité masculine ; nombreux processus cellulaires	Ramser <i>et al.</i> , 2008 ; Zhu <i>et al.</i> , 2004
	<i>UBA2</i>	Voie de sumoylation ; survie aux stress génotoxiques ; réparation de l'ADN	Prudden <i>et al.</i> , 2009 ; Lois et Lima, 2005
	<i>UBA3</i>	Activation de l'enzyme E3 SCF	Bohnsack and Haas 2003 ; Souphron <i>et al.</i> , 2008
	<i>UBA6</i>	Mortalité embryonnaire	Chiu, 2007
	<i>UBA7</i>	Dégradation de PML/RAR α et apoptose ; leucémie promyélocytaire	Durfee <i>et al.</i> , 2008 ; Kim <i>et al.</i> , 2004
	<i>SAE</i>	Voie de sumoylation	Boggio <i>et al.</i> , 2007 ; Bohnsack et Haas, 2003
E2	<i>UBE2A</i>	Déficiences mentales liées à l'X ; Apoptose	Nascimento <i>et al.</i> , 2006 ; Pagano <i>et al.</i> , 1995
	<i>UBE2B</i>	Cancer du sein ; infertilité masculine	Shekhar <i>et al.</i> , 2008 ; Suryavathi <i>et al.</i> , 2008
	<i>UBE2R2</i>	Cycle cellulaire	Gazdciu <i>et al.</i> , 2007 ; Hagglund et Roizman, 2003
	<i>UBE2D2</i>	Syndrome d'Angelman	Rolfe <i>et al.</i> , 1995

	<i>UBE2L3</i>	Dégradation médiée par le RE ; dissociation de T β γ	Chen <i>et al.</i> , 2006 ; Webster <i>et al.</i> , 2003 ; Obin <i>et al.</i> , 2002
	<i>UBE2L6</i>	Réponse immunitaire ; maladies neurodégénératives ; formation des corps de Lewy et pathogénèse de la maladie de Parkinson	Hagglund et Roizman, 2003 ; Nalepa <i>et al.</i> , 2006 ; Wheeler <i>et al.</i> , 2002 ; Lee <i>et al.</i> , 2008
	<i>UBE2I</i>	Cycle cellulaire ; cancer	Rizos <i>et al.</i> , 2005 ; Yan <i>et al.</i> , 2007
	<i>UBE2C</i> <i>UBE2D2</i>	Accumulation des cellules en mitose ; carcinomes thyroïdiens ; adénocarcinome œsophagien	Pallante <i>et al.</i> , 2005 ; Townsley <i>et al.</i> , 1997
	<i>UBE2D3</i>	Croissance de cellules tumorales	Saville <i>et al.</i> , 2004
	<i>UBE2M</i>	Activation du complexe E3 SCF	Semple <i>et al.</i> , 2003
	<i>UBE2V1</i>	Réparation DSB ; activation de la voie NF κ B	Shembade <i>et al.</i> , 2007 ; Ashley <i>et al.</i> , 2002 ; Zhao <i>et al.</i> , 2006
	<i>UBE2D1</i>	Hémochromatose héréditaire	Gehrke <i>et al.</i> , 2003
E3	<i>UBE3A</i>	Angelman	Kishino <i>et al.</i> , 1997 ; Weeber <i>et al.</i> , 2003
	<i>PARK2</i>	Maladie de Parkinson juvénile récessive	Staropoli <i>et al.</i> , 2003
	<i>NUDT11</i>	Dystrophie ectodermique candidiasis polyendocrinopathie auto-immune	Uchida <i>et al.</i> , 2004
	<i>VHL</i>	Polycythémie congénitale, syndrome de von Hippel-Lindau	Pastore <i>et al.</i> , 2003
	<i>FANCL</i>	Anémie de Fanconi de groupe L ; réparation de l'ADN	Meetei <i>et al.</i> , 2004
	<i>BRCA1</i>	Cancer du sein et des ovaires ; réparation de l'ADN	Meetei <i>et al.</i> , 2004
DUB	<i>CYLD1</i>	Régulation négative de la signalisation de NF κ B	Kovalenko <i>et al.</i> , 2003
	<i>USP9X</i>	Adhésions cellule-cellule ; devenir cellulaire ; signalisation TGF- β	Dupont <i>et al.</i> , 2009
	<i>USP7</i>	Trafic protéique ; tumorigénèse ; voie de l'AMPK	Al-Hakim <i>et al.</i> , 2008 ; Li <i>et al.</i> , 2002
	<i>USP11</i>	Cancer cervical ; réparation de l'ADN ; nucléation des microtubules ; anomalies rétiniennes liées à l'X	Ideguchi <i>et al.</i> , 2002 ; Lin <i>et al.</i> , 2008 ; Schoenfeld <i>et al.</i> , 2004 ; Swanson <i>et al.</i> , 1996
	<i>USP26</i>	Reproduction masculine	Stouffs <i>et al.</i> , 2005
	<i>OTUD5</i>	Interféron de type I ; réponse immunitaire innée	Kayagaki <i>et al.</i> , 2007

Tableau 5 : Rôles des protéines de la voie de l'ubiquitine dans les pathologies humaines (extrait de Ying *et al.*, 2009).

De même que les protéines kinases font l'objet d'une attention toute particulière dans le secteur des biotechnologies et des grandes entreprises pharmaceutiques qui les envisagent comme des cibles médicamenteuses potentielles en raison du rôle central de la phosphorylation des protéines dans la régulation cellulaire, les enzymes impliquées dans la voie de l'ubiquitine, incluant les différentes enzymes E1, E2, E3 et les DUB, sont des cibles de choix dans la mise au point de nouveaux traitements pharmaceutiques, compte tenu de l'importance comparable entre l'ubiquitinylation et la phosphorylation dans la pathogénèse

des maladies. Jusqu'à présent, seul l'inhibiteur du protéasome bortezomib (ou Velcade™) est autorisé pour le traitement du myélome multiple, mais il n'agit pas sur la voie de l'ubiquitine elle-même.

Au sein de la voie de l'ubiquitine, il existe des dizaines d'E2, plus de mille E3, et jusqu'à une centaine de DUB, qui peuvent ainsi être des cibles thérapeutiques en raison de leurs rôles dans le contrôle de différentes voies de signalisation cellulaire. La compréhension et la classification de ces enzymes permettront de poser les bases de la découverte de médicaments dans différentes maladies humaines.

Maladies neurodéveloppementales

UBE3A

Le syndrome d'Angelman est la première pathologie humaine identifiée comme présentant un défaut primaire dans la voie de l'ubiquitine par la mise en évidence de mutations dans le gène *UBE3A* qui code l'ubiquitine ligase E3 E6-AP (Kishino *et al.*, 1997 ; Matsuura *et al.*, 1997), comme nous l'avons déjà décrit. *UBE3A* est soumis à l'empreinte génomique, qui rend silencieux l'allèle paternel dans les neurones mais pas dans les cellules gliales du cerveau (Yamasaki *et al.*, 2003). La perte de fonction maternelle pour *UBE3A* provoque un syndrome d'Angelman.

UBE2A

Par la suite, l'équipe de Nascimento a ainsi pu mettre en évidence la présence d'une mutation stop au sein du gène *UBE2A* codant une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine E2, parmi trois membres d'une famille présentant un syndrome de déficience mentale liée à l'X. La mutation d'*UBE2A* décrite par l'équipe de Nascimento est la première enzyme de conjugaison à l'ubiquitine dont le gène a été associé à une maladie humaine. Comme dans le cas d'*UBE3A* dont les mutations provoquent un syndrome d'Angelman, une mutation d'*UBE2A* conduit à des maladies neurologiques.

Maladies neurologiques

Un article récent paru dans *Nature* portant sur les CNV impliqués dans la susceptibilité à l'autisme a pu mettre en évidence la présence de nouveaux CNV dans des gènes de la voie de l'ubiquitine (*UBE3A*, *PARK2*, *RFWD2* et *FBXO40*) (Glessner *et al.*, 2009). Le système ubiquitine-protéasome fonctionne dans les compartiments pré- et post-synaptiques, régulant les caractéristiques synaptiques, y compris la libération de neurotransmetteurs, le recyclage des vésicules synaptiques dans les terminaisons présynaptiques, et les changements dynamiques dans les épines dendritiques et la densité post-synaptique (PSD) (Yi et Ehlers, 2005). Sur les quatre gènes liés à l'ubiquitine mis en évidence dans cette étude, tous codent des protéines ubiquitin ligases E3 : *UBE3A*, qui a été le plus étudié dans le cadre de l'autisme ; *PARK2*, dont les mutations sont à l'origine de la maladie de Parkinson juvénile autosomique récessive (Kitada *et al.*, 1998) ; et *RFWD2* et *FBXO40*, pour lesquelles aucune mutation n'a pu être précédemment associée à une pathologie. Le rôle de l'ubiquitine dans le renouvellement des composants synaptiques tels que les molécules d'adhésion des cellules neuronales, dans un processus impliquant la régulation de la plasticité synaptique, présente un mécanisme qui relie ces deux grands réseaux de gènes. Par ailleurs, en plus des gènes décrits dans cet article, plusieurs autres gènes impliqués dans la voie de l'ubiquitine sont impliqués dans des maladies neurologiques. Il s'agit notamment de *NHLRC1* (maladie de Lafora), *UBR1* (syndrome de Johanson–Blizzard), et *CUL4B*, *BRWD3* et *HUWE1* (déficience mentale liée à l'X), des gènes qui codent des protéines ubiquitine ligases E3 (pour revue, voir Tai et Schuman, 2008). Des mutations dans *CUL4B*, *BRWD3*, *HUWE1* et *UBE2A*, une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine E2, sont donc la cause de syndromes incluant des déficits intellectuels.

Mécanismes pouvant être impliqués dans l'autisme

Un certain nombre d'études ont abordé le rôle de l'ubiquitinylation au cours du développement neuronal. La formation, la croissance et la stabilisation des synapses sont des phénomènes essentiels à la mise en place de circuits neuronaux fonctionnels, et un important mécanisme de régulation dans la formation et la fonction des synapses est l'ubiquitinylation. En ce qui concerne la régulation du développement du système nerveux, l'ubiquitine est impliquée dans la régulation du guidage axonal (Campbell et Holt, 2001), de la taille des axones (Watts *et al.*, 2003), du développement des synapses (DiAntonio *et al.*, 2001), de la libération des neurotransmetteurs (Wilson *et al.*, 2002 ; Aravamudan et Broadie, 2003), du

nombre de récepteurs postsynaptiques (Bedford *et al.* 2001; Buttner *et al.* 2001; Burbea *et al.*, 2002, Patrick *et al.*, 2003), et des composants de la densité postsynaptique (Ehlers, 2003).

La croissance neuritique induite par le facteur de croissance nerveuse (NGF) des cellules de phéochromocytome de rat (PC12) est parallèle à l'augmentation des taux de conjugués protéiques à l'ubiquitine et coïncide avec des activités augmentées des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine, mais sans augmentation de la protéolyse dépendante de l'ubiquitine. La croissance des neurites est accélérée par blocage de la protéolyse dépendante de l'ubiquitine, et une telle croissance est inhibée par un dipeptide inhibiteur de l'ubiquitinylation dépendante des E3. Ces données impliquent que l'ubiquitinylation et la protéolyse dépendante de l'ubiquitine sont respectivement des régulateurs positifs et négatifs de la croissance des neurites (Obin *et al.*, 1999). La baisse d'expression des ARNm d'UBE2B (une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine présentant 96 % d'homologie avec UBE2A) dans les cellules PC12 conduit à une réduction de la longueur des neurites induite par le NGF, et l'inhibition pharmacologique de la dégradation protéique dépendante de l'ubiquitine semble réduire de façon significative la longueur et la ramification des axones de neurones sensoriels adultes *in vitro* (Kavakebi *et al.*, 2005). Chez la drosophile, le développement et la fonction synaptique ont été rapportés comme des mécanismes régulés par la voie de l'ubiquitine (DiAntonio *et al.*, 2001). Toutes ces données indiquent un rôle important de la voie de l'ubiquitine dans la différenciation neuronale.

La voie de sumoylation n'est pas en reste puisque comme nous l'avons déjà souligné la sumoylation permettrait de moduler la réponse présynaptique de neurones glutamatergiques (les conséquences de la sumoylation variant en fonction du mode de stimulation considéré), mettant ainsi en évidence un des rôles de la protéine SUMO dans la synapse (Feligioni *et al.*, 2009).

À première vue, on pourrait s'attendre à attribuer l'étiologie de la maladie à la mutation de l'E3 considérée, entraînant l'accumulation de son substrat. À ce jour, cependant, il semble qu'aucune des maladies connues n'ait été expliquée de manière satisfaisante par ce modèle simple, même si, dans le cas de *PARK2*, plus d'une douzaine de substrats potentiels ont pu être identifiés. Par conséquent, il est indispensable d'envisager d'autres modèles d'implication des E3.

Les enzymes de conjugaison à l'ubiquitine

Dans la mesure où les enzymes E1 sont les enzymes les moins spécifiques de la voie de l'ubiquitinylation, elles ne semblent pas à privilégier dans l'étude de l'apparition de symptômes neurologiques. A l'opposé les enzymes E3 sont spécifiques mais extrêmement abondantes et elles ne sont pas toujours nécessaires au mécanisme d'ubiquitinylation. Les enzymes E2 de conjugaison à l'ubiquitine sont en revanche spécifiques mais en quantité restreinte, et elles déterminent le type d'ubiquitinylation subie par leurs protéines cibles, ce qui en font des candidats particulièrement intéressants dans l'étude d'une maladie neurodéveloppementale telle que l'autisme.

La signature globale de la superfamille des enzymes E2 est un tripeptide HPN (histidine-proline-asparagine) suivi d'un résidu cystéine généralement situés à huit acides aminés du côté C-terminal de ce motif canonique (Cottee *et al.*, 2006) (voir figure 10).

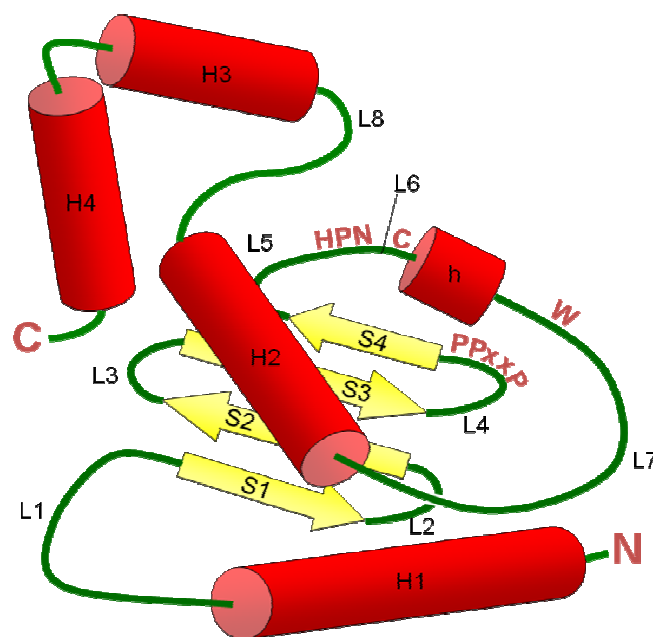


Figure 12 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine. Les boucles sont notées de L1 à L8 ; les feuillets β sont notés de S1 à S4 ; et les hélices sont notées de H1 à H4 (avec « h » une petite hélice 3/10 fréquemment conservée). Adapté de la structure d'UBE2D2 (code pdb E2SK), et légendé selon Winn *et al.*, 2004.

Par ailleurs, plusieurs domaines sont très conservés et peuvent jouer un rôle important dans la fonction de ces enzymes. Par exemple, la séquence entre l'hélice H2 et la boucle L3 semble correspondre au site de fixation de l'ubiquitine libre ou liée (Winn *et al.*, 2004), tandis qu'une séquence N-terminale très conservée du domaine central (core) pourrait jouer un rôle dans l'interaction avec les enzymes E1. Afin d'assurer une forte spécificité, l'ubiquitine est liée à la protéine cible par un mécanisme complexe. Dans la mesure où le petit nombre d'enzymes E1 ne peut pas permettre une grande spécificité, la sélection de la protéine cible doit venir d'autres enzymes. Cependant, on sait très peu de choses sur la relation entre les enzymes E2 et E3. Bien que plusieurs enzymes E2 puissent interagir avec la même enzyme E3, l'inverse est également vrai : une seule enzyme E2 peut travailler avec plusieurs enzymes E3, aussi bien RING qu'HECT. Il existe d'abondantes données structurales sur l'interaction des protéines E2 et E3, impliquant les boucles L4 et L7 comme des sites d'interactions avec les E3 (Winn *et al.*, 2004). Toutefois, si certaines positions d'acides aminés sont clairement identifiées comme jouant un rôle de sites de liaison aux E3, d'autres éléments sur la surface des E2 sont nécessaires pour définir la spécificité de l'interaction de chaque paire E2-E3, tels que les contacts polaires impliquant des chaînes latérales au sein de l'hélice H1 des E2 (Pickart, 2001). Même si la phénylalanine en position 63 dans la boucle L4 est essentielle pour l'interaction avec des E3 de la famille HECT, et que le tryptophane en position 95 dans la boucle L7 est nécessaire pour l'interaction avec les E3 de type RING, c'est la surface tridimensionnelle globale ainsi que la charge qui contribuent de manière significative à la spécificité de l'interaction avec les enzymes E3 (Martinez-Noel *et al.*, 2001). De la même manière, les différentes enzymes E3 peuvent présenter des surfaces d'interaction légèrement différentes pour une même enzyme E2 (Özkan *et al.*, 2005). En outre, des niveaux supplémentaires de régulation et de spécificité sont médiés par l'intervention d'autres protéines.

Selon la nature de l'enzyme E2, le type d'ubiquitylation peut également être différent. Par exemple, chez la levure, seules les enzymes E2 de type UBC13 sont capables de former des chaînes polyubiquitines reliées par les Lys63, et la présence d'un variant des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine (ou UEV pour Ub-conjugating Enzyme Variant) est nécessaire pour cette activité (Andersen *et al.*, 2005).

Le mécanisme d'action des enzymes de conjugaison aux ubiquitons est censé être identique à celui des enzymes de conjugaison à l'Ub, avec des enzymes E2 spécifiques de chaque ubiquiton (par exemple, UBC8 pour ISG15, UBC9 pour SUMO, UBC12 pour NEDD8 chez *S. cerevisiae*), bien que ces ubiquitons forment généralement des mono-conjugués.

Définir correctement les orthologues dans une grande famille de protéines est une tâche difficile, ce qui est particulièrement vrai pour la superfamille des E2. Chez l'homme, on estime que la superfamille des enzymes E2 est composée de 33 gènes (Lorick *et al.*, 2005). Jiang et Beaudet (2004) ont suggéré l'existence de plus de 50 gènes, incluant les variants E2 UEV dépourvus du résidu cystéine essentiel du site catalytique. Les estimations concernant le nombre de gènes constituant la superfamille des enzymes E2 dans diverses espèces sont très variables. Par exemple, 13 gènes ont été identifiés chez *Saccharomyces cerevisiae* (Jones *et al.*, 2001), 22 chez *Caenorhabditis elegans* (Kipreos, 2005), 25 chez *Drosophila melanogaster* (Jones *et al.*, 2001), et 37 chez *Arabidopsis thaliana* (Kraft *et al.*, 2005). Par ailleurs, la nomenclature des enzymes E2 varie entre les espèces, avec des enzymes E2 nommées UBE2 suivi d'une lettre chez l'homme, alors que chez *S. cerevisiae* elles sont référencées UBC suivi d'un nombre, et la numérotation des orthologues d'E2 ne correspond pas toujours à travers les différentes espèces.

Plusieurs classifications des familles E2 ont été publiées (Burroughs *et al.*, 2008 ; Jones *et al.*, 2001), mais aucun consensus clair n'a pu être établi. Des arbres généraux de la superfamille des enzymes E2 ont déjà été publiés (Jones *et al.*, 2001 ; Winn *et al.*, 2004 ; Melner *et al.*, 2006 ; Burroughs *et al.*, 2008), mais les récents progrès dans le séquençage et l'annotation du génome permettent actuellement une approche plus réfléchie. Même si une analyse phylogénétique de la superfamille des enzymes E2 existe pour les génomes de *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* et *Arabidopsis thaliana* (Jones *et al.*, 2001 ; Kipreos, 2005 ; Kraft *et al.*, 2005), aucune analyse exhaustive n'a été publiée pour les espèces *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, présentant pourtant des séquençages complets de leur génome. Récemment, Burroughs *et al.* (2008) a proposé un arbre général de divers membres de la superfamille des E2, mettant en évidence leurs structures particulières. Toutefois, cette étude n'a pas analysé les familles E2 classiques dans le détail, incluant plusieurs pseudogènes et séquences redondantes, ainsi que des gènes très lointains.

Matériel et méthodes

Étude phylogénétique des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine

Recherche par Blastp

Afin d'identifier un premier ensemble d'enzymes de conjugaison à l'ubiquitine connues une étude bibliographique a tout d'abord été menée, permettant de recueillir une liste aussi étendue que possible de séquences protéiques d'E2. Les homologues ont ainsi pu être identifiés dans une première étape grâce à une recherche par le programme Blastp du site NCBI, en se basant sur les paramètres par défaut et en utilisant un score minimal de 10^{-20} . Cette recherche a été effectuée pour sept espèces : *H. sapiens*, *M. musculus*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *S. pombe*, *S. cerevisiae* et *A. thaliana*. Chacune des séquences ainsi obtenue a fait l'objet d'une nouvelle recherche par Blastp dans les sept espèces afin d'identifier un maximum de séquences codant potentiellement pour une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine. Les séquences ont été utilisées pour les recherches une première fois dans leur intégralité puis une seconde fois en n'utilisant que leur domaine central (core) UBC d'environ 150 acides aminés.

Seules les séquences comportant une nomenclature RefSeq référencées NP_ ont été conservées, dans la mesure où ces séquences ont été individuellement validées avec un support expérimental. Les séquences redondantes et les pseudogènes ont également été éliminés. Chaque séquence protéique a enfin été associée à un gène par soumission à la plateforme GeneBank du site NCBI.

Alignement des séquences par ClustalW

Les séquences entières de toutes les protéines obtenues ont été alignées afin d'identifier le domaine core UBC de chaque séquence. Toutes les séquences de ces domaines cores ont ensuite été assemblées en un unique fichier en utilisant le logiciel d'édition de multiples séquences BioEdit. L'alignement multiple des séquences protéiques des domaines cores a été réalisé en utilisant l'algorithme ClustalW avec ses paramètres par défaut, et cet alignement a

été affiné par des réajustements manuels. En utilisant ces séquences protéiques tronquées, un arbre de l'ensemble des enzymes E2 humaines a été spécifiquement tracé afin d'obtenir une représentation des différentes familles.

Certaines protéines ont été réaffectées à des familles en utilisant les scores de similarité donnés par le programme de Blast protein-protein du site NCBI. L'homologie des séquences a été estimée par le programme de statistique PRSS qui calcule le score de similarité entre deux séquences. Les protéines ont alors été attribuées à certaines familles lorsque leur score PRSS était inférieur à 10^{-30} .

Après avoir utilisé cette approche pour classer chaque protéine dans un groupe, toutes les séquences ont été réalignées et la relation entre chaque groupe a été ré-analysée en utilisant les séquences protéiques entières.

Algorithmes de phylogénie : NJ, ML, MP, BI

L'alignement multiple des séquences core a tout d'abord été utilisé pour générer une matrice de distances entre les protéines en se basant sur le modèle de matrice de Jones-Taylor-Thornton.

Ces matrices ont ensuite été utilisées pour générer des arbres phylogénétiques selon l'algorithme du minimum d'évolution (Neighbor-Joining, ou NJ), en utilisant le logiciel Phylip3.65. Des rééchantillonnages (bootstraps) de 1000 répliques ont été réalisés selon la méthode de Felsenstein, en conservant les paramètres par défaut et en utilisant un élément extérieur (outgroup) (un gène appartenant à l'espèce *A. thaliana* pour chaque arbre de famille). Les arbres phylogénétiques ont été visualisés et manipulés en utilisant les logiciels TreeView1.6.6 et TreeDyn195.3.

Les études phylogénétiques ont été également effectuées avec la méthode du maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood, ou ML), en utilisant le programme Proml du pack Philip3.65, la méthode du maximum de parcimonie (Maximum Parsimony, ou MP), en utilisant le programme Protpars du pack Philip3.65, et la méthode d'inférence Bayésienne (Bayesian Inference, ou BI), en utilisant le programme MrBayes. Les méthodes MP et ML ont été effectuées en conservant les paramètres par défaut. Les calculs ML se sont basés sur la matrice de substitution de Jones-Taylor-Thornton. Les valeurs de bootstrap ont été estimées en utilisant 1000 répliques non paramétriques pour les trois méthodes.

Pour la phylogénèse BI, deux séries de calculs (appelés chaînes de Markov) ont été lancées simultanément selon le modèle de taux fixe de Jones. Pour le calcul de arbres des familles, les générations ont été menées jusqu'à obtenir un score inférieur à 0.01, en échantillonnant toutes les 10 générations et avec une suppression des premières générations obtenues (appelé burn-in, et correspondant à 25 % du nombre total de générations) permettant d'éliminer le bruit de fond des premiers calculs. Chaque calcul phylogénétique a été reproduit une fois en utilisant un autre jeu de données lui-même soumis à un rééchantillonnage (bootstrap) pour s'assurer de la convergence des résultats.

Calcul d'arbre consensus par le programme Consense

Pour chaque algorithme, un arbre consensuel des résultats a été obtenu en utilisant le programme Consense du pack Philip3.65 en utilisant l'option « majority rule extended type ». Pour l'arbre BI, les nombres indiquent la « probabilité de crédibilité du clade » (clade credibility value) et les branches pour lesquelles les valeurs étaient inférieures à 95% ont été fusionnées. Pour les autres arbres, les chiffres correspondent aux valeurs de Bootstrap. Les branches ayant une valeur de Bootstrap inférieures à une valeur seuil définie (59 % pour les arbres NJ et ML, 85 % pour les arbres MP) ont également été fusionnées.

Un arbre consensus des arbres obtenus avec les quatre méthodes a été généré après vérification de la concordance des différents résultats et en utilisant le programme Consense du pack Phylip3.65 avec les paramètres par défaut et l'option de « majority rule extended type ». Tous les arbres ont été tracés et annotés grâce au programme TreeDyn195.3. Seuls les nœuds présents dans au moins trois des quatre analyses ont été conservés.

Criblage de gènes candidats par séquençage de l'ADN génomique

Les populations étudiées

Le groupe témoin (n = 256) est composé de personnes françaises caucasiennes anonymes et sans liens de parentés, sélectionnés après un questionnaire médical et ethnique. Il s'agit de sujets ne présentant ni signes de syndromes autistiques ni déficience mentale.

Les patients autistes (n = 195, âgés de 4 à 38 ans) sont issus de l'Unité de Pédiopsychiatrie du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours (France). Ils sont également non apparentés et issus de familles caucasiennes. Les critères du DSM-IV ont été utilisés par une équipe de praticiens pour confirmer le diagnostic d'autisme. Le diagnostic a été complété par une le test de Rimland (n = 32) et certains patients ont également été évalués en utilisant les critères de l'ADI ou du CARS (n = 15). L'examen clinique a été complété par une échelle d'évaluation du comportement (BSE-R) (Barthélémy *et al.*, 1997). Les maladies génétiques identifiables ont été exclues par évaluations cliniques et examens cytogénétiques. La mutation *FRAXA*, testée par Southern Blot pour la répétition CGG, a été exclue. Le niveau de développement a été évalué en utilisant les tests classiques (test de Brunet-Lézine, EDEI-R). Le degré de déficience mentale a été évalué sur les critères du DSM-IV.

Les consentements écrits ont été obtenus pour les patients autistes (ou leurs parents) et pour les individus contrôles. Ce protocole d'étude a été approuvé par les collectivités locales et les comités d'éthique nationaux (INSERM projet RBM 93045).

L'extraction d'ADN

L'ADN génomique a été extrait à partir de leucocytes isolés de sang prélevé en présence d'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) en utilisant un protocole classique (Sambrook *et al.*, 1989). Après centrifugations, lavages par une solution saline et lyse des hématies en milieu hypotonique, les leucocytes sont récupérés sous forme de culot puis lysés en présence de protéinase K (digestion des nucléopores) et de sarkosyl (libération de l'ADN

génomique). Des étapes successives de précipitation et resolubilisation de l'ADN permettent d'obtenir une banque d'ADN pure. La concentration et la qualité de l'ADN obtenu sont estimées par mesure spectrophotométrique.

Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction, ou PCR)

La technique de criblage génétique nécessite au préalable une amplification du fragment étudié par PCR.

Le choix des couples d'amorces utilisés pour l'amplification spécifique de chaque exons a été réalisé grâce au logiciel Primer-Blast du site NCBI qui concentre en une seule étape à la fois la création des amorces par l'algorithme du logiciel Primer3 et le contrôle *in silico* de la spécificité des amorces envers l'exon d'intérêt par le logiciel Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Le mélange réactionnel de la PCR se compose de 25 µl contenant 50 ng d'ADN génomique, 0,1 U de Taq polymérase GoTaq (Promega®), 1X de tampon GoTaq Flexi colorless (Promega®), 1,5 mM de MgCl₂ (Promega®), 12,5 mM de dNTP, 10 pmol de chaque amorce sens et antisens. L'amplification est réalisée dans un thermocycler Biorad iCycler pendant 35 cycles comprenant chacun 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation des amorces sur l'ADN cible à une température d'hybridation T_m dépendante du couple d'amorces et 30 secondes d'élongation à 72°C ; ces 35 cycles sont précédés d'une dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C et suivis d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C.

La vérification du produit obtenu est obtenue par migration électrophorétique de 5 µl de chaque produit de PCR additionné de 3 µl de bleu de bromophénol, sur gel d'agarose (Eurobio®) à 1 % dans du tampon TBE 1X (Tris 1,0 M, acide borique 1,9 M, EDTA 0,01 M). Le BET (Merk®) incorporé à 0,5 µg/µl dans le gel permet de visualiser les fragments obtenus en s'intercalant dans l'ADN et en émettant une fluorescence après une irradiation aux UV (à 312 nm). La taille des fragments amplifiés est estimée par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire ayant migré en parallèle.

Séquençage : cycle, purification puis passage sur le séquenceur et analyse des résultats

Le principe du séquençage est basé sur une amplification du produit de PCR en présence de desoxyribonucléotides (dNTP) et de didesoxyribonucléotides (ddNTP), avec arrêt d'élongation par incorporation d'un des quatre ddNTP portant des fluorochromes spécifiques.

Le mélange réactionnel de séquençage par cycles d'amplification asymétrique contient 2 µl de produit de PCR, 1,5 µl de tampon BigDye Terminator v1.1,v3.1 5X sequencing Buffer (Applied Biosystems®), 1 µl de mix BigDye Terminator v1.1 cycle (Applied Biosystems®) et 1 µl d'amorce sens ou antisens à 10 pmol/µl, H₂O miliQ qsp 10 µl.

La réaction de séquençage est réalisée dans un thermocycler GenAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems®) suivant un programme de 25 cycles comprenant 10 secondes à 96°C puis 5 secondes à 50°C et 4 secondes à 60°C, le tout précédé d'une dénaturation initiale d'une minute à 96°C.

Après purification des produits du cycle de séquençage à l'aide des coffrets de purification Montage Millipore, les séquences d'ADN sont lues par électrophorèse capillaire sur un séquenceur ABI 3130xl 16 capillaires (Applied®) situé sur le site de l'UTTEL de l'hôpital Bretonneau.

Les séquences sont finalement analysées à l'aide des logiciels BioEdit® et CodonCode Aligner®.

Calculs statistiques

Étude d'association

Équilibre de Hardy-Weinberg

C'est le modèle théorique central de la génétique des populations. La notion d'équilibre dans le modèle de Hardy-Weinberg est soumise aux hypothèses suivantes :

- la population est panmictique (les couples se forment au hasard – panmixie – et leurs gamètes se rencontrent au hasard – pangamie)
- la population est « infinie »

- il ne doit y avoir ni sélection, ni mutations, ni migration
- les générations successives sont discrètes (pas de croisements entre générations).

Dans ces conditions, la diversité génétique de la population se maintient et doit tendre vers un équilibre stable de la distribution génotypique.

La loi de Hardy-Weinberg permet le calcul des fréquences génotypiques à partir des fréquences alléliques. Un test du khi-deux consistera à comparer le nombre théorique de chaque génotype au nombre observé. Le khi-deux calculé ne doit pas passer le seuil de significativité de $p = 0,05$ afin de pouvoir affirmer que dans la population sur laquelle on travaille, la distribution des génotypes s'est faite au hasard.

Test du Khi-deux (χ^2)

C'est un test statistique qui consiste à comparer une distribution de fréquence observée à une distribution attendue.

Une table du χ^2 permet, en fonction du degré de liberté (ddl), de noter la probabilité (p) que le χ^2 dépasse une certaine valeur. Au-delà de cette valeur de p (en général, $p < 0.05$, c'est à dire 5 % de risque de rejeter à tort H_0), on pourra conclure qu'il existe une différence significative entre les distributions observées.

Étude de déséquilibre de transmission

Le test de déséquilibre de transmission (TDT) est un test puissant permettant l'étude d'une liaison entre une maladie et le locus du marqueur déjà associé à la pathologie étudiée (Spielman *et al.*, 1993). Les données du test sont issues de familles présentant au moins un descendant atteint et au moins un parent hétérozygote pour l'allèle du marqueur associé à la maladie.

Le test compare ainsi le nombre de fois que de tels parents hétérozygotes transmettent le marqueur associé à une descendance malade, avec le nombre de fois qu'ils transmettent l'autre l'allèle.

Ce test présente l'avantage de ne pas être affecté par l'existence de stratification.

Le TDT de l'allèle considéré des parents aux enfants autistes a été estimé en utilisant un test de khi-deux, et confirmé par des calculs réalisés à l'aide des logiciels FBAT 2.0.3 (<http://www.biostat.harvard.edu/~fbat/default.html>) et Haploview 4.1 (<http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>) permettant de valider le respect de l'équilibre d'Hardy-Weinberg.

Étude haplotypique

Un haplotype est une combinaison d'allèles situés en divers *loci* mais qui sont transmis ensemble sur le même chromosome ; il regroupe donc un ensemble de polymorphismes SNP localisés sur une seule chromatide qui sont statistiquement associés. En théorie, l'identification de quelques allèles du bloc haplotypique doit pouvoir permettre d'identifier tous les autres polymorphismes associés au sein du bloc.

Ces informations sont très utiles pour étudier la dimension génétique de maladies, et a été répertorié chez l'homme par le projet international HapMap, le but étant de découvrir s'il existe une différence de fréquences des haplotypes entre les patients et la population contrôle.

Les blocs d'haplotypes ont été définis dans notre population de patients autistes et dans notre population contrôle en utilisant la méthode « Solid spine of Linkage Disequilibrium » proposée par le logiciel Haploview 4.1.

La comparaison des fréquences d'haplotypes entre les cas et les témoins a été réalisée par un test de khi-deux effectué par le logiciel. Des tests de permutation avec 10 000 combinaisons, ainsi qu'un test de conformité des fréquences génotypiques à l'équilibre de Hardy-Weinberg à la fois pour la population témoins et pour la population de patients autistes ont été effectués par le logiciel Haploview 4.1.

Test de Student

Ce test, aussi appelé test de comparaison des moyennes, est un test d'association permettant de comparer entre elles deux cohortes de variables quantitatives

Une valeur t théorique est obtenue grâce à la table t de Student ; si le t observé est supérieur au t théorique, alors on peut rejeter l'hypothèse nulle et conclure à une différence significative entre les deux cohortes.

Test de Mann-Whitney

Le test de Mann-Whitney permet de tester l'identité de deux échantillons : il porte sur le fait que deux séries de valeurs numériques (ou ordinales) sont issues d'une même distribution. Les valeurs testées doivent être numériques, c'est-à-dire pouvoir être ordonnées.

Ce test est un test non paramétrique : il ne fait aucune hypothèse sur les distributions D_A et D_B des deux populations comparées ; il teste donc l'hypothèse $H_0 : D_A = D_B$.

Ce test permet de calculer l'indice U de Mann-Whitney et de déterminer un U seuil grâce à une table de Mann-Whitney. Si U est supérieur au seuil de la table, il n'y a pas de différence significative ; en revanche si U est inférieur au seuil de la table, on peut conclure qu'il existe une différence significative entre nos deux échantillons.

Cultures cellulaires de cellules souches neurales

Prélèvements de mésencéphales d'embryons de rat

La technique de culture de précurseurs de cellules neurales chez le rat est adaptée de la technique développée par Duittoz et Hevor (2001) chez le mouton. Après sacrifice par dislocation cervicale sous anesthésie à l'isoflurane d'une rate Wistar à 14 jours de gestation, l'utérus est prélevé et maintenu dans un milieu de dissection HBSS (Solution Saline Equilibrée de Hanks – Gibco®). Seule la partie mésencéphalique du cerveau de l'embryon est prélevée.

Après dissection des méninges et dissociation mécanique des tissus mésencéphaliques, l'homogénat cellulaire est resuspendu dans un milieu nutritif pour précurseurs de cellules neurales, composé de milieu Neurobasal-A sans L-Glutamine, de L-Glutamine à 2 mM, de gentamycine à 20-50 µg/ml, de fungizone à 2,5 µg/ml, de N2 (1:100), d'EGF (Epidermal Growth Factor - 1:100) et de bFGF (basic Fibroblast Growth Factor - 1:100) (tous les réactifs de culture cellulaire proviennent de Gibco®). Le nombre de cellules est compté sur cellule de Malassez et les cellules sontensemencées à une densité de 50 000, 200 000 et 500 000, dans des boîtes 60 mm. La mise en culture se fait à 37°C, sous 5 % de CO₂.

Mise en culture pour la prolifération et la différenciation

La prolifération des cellules souches neurales se fait comme exposé précédemment, en utilisant du milieu Neurobasal-A supplémenté en N2 (Gibco®). Le changement de milieu se fait tous les 2 jours. Après obtention de neurosphères (amas cellulaires sphériques), les cellules sont dissociées à l'aide de trypsine (Gibco®) et réensemencées dans des plaques 24 puits à 40 000 cellules par puits pour continuer la prolifération des cellules souches neurales et permettre la différenciation.

La différenciation des cellules souches neurales en neurone est effectuée à partir de cellules trypsinées ensemencées à 40 000 cellules par puits dans une plaque 24 puits, en présence d'un milieu composé de Neurobasal-A sans N2, qui est remplacé par un supplément B27 (Gibco® – 1:100) qui est un substitut de sérum optimisé permettant la viabilité et la croissance à long

terme des neurones du système nerveux central et en particulier des neurones hippocampiques, et de bFGF (1:200). Les 2/3 du milieu sont changés tous les deux jours. La culture se fait dans des puits recouverts de lamelles de verre prétraitées à la poly-lysine L (1 mg/100 ml pendant 10 minutes puis 3 rinçages de 3 minutes à l'eau stérile) afin de permettre l'adhésion des cellules.

RT-qPCR

Extraction d'ARN totaux

L'extraction des ARN totaux des cellules (500 000 cellules dans une plaque 6 puits, après une semaine de prolifération) a été réalisée selon la technique de Chomczynski et Sacchi (1987), grâce à un réactif d'extraction rapide, le TRIzol reagent (Invitrogen®). Ce réactif contient du phénol et de l'isothiocyanate de guanidine qui se complexe à l'ARN et permet de rompre les interactions entre l'ARN et les protéines. L'extraction des ARN se fait à basse température (centrifugation à 4°C) pour éviter une activation de nucléases. Après culture d'une semaine, les cellules sont préalablement rincées deux fois dans 3 ml de PBS RNase free froid puis décollées mécaniquement à l'aide d'1 ml de TRIzol® avant d'être congelées à -80°C pendant au moins 2 heures. L'homogénat est ensuite incubé 5 minutes à température ambiante pour permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques. L'ajout de 0,2 ml de chloroforme permet la dénaturation de toutes les protéines. Après centrifugation (4°C, 12000 g, 15 min), il y a obtention de trois phases : une phase rosée inférieure qui correspond aux protéines et à l'ADN, une mince couche blanchâtre intermédiaire correspondant à l'ADN et une phase aqueuse supérieure où se trouve l'ARN. C'est cette dernière phase qui est récupérée et précipitée avec 0,5 ml d'isopropanol. Une centrifugation à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C permet l'obtention d'un culot d'ARN pouvant être invisible à l'œil nu. Ce culot est isolé du surnageant puis lavé avec 1 ml d'éthanol 70 % et centrifugé à 7500 g, durant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est séché 10 minutes sous hotte aspirante. Une fois sec, le culot est dissout dans 100 µl d'eau ultrapure contenant du DEPC 0,1% (inhibiteur des ribonucléases). Les échantillons d'ARN sont traités à la DNase (Eurogentec®) à 0,3 U/µl de solution d'ARN, afin d'éliminer toute contamination par de l'ADN. La réaction s'effectue pendant 10 minutes à température ambiante, puis la DNase est dénaturée au bain-marie 5 minutes à 65°C.

La quantification se fait par spectrophotométrie à 260 nm. La pureté des échantillons est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 %. Trois bandes doivent être visibles afin de permettre d'analyser les échantillons : les ARN 28S, 18S et 5S.

Transcription inverse (ou RT)

La réaction de transcription inverse de l'ARN ainsi extrait a été effectuée dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 250 ng d'ARN, 50 ng d'héxamères Random Primer, 10 mM de dithiothréitol (DTT), 1 mM de dNTPs, du tampon enzymatique 1 X et 200 U de reverse transcriptase (Superscript II reverse transcriptase – Invitrogen®). La réaction de rétrotranscription a été réalisée en un cycle d'hybridation et d'élongation (42°C durant 45 min), suivi d'un cycle de dénaturation des enzymes (92°C pendant 5 min).

Réaction de polymérisation en chaîne semi-quantitative, ou qPCR

Cette technique est fondée sur une PCR classique avec addition au milieu réactif d'un agent intercalant fluorescent : le Sybrgreen (Roche®). Ce dernier est spécifique de l'ADN double brin et s'intercale entre les bases lors de l'amplification par les amorces spécifiques du transcrit étudié. La fluorescence détectée est alors fonction de la quantité d'ADNc amplifiée. Sur chaque courbe obtenue, le cycle seuil (Ct) est enregistré et correspond au nombre de cycles nécessaires pour que le taux de fluorescence dépasse une valeur seuil correspondant à un rapport signal / bruit de fond défini. Le traitement se fait à l'aide du logiciel LightCycler software®.

La PCR a été réalisée dans un volume final de 10 µl et a nécessité 25 ng de produit de RT, 3,5 pmol de chaque amorce, et du tampon de réaction qPCR Roche 1 X. Chaque échantillon a été déposé en dupliqua dans un appareil LightCycler480 de Roche®, à une température d'hybridation de 60°C, et les résultats ont été traités de façon relative par rapport à ceux obtenus sur le même matériel biologique pour une amplification utilisant les amorces du gène de ménage *GAPDH*.

Clonage des gènes *UBE2A* et *UBE2H* dans des vecteurs plasmidiques

L'ADNc codant UBE2H a été inséré dans le vecteur pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (GFP Fusion TOPO TA expression kit, Invitrogen®) par clonage TA. Cette technique utilise la propriété qu'ont certaines polymérases d'ajouter des adénosines phosphates aux extrémités 3' des

fragments amplifiés par PCR. Le vecteur linéarisé possède quant à lui une thymidine phosphate et une topoisomérase I à chacune de ses extrémités 5' permettant la ligation. Le clonage du gène dans ce plasmide aboutit à l'expression d'une protéine fusionnée à la GFP. L'insertion de l'ADNc s'effectue dans le site de clonage multiple au niveau des TA rajoutés aux extrémités des sites de restriction BstX I et EcoRV. Ce vecteur possède en amont du site d'insertion le promoteur fort eucaryote PCMV permettant l'expression de la protéine dans des cellules eucaryotes de mammifères.

L'ADNc codant UBE2A a été inséré dans le vecteur pcDNA3.1/v5-His-TOPO (Invitrogen®) également par clonage TA. Ce plasmide possède le même promoteur fort PCMV qui permet la transcription du gène d'intérêt, mais ne permet pas la création d'une protéine d'intérêt fusionnée à la GFP.

Dans un volume de 5 µl, un appariement « TA » et une ligation sont donc possibles entre le vecteur ouvert (10 ng) et la séquence amplifiée par PCR (20 ng). Des bactéries *Escherichia coli* TOP10 (30 µl) sont ensuite transformées par 3 µl du vecteur ligaturé grâce à un choc thermique (dans la glace pendant 30 min puis 42°C pendant 30 s puis 2 min dans la glace). Les bactéries transformées sont incubées dans 250 µl de milieu SOC (Invitrogen®) à 37°C sous faible agitation (200 tours/min) pendant 1 heure avant d'êtreensemencées sur une gélose LB Agar (Sigma®) contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Après une nuit à 37°C, 20 colonies ont été repiquées chacune dans 3 ml de milieu LB de base contenant de l'ampicilline (100 µg/µl) (Sigma®) et incubées à 37°C sous agitation (200 rpm) pendant 24h. Pour chaque tube, un aliquot de 800 µl de suspension bactérienne est conservé à -80°C en présence de 200 µl de glycérol 30 %.

L'ADN plasmidique a été purifié grâce au kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen®). Après centrifugation de la solution bactérienne, le culot a été resuspendu dans un tampon P1 contenant de la RNase. La lyse bactérienne a eu lieu dans des conditions alcalines dans un tampon P2 (mélange de SDS et de NaOH). Le SDS solubilise les phospholipides et les composants protidiques de la membrane cellulaire alors que l'alcalinité du milieu entraîne la dénaturation des ADN plasmidiques et génomiques. Les ARNm, quant à eux, ont été détruits par les RNases présentes dans la suspension. Dans la mesure où ces conditions drastiques ne doivent pas être maintenues pour ne pas dénaturer irréversiblement le plasmide, une neutralisation du milieu par le tampon N3 est nécessaire. Ce tampon contient en plus du NaOAc qui engendre une augmentation de la concentration en sels dans le milieu conduisant

à la précipitation des protéines dénaturées, de l'ADN génomique et des débris cellulaires. L'ADN plasmidique, plus petit, se renature et reste en suspension. Une centrifugation de 10 min à 10000 g nous a permis de récupérer l'ADN plasmidique dans le surnageant et de le transférer sur une mini-colonne composée d'une membrane en silice. Une étape de lavage avec deux tampons nous a permis dans un premier temps de détruire les endonucléases (PE) puis dans un second temps de réaliser un lavage à l'éthanol. La forte concentration en sels permet l'adsorption sélective de l'ADN plasmidique sur la colonne. L'ADN a finalement été élué avec un tampon faiblement concentré en sels.

Transfection des cellules souches neurales

Les cellules sont transfectées en utilisant un protocole particulier adapté à l'appareil Nucleofector[®] (Amaxa[®]). Ce système est spécialement étudié pour les cellules réputées difficilement transfectables. C'est une méthode non rétrovirale, qui est basée sur une combinaison de paramètres électriques et de solutions spécifiques au type cellulaire. De cette façon, l'ADN est transporté rapidement dans le noyau. Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules sont centrifugées, le surnageant est aspiré et elles sont remises en culture après comptage, à une densité de 4 à 5.10⁶ cellules, dans un milieu I composé de :

- DMEM/F12 supplémenté en N2 (1:100) : 500 ml
- 780 µg D(+)-Glucose
- 36 mg L-glutamine
- 0,86 g NaHCO₃
- 12,5 mg Insuline
- 50 µg Transferrine
- 50 µl Putrescine 1 M
- 30 µl Sélénite 0,5 mM
- 100 µl Progestérone 0,1 mM
- bFGF 15 ng/ml

Le jour de la transfection, les cellules sont resuspendues dans 100 µl de solution Rat NSC Nucleofector[®], en présence de 2 à 10 µg d'ADN plasmidique d'intérêt, purifié à l'aide du système EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen[®]). L'échantillon ainsi prêt est transféré dans une

cuvette et est soumis à un programmes d'électroporation permettant une haute efficacité de transfection et une expression à long terme.

Les cellules « nucléofectées » sont ensuite réensemencées soit dans le milieu I pour le maintien en cellules souches neurales indifférenciées, ou dans un milieu de culture II, identique au milieu I, mais sans bFGF et supplémenté en sérum de veau fœtal 1 %, afin de permettre la différenciation.

Immunocytochimie par marquage de la β -III tubuline

Après rinçage au PBS pendant 2 minutes, les cellules sont fixées à l'aide de paraformaldéhyde 4 %, pendant 15 minutes à température ambiante. Afin d'inhiber l'adhésion non spécifique d'immunoglobulines (IgG), les cultures sont conservées dans un mélange PBS + Saccharose 20 % + Azide. Le marquage des neurones est obtenu par une incubation de 12 heures à 4°C en présence d'un anticorps primaire de souris anti- β -III tubuline dilué au 1:1000 dans du PBS TA (Triton + Azide), BSA 10 %. L'éventuel excès des anticorps primaires est éliminé en rinçant 3 fois au PBS TA (Triton 0,3 % + Azide 0,1 %). La fluorescence est permise grâce à une incubation 2h à température ambiante et à l'obscurité de l'anticorps secondaire anti-souris (Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG – Molecular Probes). Les noyaux sont enfin colorés au 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) lors de la fixation des lamelles sur la lame d'observation.

Modélisation moléculaire de la protéine UBE2A et de son mutant c.382C>T

La modélisation *in silico* de la structure tridimensionnelle de la protéine humaine UBE2A a été réalisée à partir de la séquence protéique d'UBE2A sur la base de structures 3D connues proches répertoriées sur le serveur de la Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). La modélisation a donc été réalisée sur la base de la structure 3D connue de deux homologues, UBE2B (Homo sapiens; code PDB: 1JAS) et UBC2 (Saccharomyces cerevisiae; code PDB: 1AYZ). Les coordonnées de la structure tridimensionnelle d'UBE2A ont été calculées par le serveur de modélisation Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>) et la construction du modèle a été réalisée par le logiciel Pymol (<http://pymol.org/>).

Résultats

Étude des enzymes de conjugaison du système ubiquitine

Article 1 : Caroline Michelle, Patrick Vourc'h, Laurence Mignon, Christian R. Andres (2009). What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? J Mol Evol. 68(6):616-28

Position du problème

Lorsque nous nous sommes posé la question de l'implication de gènes codant des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine dans l'autisme, la première information nécessaire à notre analyse était de connaître la liste complète de ces gènes chez l'homme afin de pouvoir identifier les meilleurs candidats dans le syndrome autistique. Il nous est très vite apparu intéressant de connaître également les différents orthologues des protéines humaines chez d'autres espèces servant de modèles ou pour lesquelles une implication dans des fonctions neurologiques avait pu être démontrée. Par ailleurs l'utilisation des autres espèces s'est très vite avérée nécessaire non seulement pour trouver toutes les enzymes de conjugaison à l'ubiquitine chez l'homme, mais également afin d'établir les distinctions entre protéines homologues et protéines paralogues. Nous nous sommes donc lancés dans une tâche de reconstruction phylogénétique qui n'avait pas été programmée au début de notre projet, mais qui s'est avérée indispensable pour une meilleure compréhension de cette grande famille de protéines.

Notre travail a débuté par une analyse minutieuse de plusieurs espèces dont les génomes ont été entièrement séquencés, judicieusement réparties dans l'arbre de vie et fréquemment utilisées en tant que modèles. Nous avons ainsi examiné sept espèces, afin d'identifier les familles d'enzymes E2 et de construire la phylogénie de chaque famille au moyen de plusieurs méthodes phylogénétiques, dans le but de proposer une définition précise des différentes familles d'enzyme E2 en fonction des orthologies ainsi reconstituées. Nos résultats ont pu ensuite être validés sur le génome complet de l'anémone de mer (*Nematostella vectensis*) récemment publié (Putnam *et al.*, 2007).

Résultats

Recherche des E2 connues chez l'homme ainsi que chez six autres espèces (*M. musculus*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *A. thaliana*)

Nous avons choisi d'inclure dans notre étude la souris *Mus musculus* comme autre espèce de mammifère, notamment en raison de son utilisation dans de nombreuses études portant sur les tests fonctionnels des protéines et incluant des animaux transgéniques. *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster* ont également été choisies en raison des nombreuses données de génomique fonctionnelle disponibles ; elles représentent deux modèles d'organismes multicellulaires appartenant à des lignées plus lointaines. Toutes ces espèces sont des membres des Bilateria dans le phylum Animalia. Plus lointainement enraciné dans l'arbre des espèces nous avons inclus deux espèces de levures, *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*. Ces deux espèces appartenant à un autre phylum, les Fungi, nous ont aidés à évaluer l'ensemble ancestral des protéines E2 chez les eucaryotes. Enfin les enzymes appartenant à une plante modèle, *Arabidopsis thaliana*, nous ont été utiles pour la conception des arbres phylogénétiques en permettant un enracinement au moyen des séquences des protéines de cette espèce.

Pour débiter ce travail, les différentes bases de données Genbank, Swiss-Prot, TrEMBL (y compris les bases de données concernant les familles de protéines Pfam et InterPro), Gene et Ensembl ont été utilisées pour récupérer un total de 78 séquences de protéines codantes RefSeq chez *Arabidopsis thaliana*, 16 chez *Saccharomyces cerevisiae*, 15 chez *Schizosaccharomyces pombe*, 31 chez *Caenorhabditis elegans*, 36 chez *Drosophila melanogaster*, 181 chez *Mus musculus* et 71 chez *Homo sapiens*. Nous avons éliminé les séquences redondantes et les pseudogènes, ainsi que les séquences pour lesquelles les scores PRSS étaient inférieurs à 1. Cela nous a conduit à exclure certaines familles telles que la famille TSG101-UEVLD, la famille UFC1 et les enzymes de conjugaison d'ubiquitine-like ATG3 et ATG10, pourtant habituellement considérées comme appartenant à la superfamille des E2. Ces familles peuvent être considérées comme lointainement liées mais où toute trace de séquence primaire commune a disparue, ou ayant convergé au niveau de leurs structures tridimensionnelles.

Après cette analyse, notre liste finale comprend donc 48 séquences protéiques d'E2 pour *A. thaliana*, 14 pour *S. cerevisiae*, 14 pour *S. pombe*, 26 pour *C. elegans*, 32 pour *D. melanogaster*, 36 pour *M. musculus* et 37 pour *H. sapiens*.

Regroupement des enzymes E2 en familles

Nous avons défini les limites de la superfamille en fixant un score PRSS pour les séquences protéiques inférieur à 10^{-30} . L'alignement de toutes ces séquences protéiques, l'analyse phylogénétique globale incluant toutes les séquences et les calculs de scores d'homologie ont révélé l'existence de 17 sous-groupes que nous avons appelé familles.

Nous avons utilisé les quatre principaux algorithmes classiques pour la reconstruction phylogénétique, à savoir les algorithmes NJ, MP, ML et BI, et les résultats obtenus sont globalement cohérents. La construction d'arbres consensus a permis une représentation simple et significative de ces résultats.

Toutes les familles présentent au moins un membre chez l'homme, tous les gènes étant répartis sur l'ensemble du génome humain. Il est ainsi possible de distinguer quatre types de familles d'enzyme E2, en tenant compte de leur répartition parmi les espèces. Dix familles sont présentes dans toutes les espèces (familles 1 à 10), deux familles sont présentes dans toutes les espèces sauf *C. elegans* (familles 11 et 12), quatre familles sont absentes uniquement chez les deux levures (familles 13 à 16) et enfin une famille est présente seulement chez les Bilateria (famille 17).

Les six premières familles peuvent être considérées comme des familles d'enzyme E2 « classiques », et comportent les enzymes humaines UBE2K (famille 1), UBE2A et UBE2B (famille 2), UBE2G1, UBE2G2, UBE2R1 et UBE2R2 (famille 3), UBE2D1, UBE2D2, UBE2D3, UBE2D4, UBE2E1, UBE2E2, UBE2E3 et UBE2U (famille 4), UBE2J1 et UBE2J2 (famille 5), et UBE2H (famille 6).

Les familles 7 à 9 sont particulières car elles codent des enzymes de conjugaison à des ubiquitons. Les protéines de la famille 7, comprenant l'enzyme humaine UBE2I, conjuguent SUMO. Celles de la famille 8, dont les enzymes humaines UBE2F et UBE2M, conjuguent NEDD8. Enfin les protéines de la famille 9, parmi lesquelles les enzymes humaines UBE2N et UBE2NL, sont capables de conjuguer ISG15.

La particularité de la famille 10 est qu'aucune des protéines de cette famille ne possède de cystéine active, et c'est la raison pour laquelle elles ont été nommées « variants d'Ubc » ou UEV. Les enzymes humaines UBE2V1 et UBE2V2 sont membres de cette famille.

Dans les familles 11 et 12, toutes les espèces possèdent un seul orthologue, à l'exception de *C. elegans*, qui ne semble pas comporter de membre identifiable tandis qu'*A. thaliana* possède deux homologues. Les enzymes humaines UBE2S et UBE2C appartiennent respectivement à ces familles 11 et 12.

Les familles 13 à 17 ne possèdent aucun membre dans les deux espèces de levure *S. cerevisiae* et *S. pombe*, avec une particularité supplémentaire pour la famille 17 ne possédant pas de membre chez *A. thaliana*. C'est donc la seule famille spécifique de clade que nous avons été en mesure d'identifier et qui pourrait avoir participé à l'évolution de la lignée des Bilateria. On retrouve ainsi parmi les enzymes humaines UBE2W dans la famille 13, UBE2O, UBE2Z et BIRC6 dans la famille 14, UBE2L3 et UBE2L6 dans la famille 15, FTS dans la famille 16 et UBE2Q et UBE2Q2 dans la famille 17.

Ce travail a aussi pu proposer pour la première fois que l'ancêtre commun des eucaryotes ici étudiés comportait très probablement déjà 18 gènes E2 différents, appartenant à 16 familles. Cela démontre la complexité du système ubiquitine dès le stade eucaryote monocellulaire ancestral il y a 2,1 milliards d'années.

What Was the Set of Ubiquitin and Ubiquitin-Like Conjugating Enzymes in the Eukaryote Common Ancestor?

Caroline Michelle · Patrick Vourc'h ·
Laurence Mignon · Christian R. Andres

Received: 20 October 2008 / Accepted: 17 March 2009 / Published online: 19 May 2009
© The Author(s) 2009. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Ubiquitin (Ub)-conjugating enzymes (E2) are key enzymes in ubiquitination or Ub-like modifications of proteins. We searched for all proteins belonging to the E2 enzyme super-family in seven species (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Arabidopsis thaliana*) to identify families and to reconstruct each family's phylogeny. Our phylogenetic analysis of 207 genes led us to define 17 E2 families, with 37 E2 genes, in the human genome. The subdivision of E2 into four classes did not correspond to the phylogenetic tree. The sequence signature HPN (histidine–proline–asparagine), followed by a tryptophan residue at 16 (up to 29) amino acids, was highly conserved. When present, the active cysteine was found 7 to 8 amino acids from the C-terminal end of HPN. The secondary structures were characterized by a canonical alpha/beta fold. Only family 10 deviated from the common organization because the proteins were devoid of enzymatic activity. Family 7 had an insertion between beta strands 1 and 2; families 3, 5 and 14 had an insertion between the active cysteine and the

conserved tryptophan. The three-dimensional data of these proteins highlight a strong structural conservation of the core domain. Our analysis shows that the primitive eukaryote ancestor possessed a diversified set of E2 enzymes, thus emphasizing the importance of the Ub pathway. This comprehensive overview of E2 enzymes emphasizes the diversity and evolution of this superfamily and helps clarify the nomenclature and true orthologies. A better understanding of the functions of these enzymes is necessary to decipher several human diseases.

Keywords Ubiquitin-conjugating enzymes · Protein superfamily · Phylogeny · *Homo sapiens* · Molecular evolution

Introduction

Ubiquitination is characterized by a rapid and reversible posttranslational covalent fixation of ubiquitin (Ub) onto proteins (Ciechanover 2006). This mechanism, which is part of the specific protein-degradation pathway by the 26S proteasome, plays an important role in targeting proteins as well as intracellular signalling. It has an impact on many cellular functions, such as DNA repair, transcription, signal transduction, endocytosis, and sorting (Welchman et al. 2005).

The ubiquitination of proteins requires three types of enzymes. First, Ub-activating enzymes E1 form a thioester bond with Ub in an adenosine triphosphate-dependent reaction. Second, Ub-conjugating enzymes E2 (or Ubc) carry Ub and transfer it either directly to the substrate protein or to a third type of enzyme, the Ub ligases E3. These latter enzymes facilitate the ligation of Ub to the target protein. The possible intervention of E4 enzymes has

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00239-009-9225-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Michelle · P. Vourc'h · C. R. Andres (✉)
Faculté de Médecine, Génétique de l'Autisme et des Déficiences Mentales, INSERM U930, Université François Rabelais, 10, boulevard Tonnellé, BP 3223, 37032 Tours, France
e-mail: andres@med.univ-tours.fr

P. Vourc'h · C. R. Andres
CHRU de Tours, Tours, France

L. Mignon
Neuroscience Education Institute, Carlsbad, CA, USA

been reported in the formation of polyubiquitin chains of lengths >4 Ub (Koegl et al. 1999). Although polyubiquitination generally signals a protein for degradation by the proteasome, monoubiquitination is mainly involved in signaling itself. Deubiquitination, in contrast, is performed by several deubiquitinating enzymes (Wilkinson 1997).

Ub is a small protein of 76 amino acids and highly conserved in eukaryotes. Ub binds to the target protein by way of an isopeptide link between the C-terminal glycine and a lysine residue of the protein, and it appears that three conserved lysines within Ub are crucial for the formation of polyubiquitin chains. Several proteins similar to Ub (Ub-like [Ubl])—such as SUMO1-2-3, NEDD8-RUB1, ATG8, ATG12-APG12, ISG15, FAU, or URM1—can also be used in similar mechanisms. Proteins tagged by SUMO (small Ub modifier) or NEDD8 are not recognized for degradation; however, they play a role in gene transcription activation, protein localization, and stabilization. Each target–function combination has its own unique combination of E1, E2, and E3 enzymes.

The human genome comprises eight genes encoding E1 Ub and Ubl activating enzymes (Ensembl release 50, July 2008) and four genes encoding the two subunits of the E1 enzyme involved in sumoylation (Supplementary Table 1). E3 enzymes are the most numerous, with probably >1000 members (Pickart 2004). They are the most specific in targeting the proteins for ubiquitination and can be divided into two main groups: RING and HECT (homologous to the E6-AP carboxyl terminus) proteins. However, the catalytic modules of these two families are unrelated in sequence or structure. HECT domain-containing E3 enzymes form intermediate thioesters with Ub at their active site cysteine before transferring Ub to substrates, whereas most RING finger domain-containing E3 enzymes act as scaffolds that bind to E2 enzymes and substrates simultaneously (Özkan et al. 2005).

The general signature motif of the E2 enzyme superfamily is an HPN tripeptide (histidine–proline–asparagine) and an active cysteine residue generally located at the eighth amino acid on the C-terminal side of this canonical motif (Cottee et al. 2006) (Fig. 1). In addition, several domains are highly conserved and may play an important role in the function of these enzymes. For example, the sequence between the H2 helix and L3 loop seems to be the binding site for free or ligated Ub (Winn et al. 2004), whereas a highly conserved N-terminal sequence in the core domain may play a role in the interaction with E1 enzymes. To ascertain a high specificity, Ub binds to the target protein by way of a complex mechanism. Because the small number of E1 enzymes cannot allow for great specificity, the selection of the target protein has to come from the other enzymes. However, little is known about the relation between E2 and E3 enzymes. Although several E2 enzymes

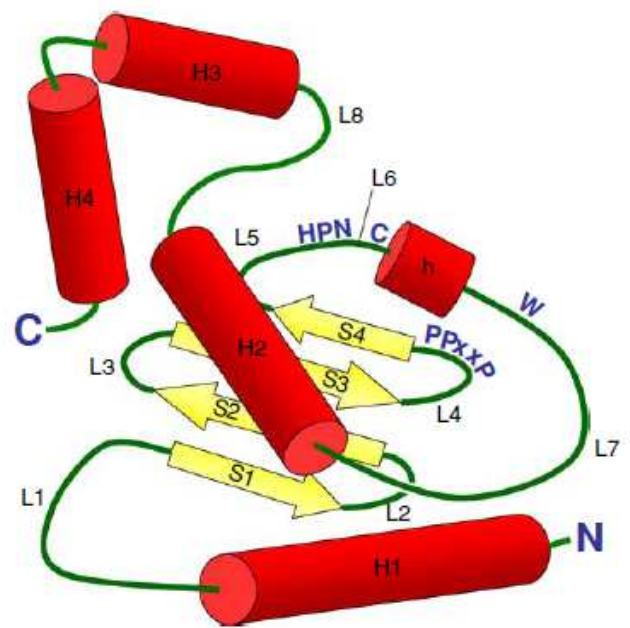


Fig. 1 Explanative structure showing in their 3D context the different residues mentioned in Fig. 6. Loops are labeled L1 to L8; β -strands are labeled S1 to S4; and helices are labeled H1 to H4 (with “h” for the generally conserved 3/10 helix). (Adapted from 3D structure of UBE2D2, PDB source E2SK, and legended from Winn et al. 2004)

can interact with the same E3 enzyme, the converse is true as well: one unique E2 enzyme can work with several E3 enzymes as well RING and HECT enzymes. Abundant structural data exist about the interaction of E2 and E3 proteins, implicating the L4 and L7 loops as key sites of E3 interactions (Winn et al. 2004). However, although certain amino acid positions are clearly identified to play a role as sites for E3 binding, other elements on the E2 surface are required to define the specificity of the interaction of any given E2–E3 pair, such as polar contacts involving side chains in H1 helix of the E2 (Pickart 2001). Even if the phenylalanine in position 63 in the L4 loop is essential for HECT interaction and the tryptophan in position 95 in the L7 loop is necessary for RING interaction, it is the overall three-dimensional (3D) surface and charge that significantly contribute to the specificity of interaction with E3 enzymes (Martinez-Noel et al. 2001). In the same way, different E3 enzymes might have slightly different binding surfaces on a same E2 (Özkan et al. 2005). Moreover, supplementary levels of regulation and specificity are mediated by the intervention of additional proteins.

According to the nature of the E2 enzyme, the type of ubiquitination can be different as well. For example, in yeast, only UBC13 type E2 enzymes are able to form polyubiquitin chains bound on Lys63, and the presence of a Ub-conjugating enzyme variant (UEV) is necessary for this activity (Andersen et al. 2005).

The mechanism of action of the Ubl-conjugating enzymes is thought to be identical to the Ub-conjugating enzymes, with E2 enzymes specific of each Ubl (for example, UBC8 for ISG15, UBC9 for SUMO, UBC12 for NEDD8 in *S. cerevisiae*). However, these Ubl generally form monoconjugates.

Defining the correct orthologs in a large family of proteins is a difficult task. This is particularly true for the E2 superfamily. In humans, the E2 enzyme superfamily has been estimated to be composed of 33 genes (Lorick et al. 2005). Jiang and Beaudet (2004) have suggested the involvement of as many as 50 genes by including UEV, which lack the critical cysteine residue in the catalytic site. Different numbers of genes are estimated to make up the many E2 enzyme families of various species. For example, 13 genes were identified in *Saccharomyces cerevisiae* (Jones et al. 2001), 22 in *Caenorhabditis elegans* (Kipreos 2005), 25 in *Drosophila melanogaster* (Jones et al. 2001), and 37 in *Arabidopsis thaliana* (Kraft et al. 2005). In addition, the nomenclature of E2 enzymes varies between species, with E2 enzymes in humans being named UBE2 followed by a letter, whereas in *S. cerevisiae* they are referenced UBC followed by a number. The numbering of E2 orthologs does not always match between species either.

Several classifications of E2 families have been published (Burroughs et al. 2008; Jones et al. 2001), but no clear consensus has emerged. General trees of the E2 enzyme superfamily have been previously published (Jones et al. 2001; Winn et al. 2004; Melner et al. 2006; Burroughs et al. 2008). However, recent progress in genome sequencing and annotation currently allows for a more comprehensive approach. Although a comprehensive phylogenetic analysis of the E2 enzyme superfamily exists for the *D. melanogaster*, *C. elegans* and *A. thaliana* genomes (Jones et al. 2001; Kipreos 2005; Kraft et al. 2005), no exhaustive analysis has been published for the following species with full genome sequences: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Schizosaccharomyces pombe*, and *S. cerevisiae*. Recently, Burroughs et al. (2008) proposed a general tree of various family members of the E2 superfamily, highlighting their particular structures. However, this study did not analyze the “classical Ubc families” in detail, contained several pseudogenes and redundant sequences, and included very distantly related genes.

To identify the orthologs in this family, we made a careful analysis of several complete genomes judiciously distributed in the tree of life. In the present work, we examined seven species with known complete genome sequences to identify E2 enzyme families and to construct the phylogeny of each family using several phylogenetic methods, with the aim to propose a definition for the E2 enzyme families according to the reconstructed orthologies. Finally, we validated our results on the recent release

of the full genome of the sea anemone (*Nematostella vectensis*) (Putnam et al. 2007). Because dysfunction of the ubiquitination pathway may play an important role in several diseases, it is important to identify the true orthologies of E2 enzymes in model organisms and humans.

Materials and Methods

Identification of E2 Proteins

The list of E2 protein sequences from *C. elegans* and *A. thaliana* was used as an initial set (Jones et al. 2001; Kipreos 2005; Kraft et al. 2005). Homologs were identified in a first step in the other species based on best hits by BLASTP search (blastp program with default parameters) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), with a cutoff score of 10^{-20} . To identify the next set of E2 enzyme homologs, we used sequences obtained in the first step as new queries and ran another BLASTP search using the National Center for Biotechnology (NCBI) server in the genomes of the seven species: *H. sapiens*, *M. musculus*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. pombe*, *S. cerevisiae* and *A. thaliana*. As queries, we used approximately 150 amino acids of the core domain of the proteins. We only kept RefSeq entries containing NP_ in the accession numbers because these proteins were curated manually with experimental support. Redundant sequences and noninformative pseudogenes were eliminated. Each protein sequence was linked to a gene by submission to GenBank on the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

Generation of Sequence Alignments and Definition of E2 Enzyme Families

We aligned all of the full-length protein sequences obtained to identify the E2 core domains of each sequence. Sequences of the core domains were assembled into a single file using the BioEdit multiple sequence editor (Hall 1999). Multiple protein sequence alignment of truncated sequences was performed using ClustalW algorithm incorporating default settings, and the alignment was refined by manual readjustment. Using the core domains, we also generated a specific human tree of all E2 enzyme sequences to obtain easier visualization of the different families. Several proteins were reallocated to families using their similarity score obtained by the NCBI protein–protein BLAST program. Sequence homology was estimated by the PRSS (Perfect Recognition Similarity Scores) program, which computes the statistical significance of the similarity between two sequences (http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=shuffle). Proteins were attributed to a family if the PRSS score was $<10^{-30}$. After

using this approach to assign each protein to a group, we realigned the sequences and reanalyzed the relations within each group using full-length amino acid sequence data.

Phylogenetic Analysis

Aligned sequences were first used to generate matrices of distances between proteins based on the Jones–Taylor–Thornton matrix model, and these matrices were used to generate phylogenetic trees according to the minimum evolution (neighbor-joining [NJ]) algorithm using the Phylip3.65 software package (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Bootstrapping of 1000 replicates was performed according to the method of Felsenstein, whose parameters were set on default, with the addition of an outgroup (an *A. thaliana* gene for the family trees). Phylogenetic trees were visualized and manipulated using TreeView1.6.6 (<http://www.treeview.net/>) and TreeDyn198.3 (<http://www.treedyn.org/>) (Chevenet et al. 2006).

Phylogenetic analyses were performed with the maximum likelihood (ML) method using the Proml program of the Phylip3.65 package, a maximum parsimony (MP) method using the Protpars program of the Phylip3.65 package, and a bayesian inference (BI) method using the MrBayes program (<http://mrbayes.scs.fsu.edu/>). MP and ML methods were used with default parameters. ML calculations were based on the Jones–Taylor–Thornton substitution matrix. Bootstrap support was estimated using 1000 nonparametric replicates for all three methods. For the BI phylogenesis, two simultaneous independent Markov chains were run under Jones' fixed rate model. To compute the family trees, generations were run until the split frequency score was <0.01 by sampling every 10 generations and with a burn-in of 25% of the number of generations. Each phylogenetic algorithm run was replicated once using another bootstrapped set of data to insure convergence of results.

Construction of Phylogenetic Trees

For each algorithm, a consensus tree of the bootstrap results was obtained using the Consense program of the Phylip3.65 package with the majority rule extended-type option. For the BI tree, numbers indicate the clade credibility values, and branches <95% were collapsed. For the other trees, bootstrap values are indicated; branches carrying bootstrap values under a defined threshold (59% for NJ and ML trees and 85% for MP tree) were collapsed. A consensus tree of the four trees obtained with the different algorithms was generated after inspection of the concordance between the various results and using the Consense program of Phylip3.65 package with default parameters and the majority rule extended-type option. Every tree was displayed and

annotated with TreeDyn198.3. Only internodes with significant support in at least three of the analyses were drawn.

Phylogeny of Concatenated Sequences

We selected one ortholog gene from each family in each species. Protein sequences were concatenated in the same order to obtain one sequence per species. This concatenation was used to build a phylogenetic tree of the studied species. The four algorithms were used (NJ, ML, MP, and BI), and the consensus tree was drawn.

Results and Discussion

Inventory of the E2 Enzymes in Seven Species

Our primary goal was to propose a list and classification of the complete set of E2 proteins encoded by the human genome. To obtain a clearer view of the relation and the evolution of this superfamily of proteins, we added several other species with fully sequenced genomes distributed in the tree of life. As the other mammal, we choose the mouse because many transgenic animal studies allow functional evaluations of proteins in this species. *C. elegans* and *D. melanogaster* are two multicellular organisms representative of distantly related lineages with many available functional genomic data. All of these species are members of *Bilateria* in the *Animalia* phylum. Two distantly related yeast species were chosen to evaluate the ancestral set of E2 proteins in eukaryotes, using information from another phylum (*Fungi*). Finally, we used genes from *A. thaliana* as the outgroup to design the phylogenetic trees. Prokaryotic homologs of the E2 enzymes have recently been described in bacteria (Iyer et al. 2006); however, we did not include these too distantly related genes in our study.

We chose to work with proteins rather than nucleotide sequences because mutational noise is less important in amino acid sequences (Inagaki and Roger 2006). Indeed, the fast evolution of nucleotides in the third position of the codons, allowed by the degeneration of the genetic code, produces an accumulation of mutational bias (Jeffroy et al. 2006).

Genbank, Swiss-Prot, TrEMBL (including Pfam and the InterPro database of protein families), Gender and Ensembl were initially used to retrieve a total of 78 RefSeq protein coding sequences in *A. thaliana*, 16 in *S. cerevisiae*, 15 in *S. pombe*, 31 in *C. elegans*, 36 in *D. melanogaster*, 181 in *M. musculus*, and 71 in *H. sapiens*.

We eliminated redundant sequences and pseudogenes as well as sequences for which PRSS scores were <1. This led us to exclude the TSG101-UEVLD family, the UFC1 family, and the Ub conjugation-like ATG3 and ATG10

enzymes. These families may be considered distantly related or converged to similar 3D structures.

Our final list includes 48 E2 protein sequences in *A. thaliana*, 14 in *S. cerevisiae*, 14 in *S. pombe*, 26 in *C. elegans*, 32 in *D. melanogaster*, 36 in *M. musculus*, and 37 in *H. sapiens*. Table 1 and Supplementary Table 2 list all 207 E2 proteins, including their main characteristics, species of origin, chromosomal localization, synonyms, name and length of the corresponding deduced protein, identified homologues, and GenBank accession numbers.

General Features of the E2 Enzyme Families in the Seven Species

In a first step, to identify the main groups of proteins (families) with maximum confidence, we aligned truncated protein sequences to avoid long-branch attractions and to minimize noise from C- and N-terminal extremities. The definition of the central core was arbitrary in its details; however, we verified that small differences in the definition of the core sequences had no influence on the obtained

Table 1 List of the 37 human ubiquitin-conjugating enzymes

Gene	Synonyms	Accession no.	Locus	Protein	Number of amino acids	Family
UBE2K	HIP2, E2-25kDa, HYPG, LIG	NM_005339	4p14	NP_005330	200	1
UBE2A	HR6A	NM_003336	Xq24-q25	NP_003327	152	2
UBE2B	HR6B	NM_003337	5q23-q31	NP_003328	152	2
UBE2G1	E2-17K	NM_003342	17p13.2	NP_003333	170	3
UBE2G2		NM_182688	21q22.3	NP_872630	165	3
UBE2R1	CDC34, E2-32kDa	NM_004359	19p13.3	NP_004350	236	3
UBE2R2	FLJ20419, UBC3B	NM_017811	9p13.3	NP_060281	238	3
UBE2D1	E2(17)KB1, SFT, UBC4/5, UBCH5, UbcH5a	NM_003338	10q11.2-q21	NP_003329	147	4
UBE2D2	E2-17kDa2, UbcH5b	NM_003339	5q31.2	NP_003330	147	4
UBE2D3	E2-17kDa3, UbcH5c	NM_181886	4q24	NP_871615	147	4
UBE2D4	HBUCE1	NM_015983	7p13	NP_057067	147	4
UBE2E1	UBCH6	NM_003341	3p24.2	NP_003332	193	4
UBE2E2	UBCH8	NM_152653	3p24.2	NP_689866	201	4
UBE2E3	UBCH9	NM_182678	2q32.1	NP_872619	207	4
UBE2U		NM_152489	1p31.3	NP_689702	321	4
UBE2J1	NCUBE1	NM_016021	6q15	NP_057105	318	5
UBE2J2	NCUBE2, UBC6p	NM_194315	1p36.33	NP_919296	292	5
UBE2H	UBCH2, E2-20k	NM_003344	7q32	NP_003335	183	6
UBE2I	SUMO1 conjugating enzyme	NM_194259	16p13.3	NP_919235	158	7
UBE2F	NCE2, MGC18120	NM_080678	2q37.3	NP_542409	185	8
UBE2M	NEDD8 conjugating enzyme	NM_003969	19q13.43	NP_003960	183	8
UBE2N		NM_003348	12q22	NP_003339	152	9
UBE2NL	UBE2Nlike	NM_001012989	Xq27.3	NP_001013007	153	9
UBE2T	HSPC150	NM_014176	1q32.1	NP_054895	197	9
UBE2V1	CROC-1, UEV-1, Kua	NM_199203	20q13.2	NP_954673	170	10
UBE2V2	DDVIT1, EDAF-1, EDPF-1, MMS2, UEV-2	NM_003350	8q11.21	NP_003341	145	10
UBE2S	E2-24 kDa, E2-EPF	NM_014501	19q13.43	NP_055316	222	11
UBE2C	UBCH10	NM_007019	20q13.12	NP_008950	179	12
UBE2W		NM_001001481	8q21.11	NP_001001481	162	13
BIRC6		NM_016252	2p22-p21	NP_057336	4829	14
UBE2O	E2-230K	NM_022066	17q25.1	NP_071349	1292	14
UBE2Z	HOYS7	NM_023079	17q21.32	NP_075567	246	14
UBE2L3	UBCH7, L-UBC	NM_003347	22q11.21	NP_003338	154	15
UBE2L6	RIG-B, UBCH8 (homonym E2)	NM_004223	11q12	NP_004214	153	15
FTS	AKTIP	NM_001012398	16q12.2	NP_001012398	293	16
UBE2Q	UBE2Q1, NICE-5	NM_017582	1q21.3	NP_060052	422	17
UBE2Q2	UBCI	NM_173469	15q23	NP_775740	375	17

results (data not shown). In contrast, the large set of studied sequences ($n = 207$) gave a good idea of the general organization of the primary structures of these proteins. Compared with pair-wise alignments, multiple ones allowed for better definitions of orthologous sequences. It was suggested that for distant species, a minimum of 20 sequences needed to be aligned to obtain good results (Margulies et al. 2006). The study of several distantly related species facilitated the recognition of the minimum relations inside the families (the core signatures).

We defined the limits of the superfamily by fixing the PRSS score of protein sequences to be $<10^{-30}$. The alignment of all protein sequences, the global phylogenetic analysis, and the computing of similarity scores showed the existence of 17 subgroups (see Supplementary Figs. 1, 2, and 3), which we named “families.” Others have classified E2 enzyme proteins into 18 groups by splitting family 3 into three groups (XIII, XIV, and XV) and family 4 into two groups (IV and V) while overseeing families 16 and 17 (Jones et al. 2001).

Usual classes of E2 enzymes were defined by the presence or absence of an N and/or C extension. The most frequent class was class 1, containing only the core domain. Among the 17 families, 5 contained >1 class, suggesting that the notion of class generally has no phylogenetic meaning.

A large part of the gene diversity in the different species can be represented by the 14 genes of *S. cerevisiae*. We used the known nomenclature of yeast, or *Caenorhabditis* genes, to classify the families; however, more functional information is necessary to propose a better nomenclature.

All families had at least one member in humans (Fig. 2). Chromosomal locations of each E2 coding gene in the human genome are drawn on the karyotype representation in Supplementary Fig. 4. Figure 3 depicts the distribution of the genes in each family in the 7 species. It is possible to distinguish 4 types of E2 enzyme families, taking into account their species distribution. Ten families are present in all species (families 1 to 10); 2 families are present in all species except *C. elegans* (families 11 and 12); 4 families are only absent in the 2 yeasts (families 13 to 16); and 1 family is present only in *Bilateria* (family 17).

The phylogeny of a family of proteins is important to identify the true homology of proteins (orthology) among different species. Using this information, it is then possible to create a 3D structural model of the candidate proteins and/or to assign biologic functions to them. Studying a large protein superfamily through various species is extremely difficult; therefore, it is no surprise that we found several errors in the ortholog nomenclature in the literature (Supplementary Table 3).

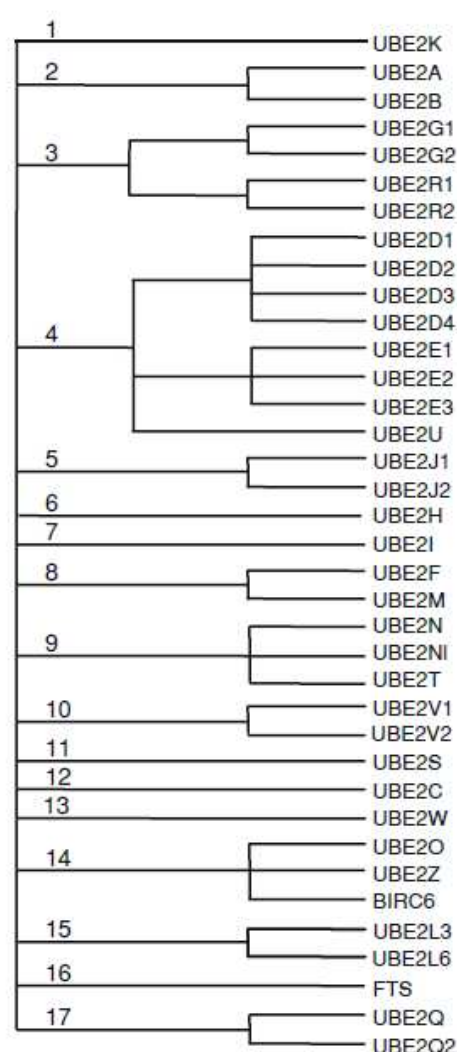


Fig. 2 Simplified phylogenetic tree of the 37 human E2 enzymes drawn after computational analysis, including proteins of seven species, of the phylogenetic tree. Each branch represents a different family, the number of which is located near the root

As mentioned previously, the primary sequence signature HPN, followed by a tryptophan residue at 16 (up to 29) amino acids, is highly conserved. This tryptophan 95 has not been shown to make contact with the HECT or the RING domain. However, the crystal structure analysis of the complexes with E2 and either RING or HECT E3 proteins reveals that the side chain of Trp95 is positioned closely to Pro97 at the tip of loop L7 as well as to Pro65 and Pro66 at the base of loop L4 (Martinez-Noel et al. 2001). Pro65 and Pro66 are found in a motif strongly conserved (Y/FPxxPP) 7 to 11 amino acids from the N-terminal side of the HPN motif. Interaction between Trp95 and the proline residues might stabilize the L7 loop and contribute to the correct positioning of the L4 and L7 loops relative to each other. Ala98 of the L7 loop seems to be

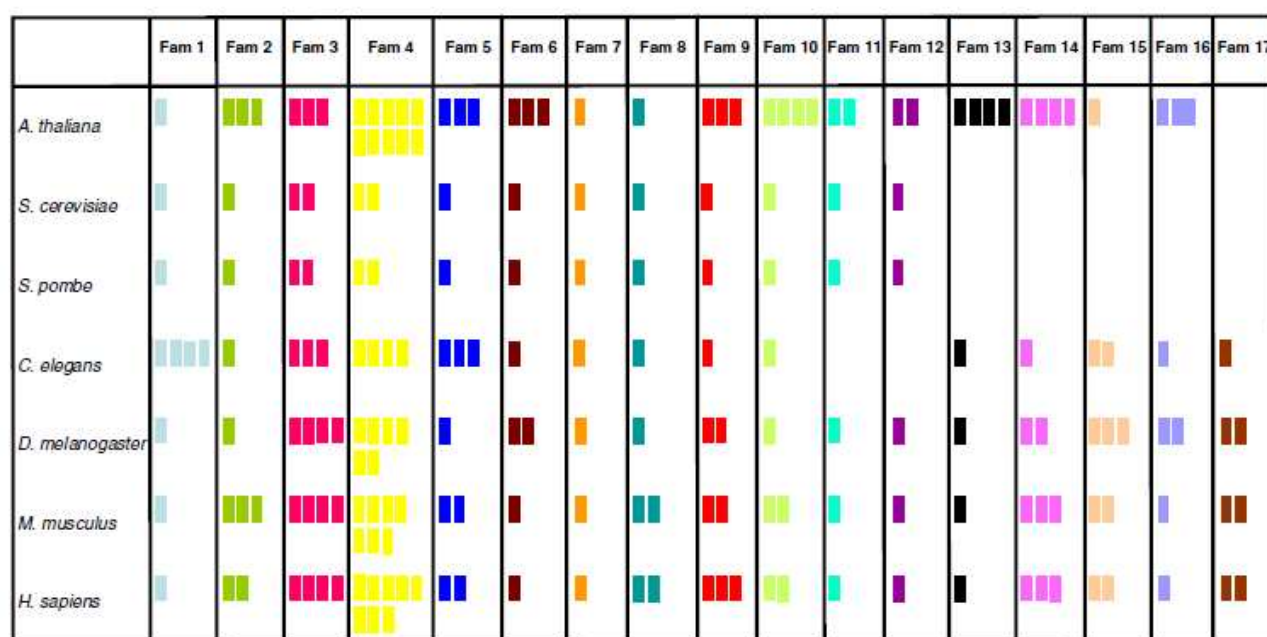


Fig. 3 Species distribution of the 207 E2 genes in each family. Each rectangle represents one gene

important for interaction because it makes direct contact with the HECT or the RING domain; however, it is not necessary and is not conserved (Martinez-Noel et al. 2001).

When present, the active cysteine is found at seven to eight amino acids from the C-terminal side of HPN. The analysis of primary and secondary structures highlights several original features of certain families (see specific results in later text).

3D Structure and Protein Organization

A complete analysis of all known sequences based on comparative modeling is available elsewhere (Winn et al. 2005) and on the following Web site: <http://www.ubiquitin-resource.org>. All known experimental X-ray diffraction crystal 3D structures of E2 enzymes are listed in Supplementary Table 4. Fifteen of 17 families have at least 1 member with known experimental 3D structure, and schematic structures are depicted in Supplementary Fig. 5. The available 3D data of the proteins highlight strong conservation of the structure of the core domain. This information may help to rapidly classify new genes and assign specific functions, such as substrate specificity.

Phylogenetic Analysis for the Classification of E2 Proteins

We used the four main classical algorithms for phylogenetic reconstruction, and the results were mainly coherent. Because one of the four methods gave different results in

several cases, we only kept the results of the three convergent methods. The construction of consensus trees allowed for simple and meaningful representation of these results. However, although only the nodes of the trees were considered meaningful; the time scale or relative evolution speeds of branches were lost with such an approach.

In the next paragraphs, we provide short descriptions and indicate the main characteristics for each family (Fig. 4 and Supplementary Fig. 6), adding some information on known functions, although a complete review on this subject is beyond the scope of the present work. Depending on the cases, the order of the families was chosen according to the numbering order in *S. cerevisiae* or *C. elegans*. Family 10 is an exception and was placed at this position because it belongs to the 10 families with members in all species studied.

The first six families can be considered “classical E2 enzyme” families. The hallmark of family 1 was an important C-terminal ubiquitin-associated (UBA) supplementary domain linked to the core domain by a flexible tether of approximately 20 amino acids. This UBA domain is important for polyubiquitination by allowing binding to a second subunit of Ub. The MP analysis identified *ubc-20_Ce* as the closest *C. elegans* gene to mammals and *Drosophila*, suggesting that this gene was the ortholog of the other genes. In contrast, *ubc-21_Ce*, *ubc-22_Ce*, and *ubc-23_Ce*, diverged and can be considered paralogs.

Family 2 had a classical structure without particularities; however, it can be observed that in both mammals we found two genes, suggesting a duplication of the UBC2

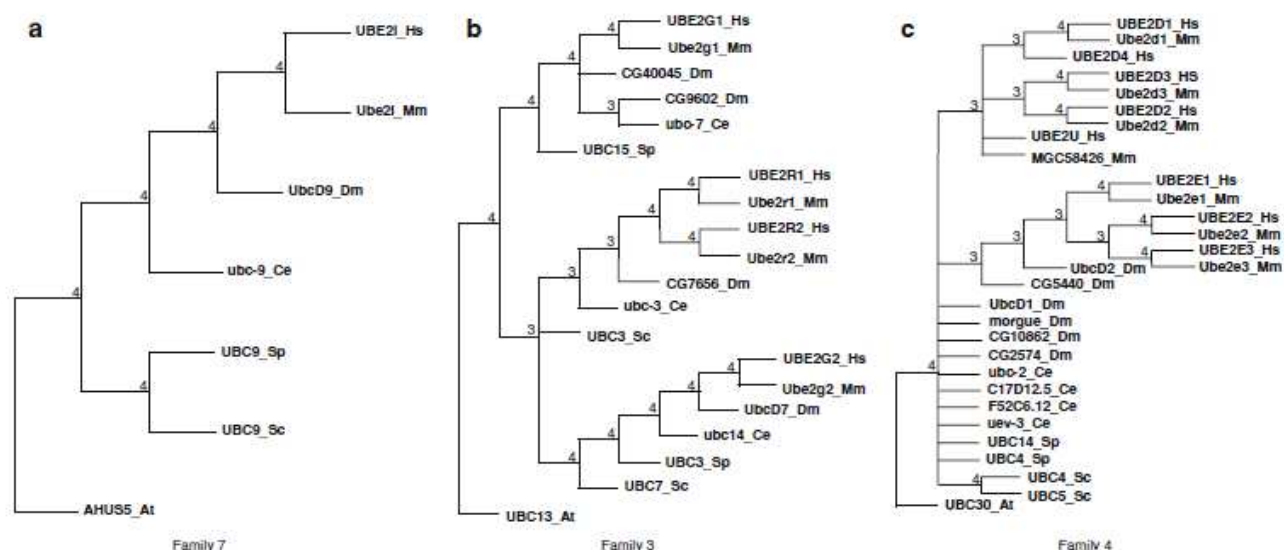


Fig. 4 Examples of phylogenetic trees for “simple” families, such as family 7 (a), and complex families, such as families 3 (b) and 4 (c). Each tree represents the consensus of four algorithms (NJ, ML, MP,

and BI). Only branches present in at least three algorithms are shown, whereas others are collapsed. Numbers indicate the number of algorithms supporting the presence of the node

gene in their common ancestor, whereas mouse had an additional third gene.

Families 3 and 4 are the only families that possessed two members in both yeasts *S. cerevisiae* and *S. pombe*. Family 3 was characterized by two specific regions. One single amino acid insertion altered the orientation of the turn between the first two β -strands in the UBC7_Sc crystalized protein (glutamate 31 in sequence PKSENNIF); however, this glutamate was not conserved in the other members of the family. An insertion of 13 extra residues followed the conserved motif of the active site (HxPGDDPxxxExx) and corresponded to the 3/10 “h” helix. We also identified three subfamilies, each containing different human genes: UBE2G1 (Watanabe et al. 1996), UBE2G2 (Katsanis and Fisher 1998), and two UBE2R (Plon et al. 1993) genes. We obtained different results with the MP analysis compared with other methods, so this tree was excluded in the consensus tree of family 3.

With its 40 members, family 4 was the largest E2 enzyme family, and some members of this family were the most difficult to assign to a particular subfamily. The proline of the HPN signature of the superfamily was not conserved in family 4 and was replaced by a cysteine.

Family 5 missed the canonical tripeptide HPN, which was replaced by TPNGRF or TANGRF. This observation led to the characterization of this family under the NCUBE denomination (*non canonical ubiquitin conjugating enzymes*) (Lester et al. 2000). There was an insertion of two amino acids (aspartate-aromatic) between strand 4 and helix 2 on the C-terminal side of the active cysteine, whose structure was unknown. The orientation of helix 3 and 4

was nonclassical, with this C-terminal extremity corresponding to a hydrophobic transmembrane domain for association with the endoplasmic reticulum. These enzymes had electrostatic potentials that were more similar to the small Ub modifier (SUMO)-conjugating family 7 orthologs (Winn et al. 2007). For this family we obtained discordant results with species of known phylogenetics, although analyses were recomputed several times, changing the order of input sequences and bootstrap values.

In family 6, we found a duplication of the ancestral gene in *D. melanogaster* and probably two duplications of the ancestral gene in *A. thaliana*. All other species possessed only one ortholog gene.

Families 7 to 9 are particular because of the conjugation of Ubl. The proteins in family 7 conjugated SUMO. Like family 3, there were two insertions—one of five residues (positions 32 to 37) between β -strands 1 and 2 and one of two residues near the active cysteine (glu-asp at position -2 and -3 from the conserved tryptophan—rather than asp-lys (Tong et al. 1997)). The N-terminal helix had a nonclassical electrostatic surface, which may be involved in the recognition of SUMO (Giraud et al. 1998). This surface, similar to family 5, was involved in ubiquitination (Winn et al. 2007). We found a duplication of the ancestral gene in *C. elegans*; however, one of these genes diverged greatly and appeared near the root (MP analysis).

The proteins of family 8 conjugated NEDD8-RUB1. Family 8 had a specific N-terminal extension of 26 residues involved in neddylation (VanDemark and Hill 2004), which was not shown on the 3D model (Supplementary Fig. 5). Like family 5, this family was difficult to analyze

because of duplication of the mammalian genes, which seemed to have diverged greatly, creating an apparent subfamily. However, the four mammalian genes appeared at the place most distant from the root in the tree.

The proteins of family 9 conjugated Ub and ISG15. Family 9 had an N-terminal extension not shown in Fig. 4, which may have been involved in recognition of ISG15.

The particularity of family 10 is that no protein had an active cysteine; therefore, they were named “variants of Ubc” or UEV. However, this nomenclature was also used for other proteins that did not belong to this family, such as UEVLD and TSG101. Proteins of family 10 were devoid of enzymatic activity and had no canonical HPN motif. The two last alpha helices were missing.

In families 11 and 12, all species possessed only 1 ortholog gene, except *C. elegans*, which had no identifiable member, whereas *A. thaliana* possessed 2 homologs. Family 12 possessed a specific N-terminal supplementary domain (not shown in Supplementary Fig. 5). For this family, analyses were run several times; however, each time we obtained unexpected results. This was likely caused by the fact that the *D. melanogaster* gene was anchored near the root and that the genes of yeast and mammals diverged. This suggests that the *Drosophila* gene evolved rapidly because this lineage separated. A Blast search for homologs of these two families lost in *C. elegans* was run in the 31 whole-sequenced species of nematodes using NemaBLAST (<http://www.nematode.net/BLAST/>). No member was found except for family 11, for which UBE2S_Hs seemed to have high homology with the XI04817 gene from *Xiphinema index* (e value $8.8e^{-51}$). This species belonged to an early clade of the Nematode group (Blaxter et al. 1998), which would indicate that the genes of these 2 families were lost successively during the evolution of Nematodes.

The loss of four families in yeast does not appear to be phylum specific because genes of families 13 to 16 were present in other species belonging to the *Fungi* phylum (*Candida albicans*, *Yarrowia lipolytica*, *Aspergillus terreus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *Coccidioides immitis*, *Neurospora crassa*, *Gibberella zeae*, *Magnaporthe grisea*, and *Chaetomium globosum*). This raises the question of the general relevance of the two yeasts as models in the study of E2 enzyme mechanisms. The missing gene families may be replaced on a functional level by genes obtained from duplications in other families because no organism that we analyzed had <14 E2 enzyme genes.

Families 13 to 17 possessed no member in both yeast species *S. cerevisiae* and *S. pombe*. In family 13, in the absence of an asparagine residue in the tripeptide HPH, the enzymes of this family should have had no catalytic activity (Wu et al. 2003). A supplementary domain was

present at the N-terminus (RLQKEL and GAPGTLYxyE, x = A or E and y = G or N).

Family 14 had no available 3D structure. There was an insertion of seven amino acids between the active cysteine and the conserved tryptophan, containing the conserved sequence TWxG and corresponding to a small “h” helix. These enzymes had an N-terminal extension.

Family 15 had no evident structural particularity. These enzymes were known to conjugate Ub and ISG15 (Zhao et al. 2004).

Family 16 had no known 3D structure, and we found no evident consensus primary sequence. Only one *A. thaliana* and the *C. elegans* orthologs had an active cysteine. RCE1 from *A. thaliana* was a RUB1-NEDD8-conjugating enzyme.

Family 17 lacked any member in both yeasts *S. cerevisiae* and *S. pombe* and in *A. thaliana*. This family had a particular orientation of helix 4 and 3. Strangely, there was no HPN motif in any but the human UBE2Q2 sequence. There is a large extension at the N-terminal extremity not shown in Fig. 4. Family 17 is present only in *Bilateria* and probably evolved from one of the initial ancestral genes; however, the phylogenetic information was lost in our set of species. This family was the only clade-specific family that we were able to identify and may have participated in the evolution of the *Bilateria* lineage. Further analysis of other species may narrow the precise period of the apparition of this family.

The 10 families present in all species may correspond to the minimal number of initial genes in the ancestors of eukaryotes. However, it is more probable that the common ancestor of all 3 phyla already possessed a set of 18 ancestral genes in 16 families, given the fact that *A. thaliana* possessed genes of 16 families. *C. elegans* lost 2 families (family 11 and 12), and yeasts lost 4 families (families 13 to 16). The genome of *A. thaliana* was the richest in E2 enzyme genes, indicating the importance of this pathway in plants. Several events of genome duplications were at the origin of this rich set of UBC genes in the lineage of *Arabidopsis* (Adams and Wendel 2005). A schematic representation of this discussion is proposed in Fig. 5.

The general tree of all proteins (Supplementary Fig. 3) illustrates that we cannot describe the relations between the different families with high confidence. Although more information could be gained by adding species from several other clades, it is also possible that the phylogenetic information contained in the primary sequences has been lost once and for all because of the long evolution of E2 genes in the common ancestors of all eukaryotes. Identification of specific primary sequence signatures or spatial signatures may possibly aid in distinguishing

Fig. 5 General summary of the evolution hypothesis of the E2 enzyme families

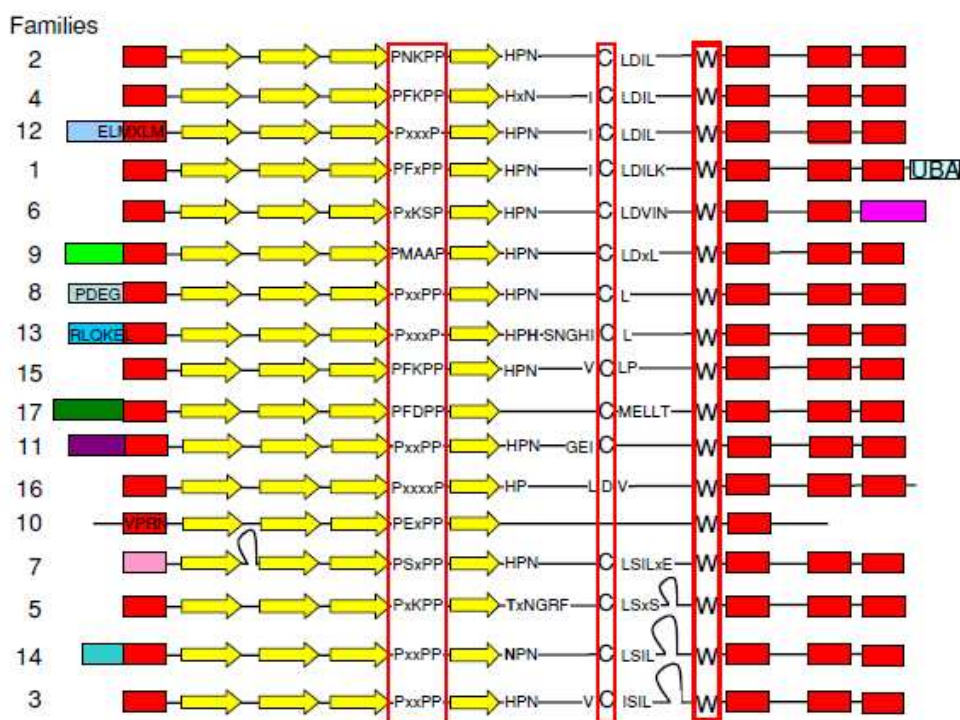
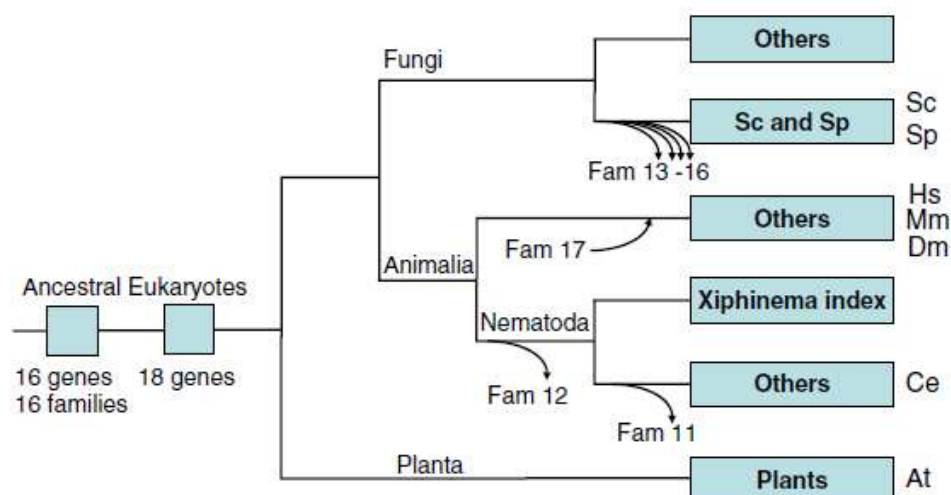


Fig. 6 Schematic of primary and secondary structures summarizing the hallmarks of the 17 E2 enzyme families. Alpha helices are represented by rectangles; β -strands are represented by arrows; and several consensus sequences are highlighted. UBA = UBA domain at

the C-terminus in family 1. Family-specific insertions are illustrated by loops. The PxxPP sequence, the active cysteine, and the conserved tryptophan are boxed

subgroups of families, such as the “ICLDIL” subgroup (see Fig. 6 for a summary of hallmarks of all families).

Although our definition of families was pragmatic, a biologic significance of such a classification can be determined. The timescale, however, was clearly not the significance. First, the subdivisions inside families 3 and 4 were anterior to the separation between the *Animalia* and

Fungi phyla, a separation estimated to have taken place 1.3 billion years ago (Feng and Doolittle 1997). Second, the unique family specific to *Bilateria* organisms represented a late “invention” because the separation of *Bilateria* from other organisms has been estimated to have occurred 615 million years ago (Peterson et al. 2004). Therefore, the proposed classification more probably represents strong

Table 2 List of protein sequences used for concatenation in the studied species

Family	At	Sc	Sp	Ce	Dm	Mm	Hs
1	UBC27	UBC1	UBC1	ubc-20	UbcD4	Ube2k	UBE2K
2	UBC1	UBC2	UBC2	ubc-1	UbcD6	Ube2a	UBE2A
3	UBC13	UBC7	UBC3	ubc-14	UbcD7	Ube2g2	UBE2G2
4	UBC30	UBC4	UBC4	ubc-20	UbcD1	Ube2d1	UBE2D1
5	UBC33	UBC6	UBC6	ubc-26	CG5823	Ube2j2	UBE2J2
6	UBC5	UBC8	UBC8	ubc-8	Ubc-E2H	Ube2h	UBE2H
7	AHUS5	UBC9	UBC9	ubc-9	UbcD9	Ube2i	UBE2I
8	RCE2	UBC12	UBC12	ubc-12	CG7375	Ube2m	UBE2M
9	UBC36	UBC13	UBC13	ubc-13	UbcD3	Ube2n	UBE2N
10	MMZ3	MMS2	SPM2	uev-1	Uev1A	Ube2v1	UBE2V1
Total amino acid length	1487	1803	1713	1768	1721	1746	2002

selective functional pressures rather than real evolution time.

A functional significance that we could expect from a protein classification would be information about interactions with the protein partners evolving in parallel, such as the E3 enzymes. Unfortunately, available sequence information does not allow the drawing of a general picture. In fact, nothing is known about E3 interaction for families 13, 16, and 17. Only families 3, 4, 8, 11, and 15 are known to interact with an HECT E3, and no clear common sequence signature emerges in these families. Allosteric communication between the E3-binding and E2 active site relies on a complex structural unit formed by a large network of coevolving residues instead of a linear pathway consisting of a small set of residues (Özkan et al. 2005).

The topology of the family trees was generally coherent with known phylogenetic data; however, the family 5 tree was quite complex. It may be proposed that a duplication of the ancestral gene occurred in *Bilateria* and that one of these duplicated genes (ubc-26_Ce) may have strongly diverged in *C. elegans*. Ubc-26_Ce probably belonged to subfamily UBEJ2_Hs because subfamily UBE2J1_Hs already included two homolog genes, and subfamily UBE2J2_Hs was devoid of any homolog. Ubc-6_Ce and ubc-15_Ce were probably duplications in the *C. elegans* lineage in the UBEJ2_Hs subfamily, whereas the UBE2J1_Hs ortholog of *Drosophila* must have been lost because the nearest gene in *Drosophila* was CG5823_Dm, which was an ortholog of UBE2J2_Hs (e value $6.e^{-31}$ by way of blastp).

UEV proteins are as old as E2 proteins (Villalobo et al. 2002). Family 10 is a good example because it contains several UEV proteins that have been highly conserved in eukaryotes, from Protists to Humans (Andersen et al. 2005). Other families also contain several other UEV proteins; e.g., uev-3_Ce belongs to family 4, but uev-2_Ce is not an ortholog of the human UEV2-UBE2V2. The

human UEV3-UEVLD and TSG101 proteins belong to another distant family and therefore were not included in our study, exemplifying that UEV proteins are a polyphyletic heterogeneous group.

Phylogeny of the Species

We found only 10 ortholog genes present in all 7 species (listed in Table 2). These 10 well-defined sequences were concatenated and used to build a phylogenetic tree (Supplementary Fig. 7). Although the use of many genes in concatenation does not guarantee a tree representative of the true historic evolution (Jeffroy et al. 2006), our analysis of this concatenated set allowed for a clear definition of the clades obtained by molecular and morphologic approaches. However, phylogenetic information of this subset of genes was not sufficient to distinguish the precise branching order of *Caenorhabditis* and *Drosophila*, underlining the difficulty of this analysis (Blair et al. 2002; Dopazo and Dopazo 2005). Five families have a *D. melanogaster* gene closer to the mammals' gene than the *C. elegans* member, whereas only 3 families have a *C. elegans* gene closer to the mammals' genes. Taking a simple majority rule, this is in accordance with the most recent results placing insects nearest to mammals (Wolf et al. 2004). Our results also confirmed that the majority of *C. elegans* genes evolved more rapidly than their *Drosophila* counterparts (Mushegian et al. 1998).

Application of our Classification on the Nematostella Genome

There are 46 sequences on the Web site of the *Nematostella* genome that are identified as Ubc proteins (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/ToGo?accession=GO:0004840&species=Nemvel1&model=1&batchId=34>). Among them, 4 sequences (Nemvel:1191, Nemvel:2031, Nemvel:2043, and

Nemve1:2091) have PRSS scores too low to be considered true Ubc members. Furthermore, no known Ubc motif is detectable by inspection in the sequence of these proteins. Using Human or *S. cerevisiae* core sequences as queries, a Blast search yielded 43 *Nematostella* sequences, the previous 42 “true” genes and a supplementary sequence (Nemve1:152221), which probably corresponds to a pseudogene (C-terminal end of the protein) or a partially identified gene homologous to Nemve1:158438. Inspection of the alignment of these protein sequences with the 207 sequences of our previous set confirmed that most of these sequences matched perfectly the consensus sequences of the defined families. Several families contained genes that evolved more rapidly and that were less clearly characterized (for example Nemve1:169077 belongs to family 5 but lacks the active cysteine, or Nemve1:85975 belongs to family 7 but has an insertion of 3 amino acids before the active site). This analysis confirms the usefulness of our classification and the richness of the genome of this deeply rooted multicellular organism.

Conclusion

This work attempts to clarify the nomenclature and the orthologies of E2 proteins. We focused on seven well-known species with sequenced whole genomes. This analysis highlights the particularities of each species, which are important when searching for functions and orthologs in animal models. While in this study, we found that two families were lost in *C. elegans* and four families in the yeast species, we also “discovered” a family specific of the kingdom Animalia. The classification we propose should serve as an initial platform, and requires the analysis of additional species to obtain a general view of the E2 enzymes in eukaryotes. Further investigations are warranted and will need to focus on searching for E2 enzyme partners, including the interacting E3 proteins, and defining the precise substrates of each E1-E2-E3 enzyme association (Ub or Ubl and proteins). By defining the role of the Ub-conjugating enzymes in human, it will become possible to understand their implication in various diseases. Abnormal production or regulation of some E2 enzymes has been increasingly connected to diseases of the central nervous system as well as to cancer development. Improving the understanding of the E2 enzyme families in normal and pathologic situations could lead to the development of novel drugs targeting specific E2 enzymes.

Acknowledgments We thank Thierry Moreau (INSERM U618, Tours) for helpful discussion as we do for the following for financial support: the Ministère de la Recherche for supporting CM; INSERM; University François Rabelais; and Lions Club Jardin de France.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

- Adams KL, Wendel JF (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8:135–141
- Andersen P, Zhou H, Pastushok L, Moraes T, McKenna S, Ziola B, Ellison M, Dixit V, Xiao W (2005) Distinct regulation of Ubc13 functions by the two ubiquitin-conjugating enzyme variants Mms2 and Uev1A. *J Cell Biol* 170:745–755
- Blair JE, Ike K, Gojobori T, Hedges SB (2002) The evolutionary position of nematodes. *BMC Evol Biol* 2:7
- Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM et al (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392:71–75
- Burroughs AM, Jaffee M, Iyer LM, Aravind L (2008) Anatomy of the E2 ligase fold: Implications for enzymology and evolution of ubiquitin/Ubl-like protein conjugation. *J Struct Biol* 162:205–218
- Chevenet F, Brun C, Bañuls A, Jacq B, Christen R (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinform* 7:439
- Ciechanover A (2006) The ubiquitin proteolytic system: From a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting. *Neurology* 66(Suppl):S7–S19
- Cottee PA, Abs El-osta YG, Nisbet AJ, Gasser RB (2006) Ubiquitin-conjugating enzyme genes in *Oesophagostomum dentatum*. *Parasitol Res* 99:119–125
- Dopazo H, Dopazo J (2005) Genome-scale evidence of the nematode-arthropod clade. *Genome Biol* 6:R41
- Feng DF, Doolittle RF (1997) Converting amino acid alignment scores into measures of evolutionary time: a simulation study of various relationships. *J Mol Evol* 44:361–370
- Giraud MF, Desterro JM, Naismith JH (1998) Structure of ubiquitin-conjugating enzyme 9 displays significant differences with other ubiquitin-conjugating enzymes which may reflect its specificity for sumo rather than ubiquitin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54:891–898
- Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95–98
- Inagaki Y, Roger AJ (2006) Phylogenetic estimation under codon models can be biased by codon usage heterogeneity. *Mol Phylogenet Evol* 40:428–434
- Iyer LM, Burroughs AM, Aravind L (2006) The prokaryotic antecedents of the ubiquitin-signaling system and the early evolution of ubiquitin-like beta-grasp domains. *Genome Biol* 7:R60
- Jeffroy O, Brinkmann H, Delsuc F, Philippe H (2006) Phylogenomics: The beginning of incongruence? *Trends Genet* 22:225–231
- Jiang YH, Beaudet AL (2004) Human disorders of ubiquitination and proteasomal degradation. *Curr Opin Pediatr* 16:419–426
- Jones D, Crowe E, Stevens TA, Candido EP (2001) Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: Ubiquitin-conjugating enzymes, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins. *Genome Biol* 3:research0002.1–research0002.15 [epub]
- Katsanis N, Fisher EM (1998) Identification, expression, and chromosomal localization of ubiquitin conjugating enzyme 7 (UBE2G2), a human homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* ubc7 gene. *Genomics* 51:128–131

- Kipreos ET (2005) *C. elegans* cell cycles: Invariance and stem cell divisions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:766–776
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96:635–644
- Kraft E, Stone S, Ma L, Su N, Gao Y, Lau O, Deng X, Callis J (2005) Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139:1597–1611
- Lester D, Farquharson C, Russell G, Houston B (2000) Identification of a family of noncanonical ubiquitin-conjugating enzymes structurally related to yeast UBC6. *Biochem Biophys Res Commun* 269:474–480
- Lorick KL, Jensen JP, Weissman AM (2005) Expression, purification, and properties of the Ubc4/5 family of E2 enzymes. *Methods Enzymol* 398:54–68
- Margulies EH, Chen CW, Green ED (2006) Differences between pairwise and multi-sequence alignment methods affect vertebrate genome comparisons. *Trends Genet* 22:187–193
- Martinez-Noel G, Müller U, Harbers K (2001) Identification of molecular determinants required for interaction of ubiquitin-conjugating enzymes and RING finger proteins. *Eur J Biochem* 268:5912–5919
- Melner MH, Haas AL, Klein JM, Brash AR, Boeglin WE, Nagdas SK, Winfrey VP, Olson GE (2006) Demonstration of ubiquitin thioester formation of UBE2Q2 (UBCi), a novel ubiquitin-conjugating enzyme with implantation site-specific expression. *Biol Reprod* 75:395–406
- Mushegian AR, Garey JR, Martin J, Liu LX (1998) Large-scale taxonomic profiling of eukaryotic model organisms: A comparison of orthologous proteins encoded by the human, fly, nematode, and yeast genomes. *Genome Res* 8:590–598
- Özkan E, Yu H, Deisenhofer J (2005) Mechanistic insight into the allosteric activation of a ubiquitin-conjugating enzyme by RING-type ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18890–18895
- Peterson KJ, Lyons JB, Nowak KS, Takacs CM, Wargo MJ, McPeck MA (2004) Estimating metazoan divergence times with a molecular clock. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6536–6541
- Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination [review]. *Annu Rev Biochem* 70:503–533
- Pickart CM (2004) Back to the future with ubiquitin. *Cell* 116:181–190
- Plon SE, Leppig KA, Do HN, Groudine M (1993) Cloning of the human homolog of the CDC34 cell cycle gene by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10484–10488
- Putnam NH, Srivastava M, Hellsten U, Dirks B, Chapman J, Salamov A, Terry A, Shapiro H, Lindquist E, Kapitonov VV et al (2007) Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* 317(5834):86–94
- Tong H, Hateboer G, Perrakis A, Bernards R, Sixma TK (1997) Crystal structure of murine/human Ubc9 provides insight into the variability of the ubiquitin-conjugating system. *J Biol Chem* 272:21381–21387
- VanDemark AP, Hill CP (2004) Grabbing E2 by the tail. *Nat Struct Mol Biol* 11:908–909
- Villalobo E, Morin L, Moch C, Lescasse R, Hanna M, Xiao W, Baroin-Tourancheau A (2002) A homologue of CROC-1 in a ciliated protist (*Sterkiella histriomuscorum*) testifies to the ancient origin of the ubiquitin-conjugating enzyme variant family. *Mol Biol Evol* 19:39–48
- Watanabe TK, Kawai A, Fujiwara T, Maekawa H, Hirai Y, Nakamura Y, Takahashi E (1996) Molecular cloning of UBE2G, encoding a human skeletal muscle-specific ubiquitin-conjugating enzyme homologous to UBC7 of *C. elegans*. *Cytogenet Cell Genet* 74:146–148
- Welchman R, Gordon C, Mayer J (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:599–609
- Wilkinson K (1997) Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J* 11:1245–1256
- Winn PJ, Religa TL, Battey JN, Banerjee A, Wade RC (2004) Determinants of functionality in the ubiquitin conjugating enzyme family. *Structure* 12:1563–1574
- Winn PJ, Battey JN, Schleinkofer K, Banerjee A, Wade RC (2005) Issues in high-throughput comparative modelling: A case study using the ubiquitin E2 conjugating enzymes. *Proteins* 58:367–375
- Winn PJ, Zahran M, Battey JN, Zhou Y, Wade RC, Banerjee A (2007) Structural and electrostatic properties of ubiquitination and related pathways. *Front Biosci* 12:3419–3430
- Wolf YI, Rogozin IB, Koonin EV (2004) Coelomata and not Ecdysozoa: Evidence from genome-wide phylogenetic analysis. *Genome Res* 14:29–36
- Wu PY, Hanlon M, Eddins M, Tsui C, Rogers RS, Jensen JP, Matunis MJ, Weissman AM, Wolberger C, Pickart CM (2003) A conserved catalytic residue in the ubiquitin-conjugating enzyme family. *EMBO J* 22:5241–5250
- Zhao C, Beaudenon SL, Kelley ML, Waddell MB, Yan W, Shulman BA, Huibregtse JM, Krug RM (2004) The ubcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN- α/β -induced ubiquitin-like protein. *PNAS* 101:7578–7582

Choix des gènes candidats de la superfamille des E2 dans l'autisme

Un travail bibliographique a par la suite été mené pour rechercher toutes les fonctions connues d'enzymes de conjugaison à l'ubiquitine chez différentes espèces. Grâce au travail phylogénétique préalable, certaines fonctions intéressantes ont ainsi pu être attribuées à des familles, pour lesquelles les enzymes de conjugaison humaines devenaient des candidats prioritaires dans notre étude.

C'est ainsi que six enzymes de conjugaison à l'ubiquitine humaines ont été sélectionnées pour mener une étude de recherche de mutation, suivie chaque fois que possible d'une étude d'association.

	Locus du gène	Protein Accession	Taille protéine (aa)	Nombre d'isoformes		Famille phylo-génétique	Expression dans le cerveau	Argument majeur
				PubMed	Ensembl			
UBE2A	Xq24	P49459	152	3	4	2	Oui (homme)	Muté dans une DM liée à l'X
UBE2E3	2q31.3*	Q969T4	207	2	11	4	Oui (homme)	Situé à 242 kb du point de cassure d'un autiste
UBE2H	7q32*	P62256	183	2	6	6	Oui (homme, souris)	Associé avec l'autisme
UBE2I	16p13.3*	P6279	158	4	8	7	Oui (homme, rat)	Régulation potentielle de la différenciation des CSN et de la plasticité neuronale
UBE2K	4p14	P61086	200	3	4	1	Oui (homme, rat, souris)	Implication dans la maladie de Huntington
UBE2N	12q22	P61088	152	1	2	9	Oui (homme, rat, drosophile)	Homologue de Ben impliqué dans le guidage axonal et la plasticité neuronale

Tableau 7 : Synthèse des informations concernant les enzymes de conjugaison à l'ubiquitine sélectionnées comme candidats dans l'autisme (* région chromosomique directement liée aux syndromes autistiques)

Voici tout d'abord une présentation globale de ces gènes (schémas réalisés par Agathe Paubel). Sur les figures, les chiffres indiquent le numéro des exons.

UBE2H

UBE2H est un gène codant une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine localisé sur le chromosome 7 en position 7q32 et situé à seulement 270 kb du marqueur D7S530 lié aux syndromes autistiques (IMGSAC, 1998). *UBE2H* se compose de sept exons, et comprend une séquence génomique de presque 120 kb.

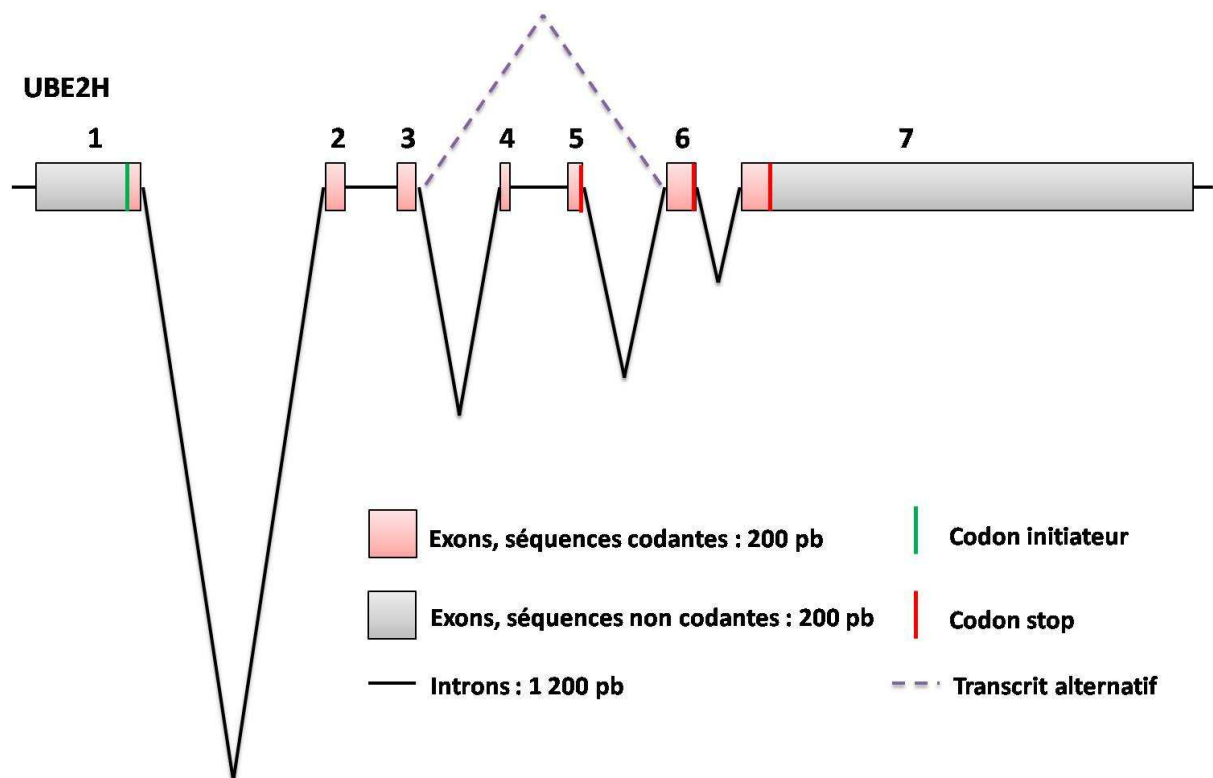


Figure 13 : Schéma du gène *UBE2H*

La protéine UBE2H catalyse la fixation covalente de l'ubiquitine à des protéines cibles pour la dégradation sélective par le protéasome 26S (Kaiser *et al.*, 1994). Cette enzyme, qui appartient à la famille 6 de notre phylogénie, est un homologue de l'enzyme UBC8 de la levure *S. cerevisiae*. UBE2H est en fait composée de deux domaines fonctionnellement indépendants, comprenant une partie N-terminale présentant des fonctions de conjugaison à l'ubiquitine classiques, et un domaine C-terminal qui interagit avec les substrats (Kaiser *et al.*, 1995). L'équipe de Kaiser fut d'ailleurs la première à décrire le schéma complexe

d'expression d'UBE2H avec l'identification d'au moins cinq transcrits alternatifs dans le placenta humain (Kaiser *et al.*, 1994). Notre équipe a par la suite pu démontrer une expression d'*UBE2H* dans les cerveaux humains et murins (Vourc'h *et al.*, 2003). UBE2H est également constitutivement exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaques humains, dans les muscles des membres murins, et dans les myotubes en culture (Li *et al.*, 2003). Son expression est d'ailleurs augmentée dans le muscle par le TNF-alpha (Li *et al.*, 2003).

Malgré sa présence à proximité du gène *MEST* qui est l'un des gènes humains soumis à empreinte parentale, *UBE2H* présente une expression biallélique et n'est pas concerné par le mécanisme d'empreinte (Yamada *et al.*, 2004).

UBE2H est connue pour agir sur les histones et les protéines du cytosquelette. Il a ainsi été démontré *in vivo* qu'UBE2H était capable d'ubiquitinyler les histones H2A de façon E3 indépendante (Kaiser *et al.*, 1994).

Cette protéine est impliquée dans différentes fonctions. UBE2H a ainsi pu être impliquée dans la différenciation érythrocytaire (Wefes *et al.*, 1995). L'accumulation à des concentrations élevées de certaines E2 dont UBE2H est spécifique du cancer du sein, au contraire aucun changement quantitatif n'a pu être détecté dans des extraits de tissus de cancer du côlon primaire (Chen et Madura, 2005). UBE2H a été également tout récemment fortement impliquée dans l'étiologie du carcinome hépatocellulaire (Keng *et al.*, 2009). Enfin compte tenu de son emplacement physique et de sa fonction, l'implication d'*UBE2H* a été étudiée par notre équipe dans la pathologie autistique et une association a pu être mise en évidence avec un polymorphisme silencieux de l'exon 6 d'*UBE2H* (Vourc'h *et al.*, 2003). En revanche aucune association n'a pu être établie entre *UBE2H* et la sclérose latéral amyotrophique (Martin *et al.*, 2008).

A la vue de ces résultats il nous paraissait nécessaire d'approfondir l'étude d'*UBE2H*, tant sur le plan génétique que fonctionnel.

UBE2A

Le gène *UBE2A*, aussi nommé *hHR6A*, est un gène codant une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine localisé sur le chromosome X en Xq24 et dont la séquence génomique s'étend sur moins de 10 kb.

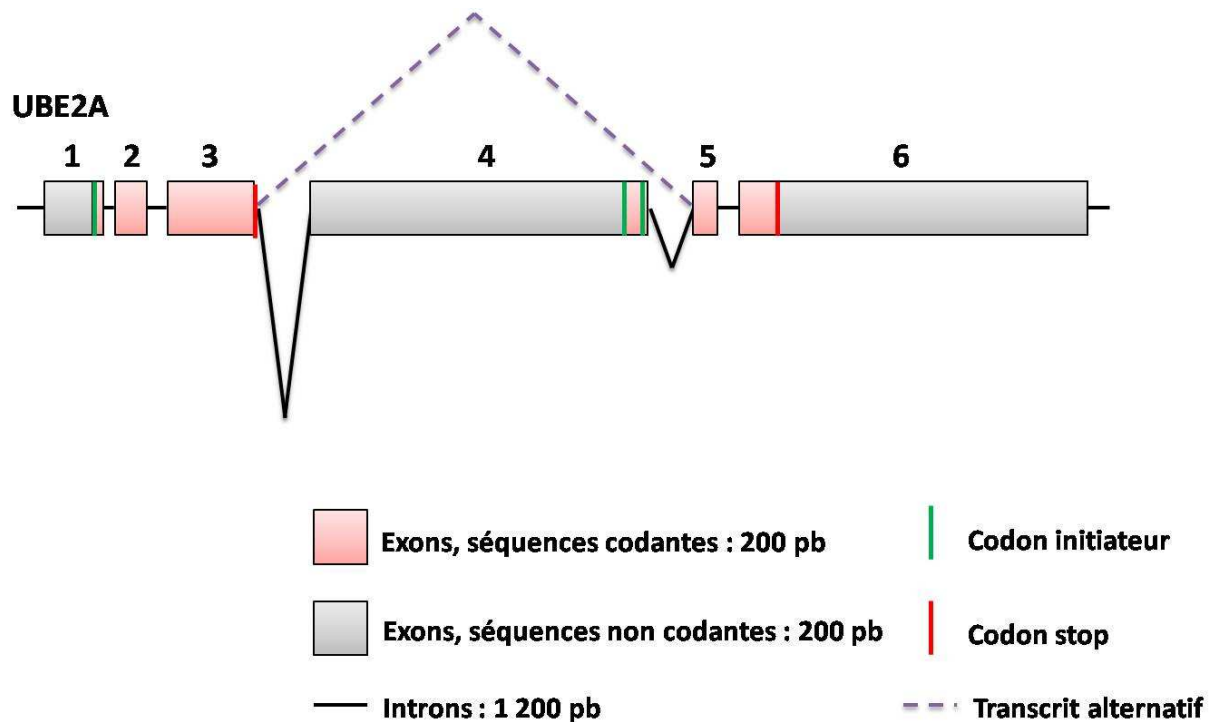


Figure 14 : Schéma du gène *UBE2A*

Au même titre qu'UBE2B, UBE2A est un homologue humain de l'enzyme de levure RAD6 (Koken *et al.*, 1991). UBE2A et UBE2B sont des protéines à multiples fonctions, avec une activité de conjugaison de l'ubiquitine et un rôle essentiel dans la réparation post-réplication de l'ADN (Baarends *et al.*, 2000 ; Xin *et al.*, 2000). UBE2A est régulée par la phosphorylation médiée par les CDK. *In vivo*, la phosphorylation d'UBE2A présente un pic durant la phase G2/M de transition du cycle cellulaire, avec une augmentation concomitante de l'ubiquitinylation de l'histone H2B. Des études chez *S. cerevisiae* ont démontré que la Ser120 de UBE2A est critique pour la prolifération cellulaire. La mutation de la Ser120 en thréonine ou alanine supprime l'activité d'UBE2A, tandis que la mutation en aspartate mimant une sérine phosphorylée augmente de 3 fois l'activité d'UBE2A (Sarcevic *et al.*, 2002).

La forte conservation des séquences protéiques d'UBE2A et d'UBE2B soulève la question de la spécificité fonctionnelle ou de la redondance de ces protéines, qui sont exprimées de façon ubiquiste, bien que les rapports quantitatifs entre ces protéines varient sensiblement dans les différentes cellules et tissus (Koken *et al.*, 1996). Le fait que les souris déficientes à la fois en Ube2a et Ube2b ne soient pas viables indique que ces gènes sont essentiels pour le développement, et il a été démontré que la viabilité dépendait de la présence d'au moins un

des deux homologues (Roest *et al.*, 2004). Les femelles déficientes en Ube2a ne parviennent pas à engendrer une progéniture en dépit d'une ovulation normale ; l'absence de la protéine Ube2a dans les ovocytes empêche le développement embryonnaire (Roest *et al.*, 2004).

Dans le domaine neurologique, des études ont été menées sur l'impact d'UBE2A sur la formation des agrégats polyglutamine, sujet particulièrement intéressant dans la mesure où l'on sait que ce type d'agrégat est formé dans divers types de pathologies neurodégénératives. Dans les cellules HEK293, l'invalidation d'UBE2A a entraîné une diminution de la taille moyenne des agrégats, une augmentation du nombre de cellules présentant des agrégats et un pourcentage plus élevé de cellules présentant plusieurs agrégats (Howard *et al.*, 2001).

Dans un autre domaine, la diminution de l'ARNm d'UBE2B dans les cellules PC12 conduit à une réduction de la longueur des neurites induites par le NGF, et l'inhibition pharmacologique de la dégradation protéique dépendante de l'ubiquitine réduirait de façon significative la longueur et la ramification des axones de neurones sensoriels adultes *in vitro* (Kavakebi *et al.*, 2005).

Enfin il a surtout été mis en évidence que le gène *UBE2A* est muté dans un syndrome de déficience mentale liée à l'X (Nascimento *et al.*, 2006). La mutation d'*UBE2A* décrite est la première implication d'un gène d'une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine dans une maladie humaine, conduisant à des anomalies neurologiques. Les mutations d'*UBE2A* peuvent être exclusivement à l'origine d'un nouveau syndrome de déficience mentale décrit par l'équipe de Nascimento, ou pourraient également provoquer différents tableaux cliniques, y compris la déficience mentale non syndromique, comme pour d'autres gènes impliqués dans la déficience mentale liée à l'X (Kleefstra et Hamel, 2005). L'incapacité à détecter des mutations d'*UBE2A* dans 19 familles présentant des cas idiopathiques de déficience mentale liée à l'X suggère que les mutations d'*UBE2A* ne semblerait pas une cause commune de déficience mentale liée à l'X, même si l'étude ne concernait qu'un faible échantillon et que ce résultat doit donc être confirmé (Nascimento *et al.*, 2006).

UBE2N

UBE2N est un gène localisé sur le chromosome 12 en position 12q22 sur une distance génomique de près de 34 kb, et qui comporte quatre exons codant la protéine UBE2N de 152

acides aminés (17 kDa) également appelée Ubc13 ou hUbc13 dans la littérature en raison de sa forte homologie avec l'enzyme de conjugaison Ubc13 de la levure *S. cerevisiae*.

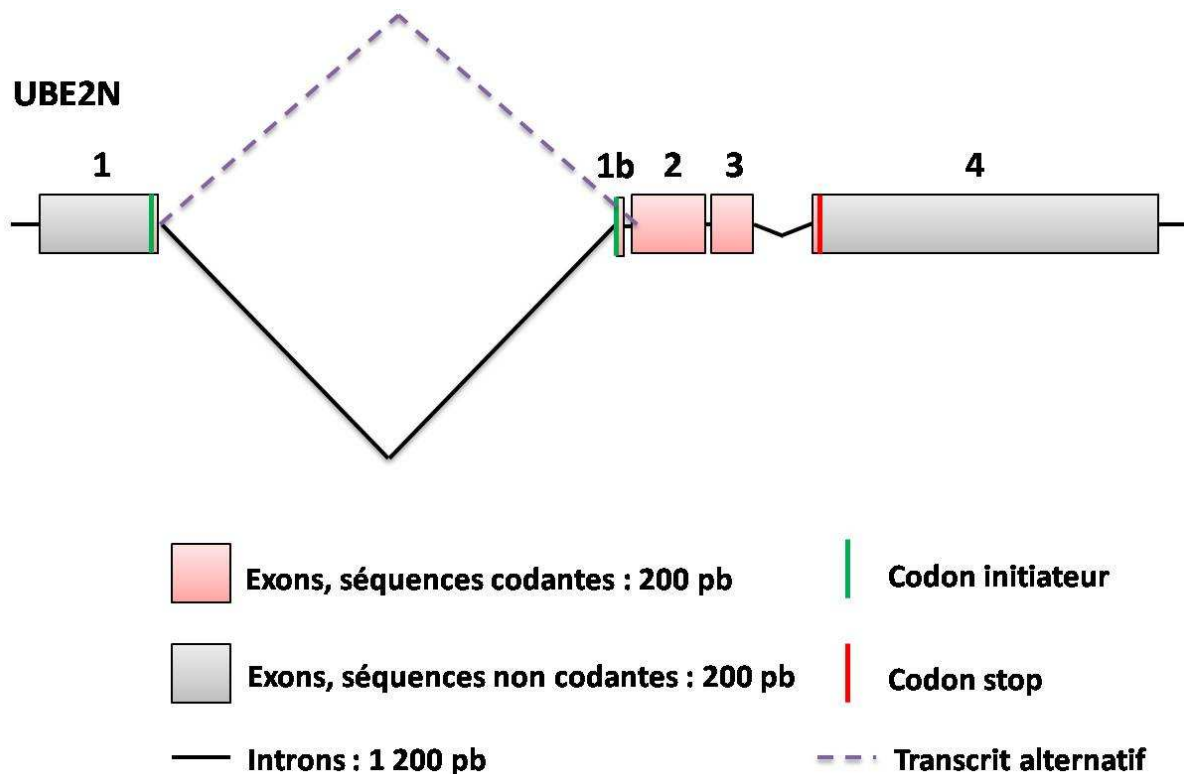


Figure 15 : Schéma du gène *UBE2N*

UBE2N est une enzyme E2 exceptionnelle pour la conjugaison de l'ubiquitine dans la mesure où elle forme un hétérodimère en se liant par une grande interface hydrophobe avec UBE2V2, qui est un paralogue catalytiquement inactif appartenant à la catégorie des UEV (Hofmann et Pickart, 1999 ; Pastushok *et al.*, 2005). Cet hétérodimère constitue un cœur catalytique permettant la synthèse d'un type particulier de chaîne polyubiquitine où les molécules d'ubiquitine sont liées les unes aux autres par un pont isopeptidique en lysine 63 (McKenna *et al.*, 2003). En attachant une molécule d'ubiquitine et en positionnant sa lysine 63 près de la cystéine du site actif d'UBE2N, UBE2V2 favorise la synthèse de chaînes d'ubiquitines liées en lysine 63 (Hofmann et Pickart, 1999 ; Hofmann et Pickart, 2001 ; VanDemark *et al.*, 2001 ; Moraes *et al.*, 2001).

Contrairement à la chaîne polyubiquitine liée en lysine 48, signal de dégradation protéique par le protéasome, cette chaîne polyubiquitine liée en lysine 63 est associée à une signalisation jouant un rôle dans la réponse au stress cellulaire, dans la réparation de l'ADN et l'activation

des kinases I κ B (Sun et Chen, 2004 ; Hoege *et al.*, 2002 ; Deng *et al.*, 2000). UBE2N est ainsi un élément clé dans le processus de marquage des protéines cibles par des chaînes polyubiquitines liées par leurs lysines 63.

TRAF6 est une protéine E3 à domaine RING capable d'interagir avec UBE2N dans le but de catalyser la synthèse de ces chaînes polyubiquitines uniques liées entre elles par la lysine 63 de l'ubiquitine. Par cette interaction avec TRAF6, une fonction essentielle d'UBE2N concerne la régulation de la cascade I- κ B kinase/NF- κ B ; ce type de marquage sur des protéines essentielles pour la transmission des signaux des récepteurs immunitaires aboutit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Cao *et al.*, 1996 ; Ishida *et al.*, 1996 ; Deng *et al.*, 2000).

Une autre protéine à domaine RING, RNF8, recrute également UBE2N, mais pour permettre son auto-polyubiquitinylation sur la lysine 63 (Plans *et al.*, 2006). Une autre possibilité de régulation du fonctionnement d'UBE2N est sa modification covalente sur sa lysine 92 par ISG15 qui perturbe sa capacité à former des ponts thioester avec l'ubiquitine (Takeuchi et Yokosawa, 2005 ; Zou *et al.*, 2005).

La délétion conditionnelle d'UBE2N provoque un développement défectueux des cellules B et un défaut d'activation des macrophages et des cellules B, tout comme une forte diminution de la fréquence des lymphocytes T dans la rate des souris déficientes en UBE2N (Yamamoto *et al.*, 2006), confirmant une implication d'UBE2N au sein des mécanismes immunitaires.

UBE2N joue également un rôle dans l'activation de la transcription des gènes cibles dans le cycle cellulaire car il a pu être démontré qu'elle interagissait avec STK15, kinase régulatrice du cycle cellulaire impliquée dans la formation des microtubules et dans la stabilisation aux pôles de la cellule lors de la ségrégation des chromosomes et se trouvant dans les centrosomes des cellules en interphase et à l'axe des pôles lors de la mitose (Ewart-Toland *et al.*, 2003).

UBE2N interviendrait aussi dans la réparation de l'ADN. En réponse aux lésions de l'ADN, UBE2N n'est plus capable de faciliter la monomérisation de p53, en partie en raison d'une baisse de ses propres concentrations, qui sont dépendantes de p53 (Laine *et al.*, 2006). UBE2N semble donc impliquée dans l'apoptose via la régulation de la stabilité de p53 par l'ubiquitine (Tan *et al.*, 2000).

UBE2N est exprimée dans la plupart des tissus et en particulier dans le système nerveux. Son expression a été très précisément étudiée chez le rat par l'équipe de Watanabe qui a démontré qu'elle variait au cours du développement dans le cerveau, avec une expression minimale au stade embryonnaire et au début de la phase post-natale, puis augmentait pour finalement aboutir à une expression modérée dans le cerveau adulte (Watanabe *et al.*, 2007).

Un des premiers résultats qui a souligné le fait que le système ubiquitine pouvait jouer un rôle dans la régulation de la connexion neuronale est venu de l'analyse du mutant *bendless* (*ben*) de la drosophile. Le gène *ben* a été identifié il y a près de 30 ans lors d'un criblage comportemental suite à des défauts du système de la fibre géante qui entraînait une altération de la réponse d'échappement (Thomas et Wyman, 1982). Le clonage de *ben* a conduit à son identification en tant qu'enzyme de conjugaison E2 à l'ubiquitine (Muralidhar et Thomas, 1993 ; Oh *et al.*, 1994). Or UBE2N présente une homologie de 80 % avec la protéine Bendless de la drosophile, et notre étude de phylogénèse a identifié clairement UBE2N comme orthologue de Bendless.

On a initialement considéré que Bendless pouvait jouer un rôle important soit dans le guidage axonal soit dans la reconnaissance de la cible. La mutation de *ben* affecte en particulier la synapse entre la fibre géante et un motoneurone : l'axone de la fibre géante ne parvient pas à effectuer la courbure (« bend ») latérale (Thomas et Wyman, 1984) en direction de sa cible musculaire, ce qui a pour effet de supprimer le réflexe de saut en réponse à l'extinction d'une source lumineuse (disparition du comportement de fuite). Des phénotypes supplémentaires ont également été observés dans les muscles thoraciques (Edgecomb *et al.*, 1993) et dans le système visuel (Muralidhar et Thomas, 1993 ; Oh *et al.*, 1994).

Il a par la suite été montré que Ben joue également un rôle important dans la croissance et la maturation synaptique (Uthaman *et al.*, 2008). La vision actuelle concernant la formation des synapses est que la synapse native peut être rapidement assemblée à partir de matériaux présents dans un cône de croissance dans des vésicules (Roos et Kelly, 2000 ; Ziv et Garner, 2004). Après ce premier assemblage rapide d'un début de synapse, une seconde croissance et une maturation plus lente se produisent pour permettre la formation d'une synapse mature stable. Ben serait un régulateur dont la fonction est requise pour l'initiation d'un processus secondaire dans la croissance présynaptique, et l'absence de Bendless ne permettrait la formation que d'une synapse naissante qui ne parvient pas à croître et à mûrir (Uthaman *et al.*, 2008).

UBE2N a déjà été impliquée dans une pathologie neurologique puisqu'une diminution significative de son expression a pu être mise en évidence dans le cortex préfrontal dorsolatéral de patients schizophrènes (Vawter *et al.*, 2002), comparativement à une population contrôle. Chez l'homme, la fonction d'UBE2N dans le SNC est toutefois encore inconnue.

De par sa particularité à former liaison avec l'ubiquitine par l'intermédiaire des lysines 63 n'aboutissant pas à un adressage au protéasome, et en raison de sa très forte homologie avec Bendless qui suggère des fonctions similaires sur le développement neuronal, le guidage axonal et la croissance et la maturation synaptique, *UBE2N* apparaît comme un candidat de choix dans l'étude d'une pathologie neurodéveloppementale telle que l'autisme.

UBE2I

Le gène *UBE2I* a été identifié pour la première fois en 1996 et a été cartographié sur la bande chromosomique 16p13.3 par FISH (Watanabe *et al.*, 1996). Sa séquence génomique s'étend sur 16,2 kb. L'ADNc de l'UBE2I humaine (ou hUBC9), contient un cadre de lecture ouvert de 474 nucléotides codant 158 acides aminés. Sept transcrits ont pu être décrits chez l'homme selon Ensembl, seulement quatre pour NCBI.

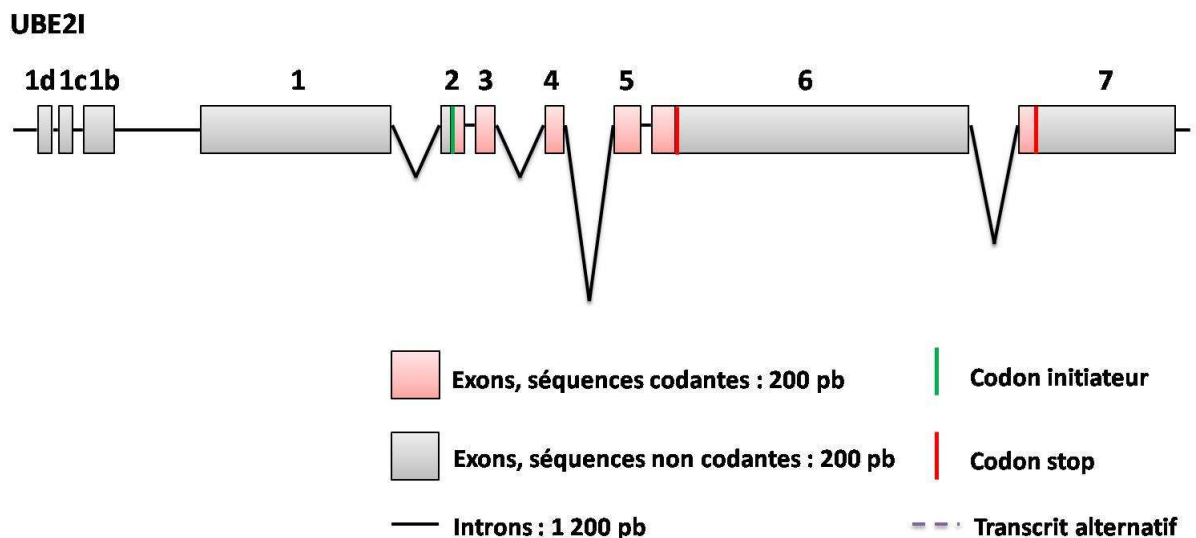


Figure 16 : Schéma du gène *UBE2I*

Initialement considérée comme une enzyme de conjugaison de l'ubiquitinylation, UBE2I a par la suite été impliquée dans la conjugaison de SUMO (small ubiquitin-related modifier), ou

sumoylation (Desterro *et al.*, 1997). UBE2I exerce une fonction centrale dans la voie de sumoylation, interagissant avec presque tous les partenaires nécessaires pour la sumoylation.

UBE2I est ainsi capable d'interagir avec Rad52, Rad51, p53, et une protéine ubiquitin-like Ubl1, ce qui suggère que les processus dépendant de Rad52, le contrôle du cycle cellulaire, les voies de p53, et l'ubiquitinylation, interagissent par le biais d'UBE2I (Shen *et al.*, 1996). Ces interactions sont spécifiques à UBE2I, dans la mesure où une autre enzyme de conjugaison à l'ubiquitine impliquée dans la réparation de l'ADN, UBE2A, n'interagit pas avec ces protéines. De même la régulation transcriptionnelle par CtBP agirait non seulement par modification des histones, mais aussi par sumoylation des facteurs de transcription via le recrutement d'UBE2I et d'une SUMO E3 ligase HPC2 (Chinnadurai, 2007).

UBE2I semble être étroitement liée à la progression de la phase G2 à M du cycle cellulaire (Watanabe *et al.*, 1996), en participant au mécanisme de dégradation des cyclines en phase S et M et au contrôle de la mitose. Dans les cellules épithéliales mammaires de souris, la diminution d'Ube2i semblerait jouer un rôle dans l'augmentation de la stabilité des protéines inhibitrices du cycle cellulaire (Katayama *et al.*, 2003).

UBE2I a ainsi été largement étudiée en cancérogénèse. Étant donné que de nombreuses protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, l'apoptose et la réparation de l'ADN sont des cibles pour la sumoylation, les modifications de sumoylation pourraient finalement avoir un impact sur la croissance cellulaire, le développement du cancer et la réponse aux médicaments. Dans la mesure où UBE2I est la seule enzyme de conjugaison E2 requise pour la sumoylation, et, en particulier, puisqu'UBE2I est surexprimée dans un grand nombre de tumeurs malignes humaines, telles que le carcinome ovarien, le mélanome et l'adénocarcinome du poumon, elle est une cible potentielle pour la thérapie du cancer (Mo et Moschos, 2005).

C'est ainsi que l'équipe de Shiratori *et al.*, a mis en évidence une plus grande sensibilité des cellules fibroblastiques de souris surexprimant un variant particulier d'UBE2I à des médicaments anticancéreux tels que la vincristine, la mitoxantrone et de l'étoposide. L'analyse du profil de chimiosensibilité a montré qu'UBE2I est fonctionnellement liée à RPA2 (replication protein A2), Rho-GDI (Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor a), FUS (putative tumor suppressor) et TKT (transketolase), et négativement corrélée à Per-1 (period-I), Ran (nuclear Ras-related protein), PTEN (phosphatase and tensin homolog),

C/EBPa (CCAAT/enhancer binding protein a) et au suppresseur de tumeur p53. Il est donc possible qu'UBE2I joue un rôle dans la cancérogenèse en supprimant la fonction de C/EBPa et/ou de p53 par activité RPA2-like (Shiratori *et al.*, 2007).

Les études neurodéveloppementales sur UBE2I sont récentes. L'expression d'UBE2I a ainsi été étudiée pendant le développement cérébral chez le rat aux niveaux de l'ARNm et des protéines (Watanabe *et al.*, 2008). Les analyses ont révélé que l'expression d'UBE2I et de SUMO1 sont régulées au cours du développement, contrairement à d'autres enzymes de conjugaison à l'ubiquitine. Les analyses d'hybridation *in situ* ont révélé que l'expression d'UBE2I est élevée dans des cellules souches neuronales et modérée dans les neurones différenciés au stade embryonnaire. Dans le cerveau adulte, l'expression modérée a été observée dans des sous-ensembles de neurones, tels que les neurones de la couche granulaire du gyrus denté et les neurones pyramidaux dans la formation hippocampique, et les grands neurones pyramidaux du cortex cérébral. Ces résultats suggèrent que le système UBE2I-SUMO pourrait participer à la prolifération et la différenciation des cellules neuronales dans le cerveau en développement et dans la plasticité neuronale dans le cerveau adulte.

UBE2I est situé dans une région génomique intéressante dans le cadre de l'étude sur son implication potentielle dans l'autisme, dans la mesure où non seulement il se trouve dans la zone p-ter du chromosome 16 dupliquée chez un autiste présentant également des signes du syndrome de Tourette (Hebebrand *et al.*, 1994) et transloquée chez un autre (t(4;6)(q24;p13.3), Gilling *et al.*, 2003), mais qu'en plus il n'est distant que de 700 kb du gène *TSC2* qui a été associé à l'autisme en 2003 (Serajee *et al.*, 2003). De même, *UBE2I* est localisé à seulement 763 kb du marqueur D16S3252 associé à l'autisme (Risch *et al.*, 1999), ce qui vient renforcer l'idée d'une zone d'étude particulièrement intéressante dans le cadre de notre recherche de gènes impliqués dans l'étiologie du syndrome autistique.

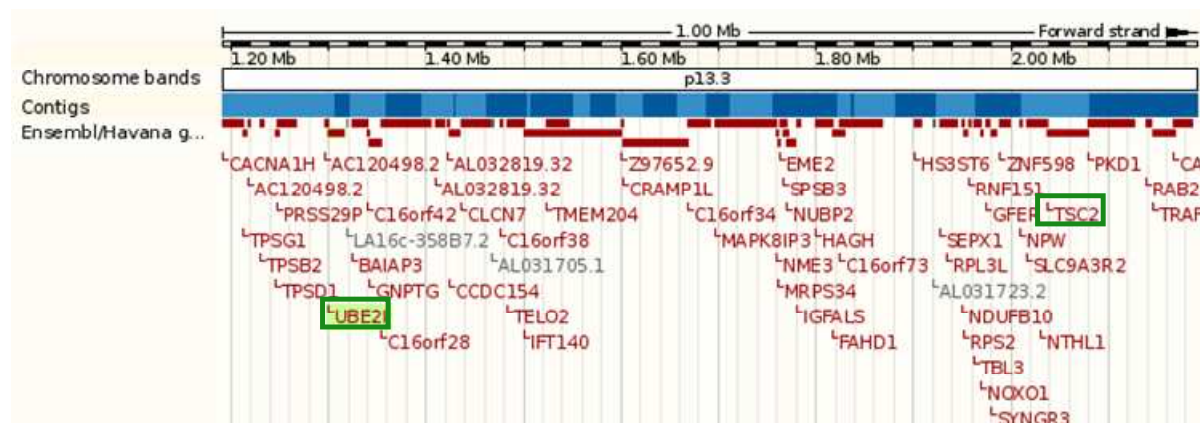


Figure 17 : Environnement génomique du gène *UBE2I*
(D'après Ensembl version 56)

UBE2K

Le gène *UBE2K*, localisé en 4p14, est aussi nommé *HIP-2* (pour Huntingtin-interacting protein 2) ou *E2-25K*. Sa séquence génomique s'étend sur près de 85 kb.

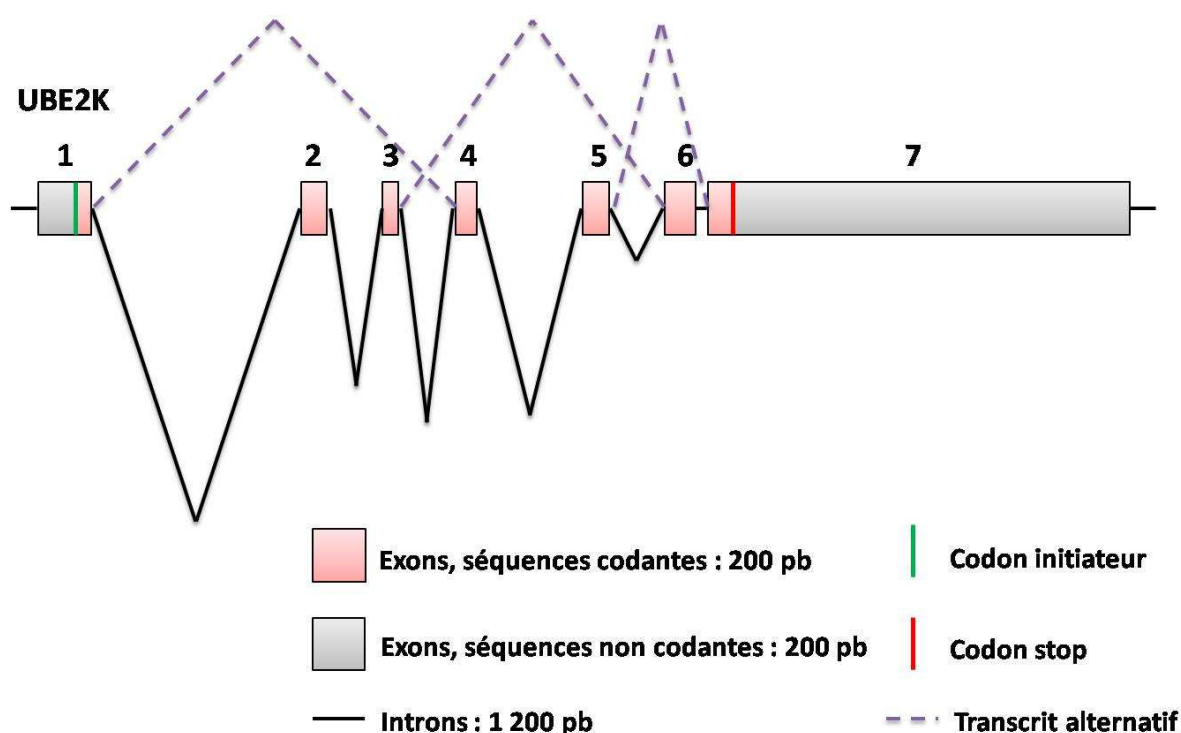


Figure 18 : Schéma du gène *UBE2K*

L'enzyme UBE2K est exprimée dans toutes les aires du cerveau, avec une expression plus importante en particulier dans le striatum et le cortex frontal (Kalchman *et al.*, 1996) ; elle interagit directement avec la protéine huntingtine (protéine clé dans la maladie de Huntington), et est essentiellement connue pour son rôle dans l'ubiquitinylation des inclusions intranucléaires neuronales dans la maladie de Huntington.

UBE2K interagit également avec les protéines à domaine RING finger, et notamment avec RNF2, une ubiquitine ligase E3 qui permet la monoubiquitinylation de l'histone H2A sur sa lysine 119, jouant ainsi un rôle central dans remodelage de la chromatine et la modification des histones et donc dans la régulation des gènes par répression transcriptionnelle épigénétique et inactivation du chromosome X maternel chez les mammifères.

UBE2K est directement impliquée dans la formation des agrégats de protéines polyglutaminées (Howard *et al.*, 2007), et dans la mort cellulaire induite par la polygluamine (de Pril *et al.*, 2007). Elle aurait également un rôle dans la séparation des chaînes lourdes du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I issues du réticulum endoplasmique nouvellement synthétisées, et pourrait intervenir dans l'apoptose des macrophages via l'ubiquitinylation et la dégradation subséquente de p53.

Enfin UBE2K pourrait être responsable de la toxicité de l'amyloïde bêta, la principale protéine impliquée dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer, par activation des réponses au stress du réticulum endoplasmique et de la caspase-12 suite à la neurotoxicité de l'amyloïde bêta, dans la mesure où des expériences ont pu montrer que des neurones corticaux en culture déficients en UBE2K ne présentaient plus de réponse au stress du réticulum endoplasmique induit par l'amyloïde bêta, et devenaient ainsi résistants à la toxicité de l'amyloïde bêta (Song *et al.*, 2008).

La protéine UBE2K comporte un domaine UBA en plus de son domaine UBC, et ces deux domaines semblent capables d'interagir entre eux (Wilson *et al.*, 2009). Il a par ailleurs été récemment montré qu'UBE2K pouvait être sumoylée (Pichler *et al.*, 2005), empêchant la formation de chaînes polyubiquitines par perturbation de l'interaction avec l'enzyme d'activation E1.

UBE2K est donc une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine déjà fortement impliquée dans une maladie neurologique par son interaction avec la protéine huntingtine, et pourrait donc jouer également un rôle dans l'étiologie du syndrome autistique.

UBE2E3

Le gène *UBE2E3* est localisé en 2q31.3 et a été cloné à partir d'une banque d'ADNc d'un adénocarcinome humain (Ito *et al.*, 1999) ; *UBE2E3* s'exprime fortement dans le muscle squelettique (Ito *et al.*, 1999). *UBE2E3* fait partie des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine les plus « classiques », appartenant à notre quatrième famille phylogénétique.

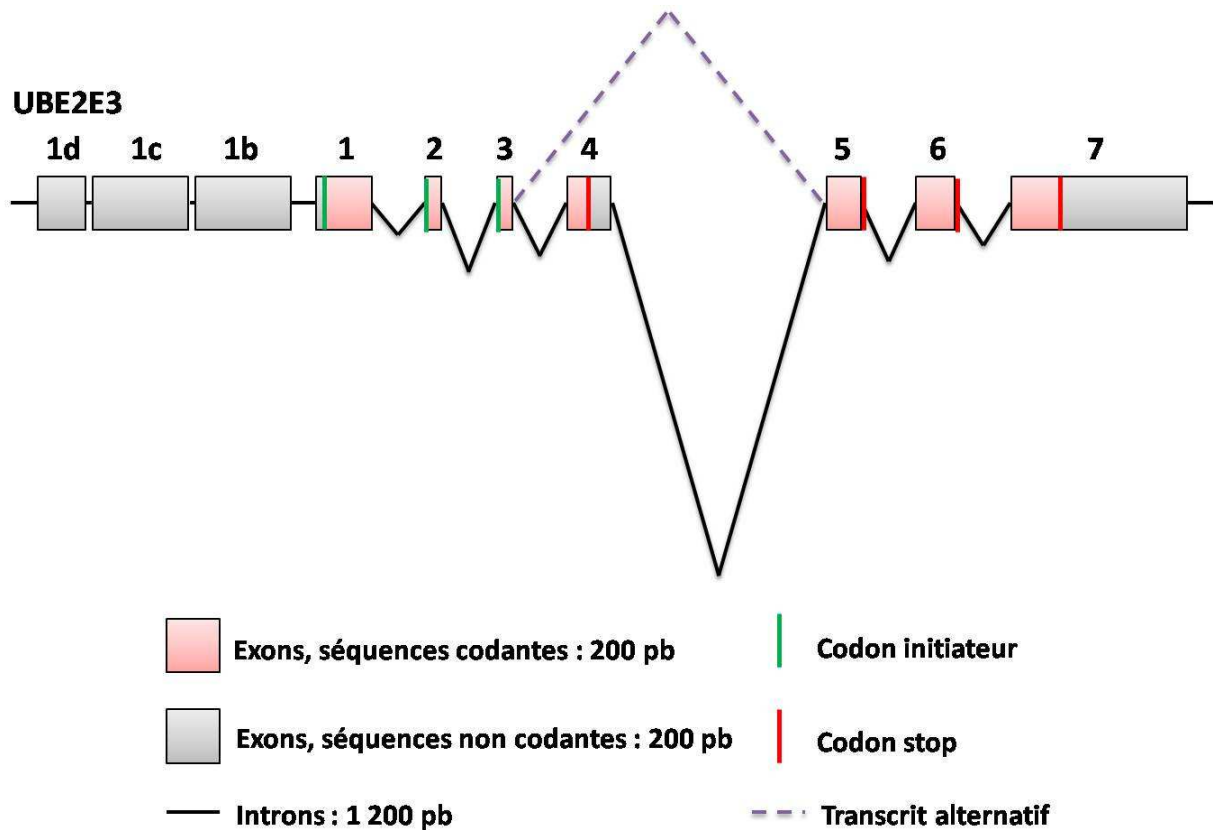


Figure 19 : Schéma du gène *UBE2E3*

UBE2E3 est assez peu connue et très peu étudiée. L'enzyme *UBE2E3* est capable d'interagir avec deux protéines à domaine RING, ARA54 (un co-activateur du récepteur androgène) et RNF8, mais les fonctions biologiques ne sont pas connues (Ito *et al.*, 2001).

De par son interaction avec Nedd4-2, *UBE2E3* réduirait l'activité des canaux sodiques épithéliaux dans les ovocytes de *Xenopus laevis* (Debonneville et Staub, 2004).

On sait également qu'UBE2E3 est une enzyme clé dans la modulation de l'équilibre entre la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales pigmentaires rétinienne (Plafker *et al.*, 2008).

Plusieurs groupes ont identifié des associations entre l'autisme et une large zone du chromosome 2q, suggérant un ou plusieurs gènes de prédisposition à l'autisme dans la région 2q. Tout récemment une translocation *de novo* 46, XY, ins(9,2)(q31.1;q32.2-q31.3) a même pu être observée chez un patient atteint d'autisme de haut niveau (Conroy *et al.*, 2009). Le point de cassure 2q centromérique est localisé entre les gènes *KIAA1604* (ou *CWC22*) et *UBE2E3* sur une région d'environ 1 Mb pauvre en gènes. Ce point de cassure est situé à 242 kb de l'extrémité 5' d'*UBE2E3*.

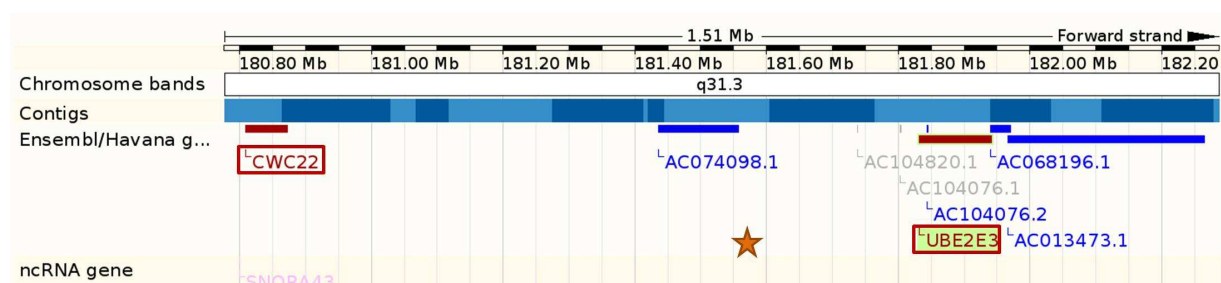


Figure 20 : Environnement génomique du gène UBE2E3 (D'après Ensembl version 56). L'étoile orange symbolise la localisation du point de cassure observée chez un patient autiste (Conroy *et al.*, 2009).

C'est donc tout particulièrement en raison de sa localisation génomique qu'*UBE2E3* a été choisi comme candidat dans le syndrome autistique.

Criblage des gènes candidats dans l'autisme

Voici les résultats obtenus pour les six gènes étudiés suite à la mise au point des amplifications de chaque exon par PCR (recherche de la Tm optimale) et de la recherche de variants par séquençage sur notre banque de 195 autistes.

Mise au point des amplifications et recherche de variants

		taille (pb)	Tm (°C)	Résultats du séquençage
<i>UBE2K</i>	exon 1	285	60	
	exon 2	258	60	
	exon 3	242	60	
	exon 4	316	60	
	exon 5	230	60	
	exon 6	280	60	
	exon 7	365	60	
<i>UBE2N</i>	exon 1	228	-	
	exon 2	480	58	
	exon 3	242	60	Détection d'1 variant inconnu chez 9 patients
	exon 4	199	60	
<i>UBE2A</i>	exon 1	298	-	
	exon 2	150	60	
	exon 3	158	60	
	exon 4	150	52	
	exon 5	167	48	
	exon 6	202	52	
<i>UBE2I</i>	exon 1	841	60	Présence de 8 polymorphismes connus et Détection de 2 variants inconnus
	exon 2	245	60	
	exon 3	243	60	Présence de 2 polymorphismes connus chez 29 et 46 patients
	exon 4	237	60	
	exon 5	236	60	Présence de 2 polymorphismes connus chez 25 patients
	exon 6	216	64	
	exon 7	699	60	Présence d'1 polymorphisme connu chez 113 patients
<i>UBE2H</i>	exon 1	250	63	
	exon 2	247	61	Détection d'1 variant inconnu chez 10 autistes
	exon 3	207	60	
	exon 4	179	58	
	exon 5	171	58	
	exon 6	237	59	Présence d'1 polymorphisme connu chez 29 autistes
	exon 7	285	59	Détection d'1 variant inconnu chez 6 autistes
<i>UBE2E3</i>	exon 1	328	-	
	exon 2	284	62	Présence d'1 polymorphisme connu chez 3 patients
	exon 3	230	64	
	exon 4	232	52	
	exon 5	244	60	
	exon 6	633	60	

Tableau 6 : Bilan de la mise au point des amplifications par PCR des exons de chacune des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine étudiées et résultats du séquençage de l'ADN de 195 patients autistes.

Aucun variant n'a pu être détecté dans notre population concernant les gènes *UBE2K* et *UBE2A* au niveau des séquences étudiées. Aucune preuve génétique de l'implication de ces deux gènes dans la pathologie autistique n'a donc pu être apportée par notre étude. En revanche, pour les gènes *UBE2N*, *UBE2I* et *UBE2H*, il est nécessaire de poursuivre l'interprétation des nouveaux variants identifiés, et de mener une étude d'association avec le polymorphisme connu du gène *UBE2E3*.

Recherche de mutations par identification des variants détectés

La détection de variants inconnus dans notre population de patients autistes a donc systématiquement mené au criblage de la population de 256 témoins afin d'établir la spécificité des variants observés par rapport à notre population de patients.

Tous les nouveaux variants ainsi détectés ont été retrouvés dans la population contrôle et correspondent donc à des polymorphismes non encore répertoriés dans les bases de données. Nous avons procédé à une identification de ces variants en suivant la nomenclature officielle indiquée sur le site de la Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/refseq.html>) (voir tableau 7).

Gène	Exon	Localisation du nouveau variant détecté
UBE2N	3	c.420+17C>T
UBE2I	1	c.-705C>T
UBE2I	1	c.-225C>T
UBE2H	2	c.131+46C>T
UBE2H	7	c.433-54A>G

Tableau 7 : Tableau synthétique de la nomenclature attribuée aux nouveaux variants détectés dans nos populations.

Voici les schémas des gènes étudiés avec la localisation de tous les polymorphismes retrouvés dans nos populations (réalisés par Agathe Paubel) :

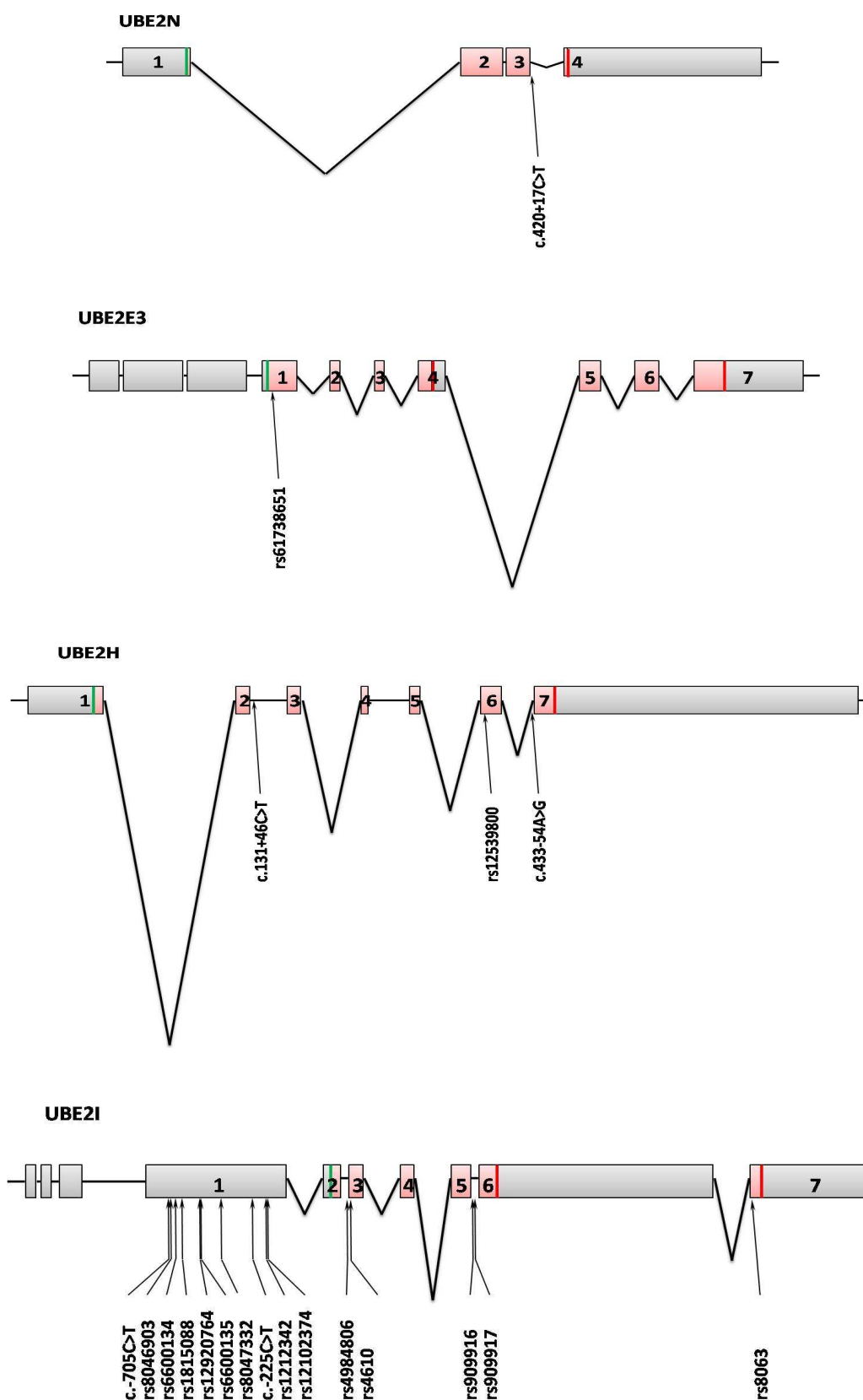


Figure 21 : Schémas reprenant la localisation génomique de tous les polymorphismes trouvés dans notre étude.

Aucune mutation spécifique de notre population de patients autistes n'a donc été détectée, mais de nouveaux polymorphismes ont été identifiés pour les gènes *UBE2N*, *UBE2H* et *UBE2I*.

Études d'association et de déséquilibre de liaison

Pour chaque exon présentant un polymorphisme il a ensuite été nécessaire de séquencer la population témoin de 256 individus afin de pouvoir mener une étude d'association. Ces associations ont été évaluées au moyen d'un test de Khi-deux.

Le polymorphisme identifié au sein du gène *UBE2N* n'est pas associé à l'autisme (c.420+17C>T ; $p = 0,092$). Le génotype CT du polymorphisme présent au sein du gène *UBE2N*, même s'il est sensiblement plus fréquents chez les autistes (5,6 %) par rapport à notre population contrôle (2,4 %), reste en dessous du seuil de significativité ($p = 0,089$)

Le polymorphisme du gène *UBE2E3* (rs61738651 ; $p = 0,745$) n'est pas associé significativement avec l'autisme (test sur les allèles). En revanche nous avons observé une différence significative de distribution des génotypes de ce polymorphisme rs61738651 entre les patients autistes et notre population témoin pour le gène *UBE2E3* ($p = 0,023$), en respect avec l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Nos résultats ne nous ont donc pas permis d'impliquer le gène *UBE2N* dans l'étiologie de l'autisme, mais semblent indiquer un rôle potentiel du gène *UBE2E3* pour lequel les études doivent donc être poursuivies.

Les résultats obtenus pour les gènes *UBE2H* et *UBE2I* sont plus prometteurs. Voici tout d'abord l'intégralité des résultats obtenus pour *UBE2I*, ayant fait l'objet de la rédaction d'un manuscrit.

Article 2 : Caroline Michelle, Patrick Vourc'h, Catherine Barthélémy, Frédérique Bonnet-Brilhault, and Christian R. Andres (2009). Association study with *UBE2I* gene on chromosome 16p13.3 in autistic disorder. *A soumettre*.

Position du problème

Lors de notre étude globale sur la famille des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine, il est apparu rapidement qu'*UBE2I* était une protéine particulière, unique enzyme de conjugaison intervenant dans une voie parallèle et complémentaire à l'ubiquitinylation, la sumoylation. Cette voie spécifique est particulièrement intéressante dans la mesure où elle joue un rôle prépondérant dans la prolifération et la différenciation des cellules neuronales ainsi que dans la plasticité neuronale, processus impliqués dans la physiopathologie de l'autisme. Par ailleurs, le gène *UBE2I* est localisé en 16p13.3, à seulement 700 kb du gène *TSC2* associé avec le syndrome autistique.

Notre travail a donc débuté par un séquençage et une analyse minutieuse des sept exons d'*UBE2I* et de leurs régions introniques flanquantes. De nombreux variants ont pu être détectés, dont deux contenus dans la séquence 5'UTR du gène qui n'avaient jamais été décrits.

Résultats

Étude des variants présents au sein des sept exons du gène *UBE2I* et de leurs régions introniques adjacentes

Nous avons pu détecter au sein de notre population de patients autistes 15 variants, dont deux n'avaient jamais été décrits dans la littérature ni dans les bases de données. Ces 15 polymorphismes ont tous été retrouvés dans notre population de témoins et une étude d'association a ainsi pu être menée.

Étude d'association des variants et des haplotypes

Parmi les 15 polymorphismes étudiés, deux apparaissent significativement associés avec l'autisme : les polymorphismes rs5815088 ($p = 0,0473$) et rs8063 ($p = 0,0179$). Ces deux associations ne sont cependant plus significatives ($p > 0,05$) après application de la correction multiple par les tests de permutation.

La même étude menée sur les fréquences génotypiques pour chacun de ces polymorphismes n'a permis de conclure qu'à une seule association significative concernant ce même polymorphisme rs8063 : on trouve ainsi une fréquence d'hétérozygotes AG de 55,5 % dans notre population autiste contre seulement 40,2 % chez les contrôles, portant la fréquence du

génotype GG majeur de 52,7 % chez nos témoins à seulement 37,9 % chez nos patients autistes ($p = 0,0056$). Cette association reste significative après correction pour tests multiples.

La mise en évidence de cette association entre l'allèle rare A du polymorphisme rs8063 et notre population de patients autistes nous a poussés à réaliser un test de déséquilibre de transmission. Un total de 50 trios a été génotypé, aboutissant à l'exploitation de 37 familles informatives. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de déséquilibre de transmission de l'allèle rare aux enfants autistes ($p = 0,555$).

Les tests de déséquilibre de liaison ont montré l'existence de trois blocs d'haplotypes. Des différences statistiquement significatives dans les fréquences des blocs haplotypiques ont été observées entre les cas et les contrôles pour les blocs 2 ($p = 0,0188$) et 3 ($p = 0,0019$). Après correction, seul le bloc 3, incluant le polymorphisme rs8063, reste significatif ($\chi^2 = 9,635$; $p = 0,0074$).

Les résultats obtenus tendent à soutenir l'idée d'une implication d'*UBE2I* et par conséquent de la voie de sumoylation dans l'étiologie du syndrome autistique.

Association study with the *UBE2I* gene on chromosome 16p13.3 in autistic disorder

Caroline Michelle¹, Patrick Vourc'h^{1,2}, Catherine Barthélémy^{1,3}, Frédérique Bonnet-Brilhault^{1,3}, and Christian R. Andres^{1,2}

1- UMR INSERM U930, Université François-Rabelais, Tours, France

2- Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Hôpital Bretonneau, CHRU Tours, France

3 - Explorations fonctionnelles et neurophysiologie en pédopsychiatrie, Hôpital Bretonneau, CHRU Tours, France

Keywords: autism, UBC9/*UBE2I* gene, sumoylation.

Abstract

Autism is a heterogeneous neuropsychiatric disorder exhibiting a high heritability, several studies suggesting an autism susceptibility locus on chromosome 16pter. At locus 16p13.3, only 700 kb from the *TSC2* gene associated with autistic disorder, *UBE2I* gene encodes the unique E2 enzyme of the sumoylation system, clearly involved in neuronal proliferation, differentiation and plasticity.

In this study, we performed a two-stage genetic study in which mutation screening was followed up by association studies based on the fifteen polymorphisms detected in the seven exons of *UBE2I* gene, including flanking splice regions. We identified two novel polymorphic variants in 5'UTR region of *UBE2I*, and, whereas single-marker analysis provided little evidence for an association of this gene with autism, we found one haplotypic association

strongly significant ($\chi^2 = 9.635$; $p = 0.007$), even after multiple comparisons. Bioinformatic analyses reveal the modification of splicing elements in 3'UTR region of *UBE2I* gene depending on polymorphic variants, suggesting an impact on *UBE2I* expression.

The results of the present study might provide evidence for the role of a novel pathway in autism aetiology.

Introduction

Autistic disorder (MIM: 209850) is a severe neurodevelopmental disorder characterized by impairments in social interaction, deficits in communication, and restricted and stereotyped patterns of interests and behaviors (Rapin and Katzman, 1998). Twin and family studies have demonstrated that genetic factors are important in the aetiology of autistic disorder (Bailey *et al.*, 1995; Lord *et al.*, 2000). The mode of inheritance is probably complex, with several genes interacting. The estimated number of genes implicated in autistic disorder ranges from three (Pickles *et al.*, 1995) to 15 (Risch *et al.*, 1999). Several studies implied the Pter region of chromosome 16 in autistic disorder, as chromosomal abnormalities have been reported in this area identifying duplicated (Hebebrand *et al.*, 1994) or translocated (Gilling *et al.*, 2003) regions in patients with autism. Moreover, the *TSC2* gene, located in 16p13.3, was associated with autism (Serajee *et al.*, 2003). These observations led to the suggestion of an autism susceptibility locus on chromosome 16pter. Considering the genetic complexity in autistic disorder, association studies of candidate genes in the region 16p13.3 may be more powerful than linkage studies (Piccardi *et al.*, 2002). In light of this information, we searched for candidate genes in the 16p13.3 region. We chose the *UBE2I* gene (MIM: 601661) as a candidate gene in autistic disorder for the following reasons. First, this gene is located only 700 kb from the *TSC2* gene associated with autistic disorder. Second, *UBE2I* encodes the unique E2 enzyme of the sumoylation system, which is clearly involved in the proliferation

and differentiation of neuronal cells in the developing brain and in neuronal plasticity in the adult brain. These processes were implicated in the physiopathology of autism. Third, mutations in the ubiquitin and ubiquitin-like systems were involved in several neurological disorders. Mutations in *UBE3A* gene (MIM: 601623), coding an E3 enzyme of ubiquitination, were discovered in patients with Angelman syndrome (Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997). This syndrome is a neurodevelopmental disorder characterized by severe speech impairments, mental retardation, epilepsy, ataxia and dismorphic facial features (Robb *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 1995). Thirty percent of Angelman Syndrome patients have loss-of-function mutations in *UBE3A* (Malzac *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 1999). Full features of autistic disorder are sometimes observed in Angelman Syndrome (Steffenburg *et al.*, 1996). Furthermore, an ubiquitin conjugating enzyme gene, *UBE2A*, was mutated in a case of X-linked mental retardation (Nascimento *et al.*, 2006). Mental retardation is present in 75% of autistic patients and epilepsy in 33% (Rapin, 1997).

The sumoylation is a dynamic and reversible process of ubiquitin-like post-translational modification, in which the protein SUMO (small ubiquitin-related modifier) is covalently attached to the substrates. Contrary to ubiquitination, which can lead to degradation of proteins through the 26S proteasome, the sumoylation appears to regulate protein-protein interactions, intracellular localization, and protection of some modified targets from the ubiquitin dependent degradation. The sumoylation is a cascade of three enzymatic steps involving different enzymes: the activation enzyme SUMO-E1 (SAE1/SAE2), the E2 enzyme for SUMO conjugation UBE2I (or UBC9), SUMO E3 ligases, and cleaving enzymes that can remove SUMO.

UBE2I gene was first identified in 1996 and was mapped on chromosome band 16p13.3 (Watanabe *et al.*, 1996). The cDNA of human UBE2I (or hUBC9) contains an open reading

frame of 474 nucleotides encoding 158 amino acids. Seven transcripts have been described in humans according to Ensembl, only four in NCBI website.

Initially regarded as a conjugating enzyme of ubiquitin, UBE2I was subsequently involved in sumoylation. UBE2I is able to directly recognize target proteins and catalyzes the formation of an isopeptide bond between the C-terminal glycine of SUMO and the ϵ -amino group of the targeted lysine (K). The SUMO conjugation is very specific in terms of targeted K residues, the majority of which are contained within a SUMO consensus motif defined by Ψ KX(E/D), Ψ corresponding to an hydrophobic residue, X any amino acid and E/D is a glutamate or aspartate residue (Rodriguez *et al.*, 2001). UBE2I has a central role in the process of sumoylation, interacting with almost all partners needed for sumoylation.

UBE2I has been widely studied in carcinogenesis. Since many proteins involved in cell cycle regulation, proliferation, apoptosis and DNA repair are targets for sumoylation, changes in sumoylation could ultimately have an impact on cell growth, cancer development and response to drugs (Mo and Moschos, 2005).

The expression of UBE2I has been studied during brain development in rats at mRNA and proteins levels (Watanabe *et al.*, 2008). Analyses revealed that the expression of UBE2I and SUMO1 are regulated during development, with a higher expression of UBE2I in neuronal stem cells followed by a moderate expression in differentiated neurons at embryonic stage. In the adult brain, moderate expression was observed in subsets of neurons in hippocampus, and in pyramidal neurons of the cerebral cortex. These results suggest that SUMO-UBE2I system could be involved in the proliferation and differentiation of neuronal cells in the developing brain and in neuronal plasticity in the adult brain.

In the present work, we explore the *UBE2I* gene, located in the autism susceptibility locus 16p13.3, as a candidate gene in autistic disorder.

Methods

Patient sample and control individuals

The control group (n = 256) consisted of anonymous and unrelated French Caucasian persons, selected after an ethnic and medical questionnaire. They were subjects without signs of autistic disorder and mental retardation. The autistic patients (n = 182; aged from 4 to 38 years old at the time of examination) were from the Child Psychiatry Unit of the Centre Hospitalier Regional Universitaire of Tours (France). They were unrelated and of French Caucasian descent. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (fourth edition (DSM-IV) criteria were used by a team of practitioners to ascertain the diagnosis of autistic disorder (Petit *et al.*, 1996). Diagnosis was completed by the Rimland test. Some patients were also assessed using the Autism-Diagnosis Interview (Lord *et al.*, 1994) or the Childhood Autism Rating Scale (Schopler *et al.*, 1980). The clinical investigation was completed by a behavior rating scale (BSE-R) (Barthélémy *et al.*, 1997). Recognizable genetic diseases have been excluded by clinics and cytogenetics. The FRAXA mutation, tested by Southern blot, at the CGG repeat was excluded. The level of development was evaluated using classical tests (Brunet-Lezine test, EDEI-R). The degree of mental retardation was scored using DSM-IV criteria. Genomic DNA was extracted from leukocytes isolated from ethylenediamine tetraacetic acid anticoagulated blood using a classical protocol (Sambrook *et al.*, 1989). Written consents were obtained from autistic patients (or parents) and from control individuals. This study protocol was approved by the local and National ethical committees (INSERM Project RBM 93045).

Mutation screening and genotyping

Human *UBE2I* is a 16.21 kb gene located on 16p13, containing seven exons. Mutation screening in the *UBE2I* gene was performed by sequencing using Sanger method. Sequenced DNA fragments were obtained by seven separate PCR reactions using primers described in Table 1, designed according to Primer-BLAST software available on the NCBI website (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd).

These primers are located in the untranslated regions or in the introns of the gene in order to also analyze the splice site consensus sequences. PCR were carried out using 50 ng of ADN in a final volume of 25 µl in the presence of 12.5 mM each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 U Taq DNA polymerase with corresponding buffer 1X (Promega®), and 400 nM human *UBE2I*-specific primers (see Table 1 for sequences). PCR amplifications were performed as previously described using specific melting temperature (T_m) (see Table 1). Initial denaturation was at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, T_m for 30 s and 72°C for 30 s, with a final extension of 10 min at 72°C. PCR products were checked after migration on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide before analysis. Two microliters of each PCR product were added to 1 µl of BigDye® Terminator (Applied Biosystems®) with 1.5 µl of buffer before sequencing performed on an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). Results were analysed using SeqScape® Software (Applied Biosystems®).

Statistics

Allelic frequencies and genotype frequencies of autistic patients and control group were compared using a chi-square test. Transmission disequilibrium test was estimated using a chi-square test confirmed by FBAT 2.0.3 (<http://www.biostat.harvard.edu/~fbat/default.html>) and Haploview 4.1 (<http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>) softwares for the validation of the respect of Hardy-Weinberg equilibrium. Haplotype blocks were delineated

using the Solid spine of Linkage Disequilibrium method implemented in Haploview 4.1. Comparison of haplotype frequencies between cases and controls was done by chi square test. Permutation tests with 10 000 permutations as well as test of conformity of genotype frequencies to Hardy-Weinberg equilibrium in both case and control samples were performed by Haploview 4.1.

Results

Mutation screening

We screened the *UBE2I* gene coding sequence in 182 autistic patients. The seven exons of *UBE2I* gene, including flanking splice junction sequences, were sequenced. No mutation was found in patients.

Association of single markers

By sequencing the 182 autistic patients, fifteen polymorphisms were identified. Among these, thirteen were already described and were distributed throughout the gene, whereas the two unknown were located in the 5' flanking region of *UBE2I*. All polymorphisms were screened in a control population of 256 individuals. All the genotyped polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium.

The unknown polymorphisms present in the 5' flanking region in autistic patients were also found in the control group and were evaluated for association. Comparison of allele frequencies between cases and controls using chi square test revealed significant differences ($p < 0.05$) for two polymorphisms: rs5815088 ($p = 0.0473$) and rs8063 ($p = 0.0179$) (Table 2).

Association of genotypes

Comparison of genotype frequencies for each polymorphism detected between cases and controls using chi square test revealed a strongly associated genotype for rs8063 polymorphism ($p = 0.0056$) (Table 3). Indeed we found a frequency of AG heterozygous from 55.5% in our autistic population against only 40.2% in controls leading to a frequency of major GG genotype from 52.7% in our controls to only 37.9% in our patients with autism. Other genotypes were not significantly associated with our autistic population ($p > 0.05$).

Transmission disequilibrium test

Highlighting the association between the rare A allele of rs8063 polymorphism and our population of autistic patients has prompted us to conduct a transmission disequilibrium test. A total of 50 trios was genotyped, resulting in exploitation of 37 informative families. Haploview results confirmed the Hardy-Weinberg equilibrium ($p = 0.3686$). The rare A allele is more often transmitted (57.5%) than untransmitted (42.4%) but the results do not highlight a significant transmission disequilibrium of the rare allele to children with autism ($p = 0.3841$) (table 4).

Association of haplotypes

Pair-wise linkage disequilibrium was calculated between all pairs of markers using Haploview (Figure 1).

Tests of haplotypic association were carried out even though markers were individually negative and did not show a trend for significant association. We found three haplotype blocks across the observed chromosome fragment, based on solid spine of linkage disequilibrium method (Figure 1): block 1 (c.-705C>T and rs8046903); block 2 (rs6600134; rs5815088; rs12920764; rs6600135; rs8047332; c.-225C>T; rs12102342; rs12102374; rs4984806 and rs4610) and block 3 (rs909916; rs909917 and rs8063). Statistically significant

differences in haplotype block frequencies were observed between cases and controls in blocks 2 and 3 (Table 5).

Discussion

In the current study we tested the hypothesis that a genetic variation in a sumoylation gene is associated with autism. To our knowledge, it is the first study investigating the *UBE2I* gene sequence in a neurodevelopmental disorder.

Complex causative mechanisms are thought to underlie autistic disorder such as environmental factor, genetic predisposition, and structural and functional brain abnormalities. Highly complex interactions between all these pathways make the understanding of autism extremely difficult.

The genetic basis of autistic spectrum disorder is supported by data from twin and family studies: the most compelling evidence for high heritability is the greater than 50 % concordance rate for monozygotic twins relative to an approximately 3 % concordance for dizygotic twins (Lord *et al.*, 2000), which also suggests multiplicative genetic effects in which more than one and probably more than two genes contribute in concert to the high risk for monozygotic twins.

The effect of the sumoylation system on neurodevelopmental mechanisms has recently gained considerable attention, and among all the genes of sumoylation pathway *UBE2I* was the subject of special attention because of its key role in this particular pathway. Recent studies revealed a decreased expression of *UBE2I* during differentiation of neural stem cells in neurons (Watanabe *et al.*, 2008), highlighting a potential role in this major step of neural development.

A sequence screening of the seven exons of *UBE2I* revealed no coding mutation in the autistic group. However two polymorphisms were also found the 5' flanking region included in exon 1 of *UBE2I*, not yet described in literature nor in databases. They were included in our association analysis, in addition of the thirteen known polymorphisms present in our populations.

Chi square test revealed two SNPs to be associated with autism ($p < 0.05$) (Table 2). In the first case (rs5815088), the major allele of polymorphism was overrepresented in the autistic group, whereas for the second polymorphism (rs8063) the overrepresented allele was the minor allele. Both associations were no significant after applying multiple corrections by permutation tests ($n = 10\,000$ permutations, data not shown). Nevertheless, polymorphism rs8063, with was the most strongly associated, showed also a significant association of its GA genotype with our autistic population ($p = 0.0056$, table 3).

Two haplotype-level associations were found (Table 5). A risk haplotype CGCACCAGCA of the second block containing SNP rs5815088 was observed more frequently in cases (2.9 %) as compared to controls (only 0.5 %) ($p = 0.0188$). A second risk haplotype CGA in the third block containing SNP rs8063 was highly associated with the autistic group ($p = 0.0019$), as it was more frequently observed in cases (24.7 %) compared to controls (16.4 %). After multiple comparisons by permutation tests ($n = 10\,000$ permutations), haplotypic association with the second block became non significant but association with CGA haplotype of the third block remained strongly significant ($\chi^2 = 9.635$; $p = 0.0074$) (Table 6).

The results of the present study might provide evidence for the role of a novel pathway in autism aetiology. However, further studies are required to confirm our initial association and to explain its exact nature. The potential functional consequences of the associated SNPs remain unknown at the moment. The associated SNP lies within the 3' flanking region, so no direct change in amino acid sequence may be predicted. However, considering their

conserved nature, it is possible that they are linked to a nearby functional polymorphism or act as regulatory elements in RNA splicing or expression.

Conclusion

According to the results of the current study, variations in *UBE2I* gene might play a role in pathophysiology of autism. However, further studies are required to reveal the nature of this finding.

Acknowledgments

We thank R.-A. Thépault, C. Antar and A. Paubel for technical help.

This research was supported by grants from INSERM, Université François Rabelais and IFR 135.

Figure 1

Schematic representation of the chromosome 16 region where *UBE2I* gene is located with the location of the genotyping polymorphisms.

The Haploview generated output of LD analysis is shown. Marker to marker D' statistics are shown with LD blocks defined as solid spine of LD with a D' > 0.8. Marker pairs in complete LD are indicated by an empty box.

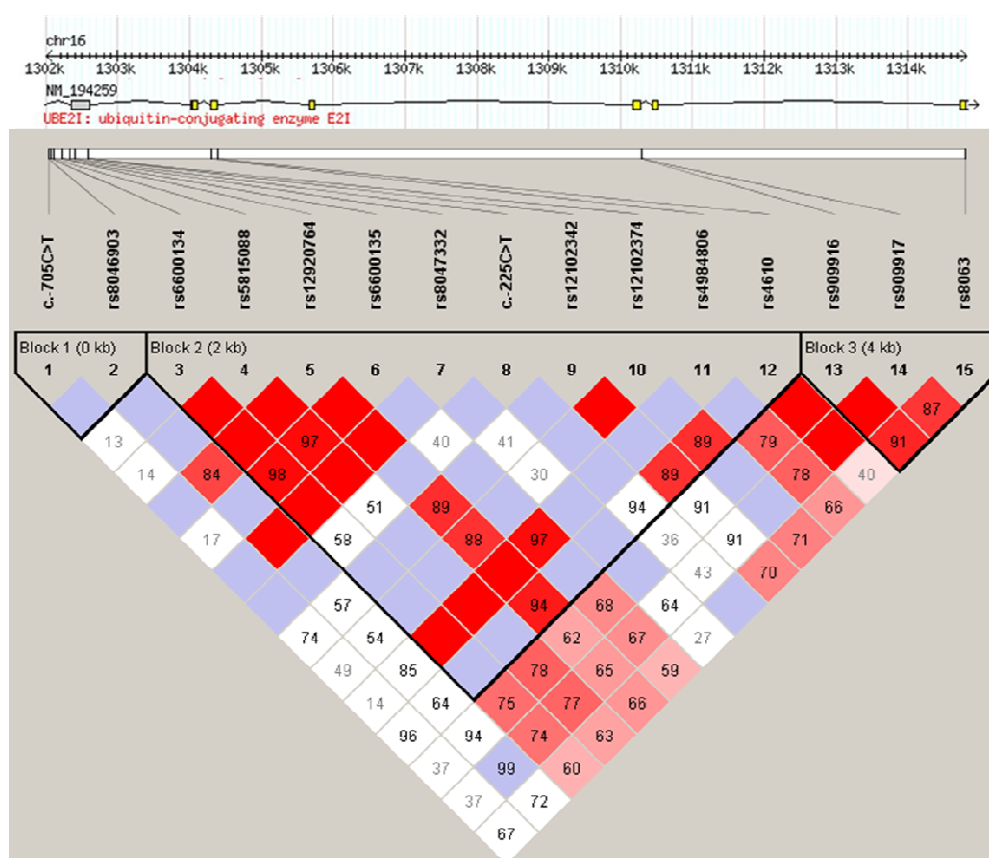


Table 1

Primers and conditions for polymerase chain reaction (PCR)

Exons	Primer	Sequences (5'-3')	PCR size (base pairs)	Tm
1	1F	CCACTCAGGAAGCCCATC	841	60°C
	1R	AGGTGTGTGAGGTTTCGTGG		
2	2F	GACGGCTTGCAAGAAGAGAG	245	60°C
	2R	AGGAGGGCTTCATTTCTGTG		
3	3F	GGTTCTTGGTGGTTTTGCTC	243	60°C
	3R	ATACTCCGCTCAGATCCCTG		
4	4F	CCCATCTCACCACGGTTTAT	237	60°C
	4R	GAGCTGGGAGGGAGTGAGAT		
5	5F	CTGCCTCCAAAAAGTGCTTC	236	60°C
	5R	TGGTCATTCTCTGTGGCTGA		
6	6F	AAACTGCTCACACCCGCTCTT	216	64°C
	6R	GAGGACACAGGCTCACCTA		
7	7F	GCCCTCTAACACGTCTCTTCTC	152	60°C
	7R	GGATTGGTTTGGCAAGAAGT		

Table 2Association of single markers in *UBE2I* gene with autism.

Name	Pos	chr 16	Area	Alleles (major/minor)	MAF* case	MAF* control	Chi square	P value	HWE** p value
c.-705C>T	1302002	5'	flanking region	C/T	0,986	0,991	0,195	0,6589	1,0000
rs8046903	1302012	5'	flanking region	C/T	0,943	0,961	0,939	0,3326	0,8665
rs6600134	1302039	5'	flanking region	C/A	0,917	0,866	2,836	0,0922	0,2920
rs5815088	1302084	5'	flanking region	G/-	0,928	0,868	3,936	0,0473	0,3752
rs12920764	1302188	5'	flanking region	C/T	0,594	0,567	0,347	0,5560	1,0000
rs6600135	1302200	5'	flanking region	A/G	0,936	0,888	2,951	0,0858	1,0000
rs8047332	1302296	5'	flanking region	C/T	0,864	0,848	0,241	0,6233	0,3951
c.-225C>T	1302385	5'	flanking region	C/T	0,995	0,989	0,494	0,4823	1,0000
rs12102342	1302557	5'	flanking region	G/A	0,829	0,882	2,102	0,1471	0,5538
rs12102374	1302560	5'	flanking region (splice site)	C/G	0,835	0,892	2,490	0,1146	0,7639
rs4984806	1304282	intron		C/T	0,856	0,870	0,180	0,6714	0,4048
rs4610	1304366	exon 3 (synonymous coding)		A/G	0,831	0,846	0,304	0,5811	0,2702
rs909916	1310304	intron		C/T	0,912	0,881	1,829	0,1763	0,2558
rs909917	1310310	intron		G/C	0,912	0,877	2,278	0,1313	0,5057
rs8063	1314819	3'	flanking region	A/G	0,652	0,727	5,610	0,0179	0,0165

Table 3

Genotype frequencies of *UBE2I* polymorphisms in autistic patients and in healthy controls.

Name	Genotype	Distribution of genotypes, n (%)		Chi square	P value
		Autism	Control		
c.-705C>T	CC	72 (97.3)	212 (98.1)	0,197	0,6572
	CT	2 (2.7)	4 (1.9)		
	TT	0 (0.0)	0 (0.0)		
rs8046903	CC	71 (89.9)	203 (92.3)	2,914	0,2329
	CT	7 (8.9)	17 (7.7)		
	TT	1 (1.2)	0 (0.0)		
rs6600134	CC	65 (83.3)	168 (74.0)	3,151	0,2069
	CA	13 (16.7)	57 (25.1)		
	AA	0 (0.0)	2 (0.9)		
rs5815088	GG	65 (85.5)	169 (74.4)	4,251	0,1194
	G -	11 (14.5)	56 (24.7)		
	- -	0 (0.0)	2 (0.9)		
rs12920764	TT	30 (37.5)	68 (31.3)	1,269	0,5301
	TC	35 (43.7)	110 (50.7)		
	CC	15 (18.8)	39 (18.0)		
rs6600135	AA	69 (88.5)	168 (78.5)	4,174	0,1241
	AG	8 (10.2)	44 (20.6)		
	GG	1 (1.3)	2 (0.9)		
rs8047332	CC	60 (74.1)	152 (71.0)	0,270	0,8738
	CT	20 (24.7)	59 (27.6)		
	TT	1 (1.2)	3 (1.4)		
c.-225C>T	CC	80 (98.8)	213 (97.7)	0,337	0,5617
	CT	1 (1.2)	5 (2.3)		
	TT	0 (0.0)	0 (0.0)		
rs12102342	GG	55 (69.6)	83 (78.3)	1,983	0,3710
	GA	21 (26.6)	21 (19.8)		
	AA	3 (3.8)	2 (1.9)		
rs12102374	CC	55 (69.6)	82 (80.4)	2,844	0,2412
	CG	22 (27.9)	18 (17.6)		
	GG	2 (2.5)	2 (2.0)		
rs4984806	CC	129 (81.7)	170 (76.9)	1,245	0,5367
	CT	28 (17.7)	49 (22.2)		
	TT	1 (0.6)	2 (0.9)		
rs4610	AA	115 (71.4)	178 (71.2)	2,036	0,3614
	AG	42 (26.1)	70 (28.0)		
	GG	4 (2.5)	2 (0.8)		
rs909916	CC	122 (83.0)	194 (76.4)	2,460	0,2923
	CT	24 (16.3)	58 (22.8)		
	TT	1 (0.7)	2 (0.8)		
rs909917	GG	122 (83.0)	194 (76.4)	2,460	0,2923
	GC	24 (16.3)	58 (22.8)		
	CC	1 (0.7)	2 (0.8)		
rs8063	GG	69 (37.9)	135 (52.8)	10,366	0,0056
	GA	101 (55.5)	103 (40.2)		
	AA	12 (6.6)	18 (7.0)		

Table 4

Transmission disequilibrium test of the rare A allele of rs8063 polymorphism in 50 french families considering the gender of the parents.

	Transmitted	Non-transmitted	Total	TDT p
<i>rs8063-A</i>				
Paternal	7	6	13	0.7815
Maternal	12	8	20	0.3711
Total	19	14	33	0.3841

Table 5

Association of estimated haplotypes (Haploview) in *UBE2I* gene with autism.

	Freq case	Freq control	Chi Square	P Value
Block 1				
CC	0.930	0.952	1.125	0.2889
CT	0.057	0.039	0.923	0.3367
TC	0.013	0.009	0.184	0.6678
Block 2				
CGTACCGCCA	0.573	0.548	0.280	0.5968
CGCATCGCCA	0.128	0.144	0.222	0.6374
CGCACCAGCG	0.112	0.138	0.712	0.3987
A-CGCCGCTA	0.077	0.117	1.951	0.1624
CGCACCGCCA	0.019	0.010	0.739	0.3900
CGCACCAGCA	0.029	0.005	5.521	0.0188
CGTACTGCCA	0.007	0.011	0.241	0.6237
Block 3				
CGG	0.655	0.713	3.504	0.0612
CGA	0.247	0.164	9.635	0.0019
TCA	0.095	0.110	0.521	0.4703

Table 6

Results of multiple comparisons calculated by Haploview after correction of 10000 permutations. 74 permutations out of 10 000 exceeded highest observed Chi square.

Name	Chi Square	Permutation p-value
Block 3: CGA	9.635	0.0074
Block 2: CGCACCAGCA	5.521	0.1177
Block 3: CGG	3.504	0.3486
Block 2: A-CGCCGCTA	1.951	0.8305
Block 1: CC	1.125	1.0000
Block 1: CT	0.923	1.0000
Block 1: TC	0.184	1.0000
Block 2: CGTACCGCCA	0.28	1.0000
Block 2: CGCATCGCCA	0.222	1.0000
Block 2: CGCACCAGCG	0.712	1.0000
Block 2: CGCACCAGCA	0.739	1.0000
Block 2: CGTACTGCCA	0.241	1.0000
Block 3: TCA	0.521	1.0000

Voici maintenant les résultats des études d'association et de déséquilibre de liaison menées sur le gène *UBE2H*.

Article 3 : Caroline Michelle, Patrick Vourc'h, Catherine Barthélémy, Frédérique Bonnet-Brillault, and Christian R. Andres (2009). Association study with *UBE2H* gene on chromosome 7q32 in autistic disorder. *En préparation*.

Position du problème

En 2003, notre équipe était déjà parvenue à démontrer l'association entre un polymorphisme du gène codant l'enzyme de conjugaison à l'ubiquitine *UBE2H* et un sous-groupe de patients autistes (Vourc'h *et al.*, 2003). Le gène *UBE2H* est localisé en 7q32, à seulement 270 kb du marqueur D7S530 lié à l'autisme.

Notre travail a donc débuté par un séquençage et une analyse minutieuse des sept exons d'*UBE2H* et de leurs régions introniques flanquantes. Deux nouveaux variants ont pu être détectés, et on ainsi fait l'objet d'une étude d'association.

Résultats

Étude des variants présents au sein des exons du gène *UBE2H* et de leurs régions introniques adjacentes

Nous avons pu détecter au sein de notre population de patients autistes trois variants, dont deux n'avaient jamais été répertoriés dans la littérature ni dans les bases de données. Tous les polymorphismes ont cependant été retrouvés dans notre population de témoins et une étude d'association a ainsi pu être menée.

Étude d'association des polymorphismes et des haplotypes

L'un des polymorphismes étudiés, c.433-54A>G localisé 54 pb en amont du début de l'exon 7, présente un allèle associé de façon significative avec notre population autiste ($p = 0,0121$). L'association est observée également pour les génotypes des différents groupes ($p = 0,0104$), la proportion de génotypes hétérozygotes AG pour ce polymorphisme passant de 9,7 % dans notre population contrôle à seulement 3,4 % chez les patients autistes.

En revanche l'étude des haplotypes n'a rien pu montrer de concluant.

Les résultats laissent pressentir une implication d'*UBE2H* dans le syndrome autistique, hypothèse qui sera explorée plus loin.

Association study with the *UBE2H* gene on chromosome 7q32 in autistic disorder

Caroline Michelle¹, Patrick Vourc'h^{1,2}, Catherine Barthélémy^{1,3}, Frédérique Bonnet-Brilhault^{1,3}, and Christian R. Andres^{1,2}

1- UMR INSERM U930, Université François-Rabelais, Tours, France

2- Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Hôpital Bretonneau, CHRU Tours, France

3 - Explorations fonctionnelles et neurophysiologie en pédopsychiatrie, Hôpital Bretonneau, CHRU Tours, France

Introduction

Autistic disorder (MIM: 209850) is a severe neurodevelopmental disorder characterized by impairments in social interaction, deficits in communication, and restricted and stereotyped patterns of interests and behaviors (Rapin and Katzman, 1998). Twin and family studies have demonstrated that genetic factors are important in the aetiology of autistic disorder (Bailey *et al.*, 1995; Lord *et al.*, 2000). The mode of inheritance is probably complex, with several genes interacting. The estimated number of genes implicated in autistic disorder ranges from three (Pickles *et al.*, 1995) to 15 (Risch *et al.*, 1999).

Mutations in the ubiquitin and ubiquitin-like systems were involved in several neurological disorders. Mutations in *UBE3A* gene (MIM: 601623), coding an E3 enzyme of ubiquitination, were discovered in patients with Angelman syndrome (Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997). This syndrome is a neurodevelopmental disorder characterized by severe speech impairments, mental retardation, epilepsy, ataxia and dismorphic facial features (Robb *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 1995). Thirty percent of Angelman Syndrome patients have loss-of-function mutations in *UBE3A* (Malzac *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 1999). Full features of autistic

disorder are sometimes observed in Angelman Syndrome (Steffenburg *et al.*, 1996). Furthermore, an ubiquitin conjugating enzyme gene, *UBE2A*, was mutated in a case of X-linked mental retardation (Nascimento *et al.*, 2006). Mental retardation is present in 75% of autistic patients and epilepsy in 33% (Rapin, 1997).

In the present work, we explore the *UBE2H* gene, located in the autism susceptibility locus 7q32, as a candidate gene in autistic disorder.

Methods

Patient sample and control individuals

The control group (n = 256) consisted of anonymous and unrelated French Caucasian persons, selected after an ethnic and medical questionnaire. They were subjects without signs of autistic disorder and mental retardation. The autistic patients (n = 183; aged from 4 to 38 years old at the time of examination) were from the Child Psychiatry Unit of the Centre Hospitalier Regional Universitaire of Tours (France). They were unrelated and of French Caucasian descent. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (fourth edition (DSM-IV) criteria were used by a team of practitioners to ascertain the diagnosis of autistic disorder (Petit *et al.*, 1996). Diagnosis was completed by the Rimland test. Some patients were also assessed using the Autism-Diagnosis Interview (Lord *et al.*, 1994) or the Childhood Autism Rating Scale (Schopler *et al.*, 1980). The clinical investigation was completed by a behavior rating scale (BSE-R) (Barthélémy *et al.*, 1997). Recognizable genetic diseases have been excluded by clinics and cytogenetics. The FRAXA mutation, tested by Southern blot, at the CGG repeat was excluded. The level of development was evaluated using classical tests (Brunet-Lezine test, EDEI-R). The degree of mental retardation was scored using DSM-IV criteria. Genomic DNA was extracted from leukocytes isolated from ethylenediamine

tetraacetic acid anticoagulated blood using a classical protocol (Sambrook *et al.*, 1989). Written consents were obtained from autistic patients (or parents) and from control individuals. This study protocol was approved by the local and National ethical committees (INSERM Project RBM 93045).

Mutation screening and genotyping

Human *UBE2H* is a 120 kb gene located on 7q32, containing seven exons. Mutation screening in the *UBE2H* gene was performed by sequencing using Sanger method. Sequenced DNA fragments were obtained by seven separate PCR reactions using primers described in Table 1, designed according to Primer-BLAST software available on the NCBI website (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd).

These primers are located in the untranslated regions or in the introns of the gene in order to also analyze the splice site consensus sequences. PCR were carried out using 50 ng of ADN in a final volume of 25 µl in the presence of 12.5 mM each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 U Taq DNA polymerase with corresponding buffer 1X (Promega®), and 400 nM human *UBE2H*-specific primers (see Table 1 for sequences). PCR amplifications were performed as previously described using specific melting temperature (T_m) (see Table 1). Initial denaturation was at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, T_m for 30 s and 72°C for 30 s, with a final extension of 10 min at 72°C. PCR products were checked after migration on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide before analysis. Two microliters of each PCR product were added to 1 µl of BigDye® Terminator (Applied Biosystems®) with 1.5 µl of buffer before sequencing performed on an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). Results were analysed using SeqScape® Software (Applied Biosystems®).

Statistics

Allelic frequencies and genotype frequencies of autistic patients and control group were compared using a chi-square test. Haplotype block was delineated using the Solid spine of Linkage Disequilibrium method implemented in Haploview 4.1. Comparison of haplotype frequency between cases and controls was done by chi square test. Conformity test of genotype frequencies to Hardy-Weinberg equilibrium in both case and control samples was performed by Haploview 4.1.

Results

Mutation screening

We screened the *UBE2H* gene coding sequence in 183 autistic patients. The seven exons of *UBE2H* gene, including flanking splice junction sequences, were sequenced. No mutation was found in patients.

Association of single markers

By sequencing the 183 autistic patients, three polymorphisms were identified. Among these, one was already described by our team (Vourc'h *et al.*, 2001), located in exon 6 of *UBE2H* gene and later identified as rs12539800 polymorphism. The two other polymorphisms are located in flanking regions of exon 2 and exon 7, respectively named c.131+46C>T and c.433-54A>G. The three polymorphisms were screened in a control population of 256 individuals. All the genotyped polymorphisms were also found in the control group and were in Hardy-Weinberg equilibrium, so they were evaluated for association.

Comparison of allele frequencies between cases and controls using chi square test revealed a significant difference ($p = 0.0121$) for c.433-54A>G polymorphism, located just 54 nucleotides upstream of exon 7 (Table 2).

We planned to reinforce this result by performing a transmission disequilibrium test, but the heterozygosity for this polymorphism is too rare to conduct this kind of test: among the 50 trios of our bank, only 4 parents were found heterozygous, which does not have sufficient power to conclude on the potential for transmission disequilibrium (data not shown).

Association of genotypes

Comparison of genotype frequencies for each polymorphism detected between cases and controls using chi square test revealed a strongly associated genotype for the c.433-54A>G polymorphism ($p = 0.0104$) (Table 2). Indeed we found a frequency of AG heterozygous from 9.7% in our control population against only 3.4% in autistic patients.

Other genotypes were not significantly associated with our autistic population ($p > 0.05$).

Association of haplotypes

Pair-wise linkage disequilibrium was calculated between all pairs of markers using Haploview.

Test of haplotypic association were carried out even though markers were individually negative and did not show a trend for significant association. We found one haplotype block based on solid spine of linkage disequilibrium method, containing rs12539800 and c.433-54A>G polymorphism. No statistically significant differences in haplotype frequencies were observed between cases and controls (Table 3).

Discussion

Complex causative mechanisms are thought to underlie autistic disorder such as environmental factor, genetic predisposition, and structural and functional brain

abnormalities. Highly complex interactions between all these pathways make the understanding of autism extremely difficult.

The genetic basis of autistic spectrum disorder is supported by data from twin and family studies: the most compelling evidence for high heritability is the greater than 50% concordance rate for monozygotic twins relative to an approximately 3% concordance for dizygotic twins (Lord *et al.*, 2000), which also suggests multiplicative genetic effects in which more than one and probably more than two genes contribute in concert to the high risk for monozygotic twins.

The effect of the ubiquitin system on neurodevelopmental mechanisms has recently gained considerable attention (Glessner *et al.*, 2009). In the current study, we tested the implication of the ubiquitin conjugating enzyme UBE2H in autism. Its location inside the major susceptibility locus for autistic disorder (AUTS1) in 7q was a good indication of its potential involvement in the aetiology of autism.

A sequence screening of the seven exons of *UBE2H* revealed no coding mutation in the autistic group. However two new polymorphisms were found in the flanking regions of exon 2 and exon 7 of *UBE2H*, not yet described neither in literature nor in databases. They were included in our association analysis, in addition of the known polymorphism present in our populations.

Chi square test revealed one polymorphism - c.433-54A>G - to be associated with autism ($p = 0.012$) (Table 2). In this case, the major allele of polymorphism was overrepresented in the autistic group. Association between this polymorphism and autism become stronger considering haplotype frequencies (Table 2, $p = 0.010$). However, haplotype-level association was not significant (Table 3). The transmission disequilibrium test could help strengthen the hypothesis of an association between this polymorphism and autism, but the studied cohort

should be expanded to reach a number of informative families high enough to achieve adequate statistical power.

The rs12539800 polymorphism that was previously associated with autism (Vourc'h *et al.*, 2003) was not significantly associated with our larger population of autistic patients, but the reason for this difference may be that our larger population was more heterogeneous on the level of mental retardation than the population analyzed in the first study.

Further studies are required to confirm our association and to explain its exact nature. The potential functional consequences of the associated polymorphism remain unknown at the moment, as it lies within intronic region, so no direct change in amino acid sequence may be predicted. It is however possible that it is linked to a nearby functional polymorphism or acts as regulatory elements in RNA splicing or expression.

Acknowledgments

We thank R.-A. Thépault and C. Antar for technical help.

This research was supported by grants from INSERM, Université François Rabelais, IFR 135.

Tables

Table 1

Primers and conditions for polymerase chain reaction (PCR)

Exons	Primer	Sequences (5'-3')	PCR size (base pairs)	Tm
1	1F	GGGTGTTGCCACCTCCAC	250	63°C
	1R	AGGGCCCTTGCAGTGGTT		
2	2F	TGCCAGATACTGTAAAGCCTGT	247	61°C
	2R	TCTGCAGTCCAACATAAATTGC		
3	3F	ATTTGGAGATGTAGTTCTGATG	207	60°C
	3R	CTGGCATTAAATTACCTCCCC		
4	4F	CTGAAATTGTTTCCAGTACTG	179	58°C
	4R	AGAAACACTAATCATGAGCAG		
5	5F	AATTAGTTGCCAGATACATGC	171	58°C
	5R	AGGCAATGTCTCAACATCTC		
6	6F	GAACTTGCATTTCCCATGTG	237	59°C
	6R	TAATGACTGAAGCCCAACAG		
7	7F	AAGGTAAGTTTGAACCTCCGC	285	59°C
	7R	AGTCTGCTTCTCATGGTTAGG		

Table 2

Genotype and allele frequencies of *UBE2H* polymorphisms in both autistic and control groups.

	Autistic patients		Controls (total)	
	Frequency (%)	n	Frequency (%)	n
c.131+46C>T				
Genotype				
GG	94.0	158	94.5	242
GA	6.0	10	5.5	14
AA	0.0	0	0.0	0
Total	100.0	168	100.0	256
			x2 = 0.044; p = 0.8331	
Allele				
G	97.0	326	97.3	498
A	3.0	10	2.7	14
Total	100.0	336	100.0	512
			x2 = 0.043; p = 0.8355	
rs12539800				
Genotype				
GG	84.2	154	84.3	209
GA	15.8	29	15.7	39
AA	0.0	0	0.0	0
Total	100.0	183	100.0	248
			x2 = 0.001; p = 0.9728	
Allele				
G	92.1	337	92.1	457
A	7.9	29	7.9	39
Total	100.0	366	100.0	496
			x2 = 0.001; p = 0.9740	
c.433-54A>G				
Genotype				
GG	96.6	168	90.3	364
GA	3.4	6	9.7	39
AA	0.0	0	0.0	0
Total	100.0	174	100.0	403
			x2 = 6.558; p = 0.0104	
Allele				
G	98.3	342	95.2	767
A	1.7	6	4.8	39
Total	100.0	348	100.0	806
			x2 = 6.293; p = 0.0121	

Table 3

Association of estimated haplotypes (Haploview) in *UBE2H* gene with autism.

	Freq case	Freq control	Chi Square	P Value
Block				
AG	0.903	0.888	0.490	0.4841
GG	0.079	0.079	0.002	0.9674
AA	0.018	0.034	1.947	0.1629

Expression d'UBE2H et neurogénèse

Article 5 : Caroline Michelle, Gaëlle Bouchez, Thibault Kervarrec, Julien Colas, Agathe Paubel, Patrick Vourc'h, Christian R. Andres (2009). UBE2H expression and neurogenesis. *En préparation*.

Position du problème

Les résultats obtenus nous avaient permis de conclure à une association de l'allèle G du polymorphisme rs12539800 de l'exon 6 d'*UBE2H* avec un premier sous groupe de patients autistes (Vourc'h *et al.*, 2003). Puis nous avons observé une association avec un polymorphisme situé à 4310 pb dans un autre sous groupe de patients (Michelle *et al.*, en préparation, manuscrit 3).

Il nous paraissait indispensable de connaître la façon dont *UBE2H* pouvait intervenir dans la physiopathologie de l'autisme. Des études des profils d'expression d'*UBE2H* ont donc été menées ainsi que des études *in vitro* mettant en jeu les effets du TNF- α . En effet la publication de Li *et al.*, (2003) soulignait l'effet du TNF- α sur la surexpression d'*UBE2H* dans le muscle. Par ailleurs, il a pu être mis en évidence un effet inhibiteur du TNF- α sur la croissance et la ramification des neurites (Bessis *et al.*, 2005) ainsi que sur la différenciation neuronale (Liu *et al.*, 2005). Le TNF- α semble de plus induire la mort cellulaire des neurones dans des cultures de cellules souches neurales (Liu *et al.*, 2005). Il était donc intéressant de chercher s'il existait une corrélation entre la modification de morphologie des neurones sous l'effet du TNF- α et la variation de l'expression d'*UBE2H*.

Résultats

Étude du profil d'expression d'*UBE2H* au cours du développement dans le cerveau de rat

Nous avons tout d'abord constaté une évolution de l'expression cérébrale d'*UBE2H* au cours du développement chez le rat, avec un pic d'expression au cours de la cinquième semaine

post-natale, ce qui suggère un rôle éventuel lors de la maturation neurale du SNC. Nous avons cherché à approfondir cette observation par l'étude de l'expression d'*UBE2H* au cours de la différenciation des cellules neurales en neurones.

Étude du profil d'expression d'*UBE2H* au cours de la différenciation des cellules souches neurales

Les résultats de RT-qPCR montrent une diminution de l'expression du gène *UBE2H* au cours de la différenciation neuronale, ce qui suggère un rôle préférentiel d'*UBE2H* lors de la prolifération des cellules souches neurales.

Effet du TNF-alpha sur l'expression d'*UBE2H* dans des cultures de cellules souches neurales en différenciation

Les CSN ont été exposées à 4 concentrations différentes de TNF- α (0, 10, 50 ou 100 ng/ml) durant 2 temps d'exposition possibles : 16 heures et 3 jours. Pour chaque condition testée, une étude de RT-PCR quantitative et une étude immunocytochimique sont menées en parallèle.

Variation de l'expression d'*UBE2H* sous effet de l'exposition au TNF- α

On observe une diminution de l'expression d'*UBE2H* au cours de la différenciation neuronale, en absence de TNF- α , après 3 jours de différenciation. De même l'expression d'*UBE2H* semble diminuée après une exposition de 16 heures à 100 ng/ml de TNF- α . En revanche une exposition de 3 jours au TNF- α semble permettre une augmentation de l'expression d'*UBE2H* de façon dose-dépendante. On notera qu'après 6 jours d'exposition à 50 ng/ml de TNF- α toutes les cellules sont mortes.

Taille du plus long prolongement cellulaire sous l'effet du TNF- α

La réalisation des tests de Student et de Mann Whitney ne met en évidence aucune différence significative entre les prolongements obtenus à l'exception des cultures TNF0 (donc sans ajout de TNF- α) après 3 jours d'exposition par rapport aux autres cultures à 3 jours ($p = 0,005$ avec le test de Student). On peut donc conclure qu'après 16 heures d'exposition l'effet du TNF- α semble négligeable alors qu'au bout de trois jours d'exposition il semble inhiber le développement des neurites.

Le nombre de neurosphères

Aucune différence significative ne peut être mise en évidence par le test de Student, mais il semble cependant que le nombre de neurosphères ait tendance à diminuer après trois jours de différenciation, soulignant la sortie progressive des neurones différenciés de ces neurosphères.

Corrélation avec le niveau d'expression d'*UBE2H*

Si on tente d'associer ces résultats à ceux concernant l'effet du TNF- α sur la différenciation des cellules souches neurales en neurones, on ne peut significativement rien conclure après 16 heures d'exposition, mais on peut par contre émettre l'hypothèse d'un rôle de la diminution de l'expression d'*UBE2H* au cours de la différenciation neuronale qui favoriserait la croissance des neurites, tandis que l'exposition prolongée au TNF- α limiterait cette croissance neuritique par la stimulation de l'expression d'*UBE2H*.

On peut ainsi avancer que l'expression d'*UBE2H* empêcherait la différenciation neuronale.

Étude *in vitro* des effets d'une surexpression d'*UBE2H* sur des cultures de cellules souches neurales

Nous avons poursuivi cette étude par l'observation des effets d'*UBE2H* sur les CSN. Les résultats obtenus lors de l'étude du profil d'expression laissaient penser à un rôle particulièrement lors de la phase de prolifération des CSN. Une surexpression de la protéine UBE2H a ainsi été réalisée dans des cellules souches neurales pour observer les effets sur la prolifération des cellules neurales obtenues en présence de bromodésoxyuridine (BrdU).

La surexpression d'*UBE2H* par les CSN est associée à une augmentation significative du nombre de cellules marquées au BrdU, et donc à une prolifération plus importante des CSN. Le gène *UBE2H* apparaît donc comme un gène favorisant la prolifération des CSN.

UBE2H expression and neurogenesis

*Caroline Michelle¹, Gaëlle Bouchez¹, Thibault Kervarrec¹, Julien Colas¹, Patrick Vourc'h^{1,2}
and Christian R. Andres^{1,2}*

1- UMR INSERM U930, Université François-Rabelais, Tours, France

2- Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Hôpital Bretonneau, CHRU Tours, France

³⁾ Corresponding author: C. R. Andres, Faculté de Médecine, 10, boulevard Tonnellé, BP 3223, 37032 Tours Cedex, France. Tel: + 33 2 47 36 61 48, e-mail: andres@med.univ-tours.fr

Introduction

Ubiquitination is characterized by a rapid and reversible post-translational covalent fixation of ubiquitin (Ub) onto proteins. The ubiquitination of proteins requires three types of enzymes. First, ubiquitin-activating enzymes E1 form a thioester bond with ubiquitin in an ATP-dependent reaction. Second a member of the ubiquitin-conjugating enzyme family E2 (or Ubc) carries ubiquitin and transfers it either directly to the substrate protein or to a third type of enzyme, the ubiquitin ligase E3.

This mechanism, which is part of the specific protein degradation pathway by the 26S proteasome, plays an important role in the regulation of protein levels in mammalian cells. In addition it has an impact on many cellular functions such as DNA repair, transcription, signal transduction, endocytosis and sorting and histone modifications, which modulate chromatin structure.

Ubiquitin-mediated proteolysis plays also a crucial role in neuronal development and maintenance of postmitotic neurons, as well *in vivo* (Flann *et al.*, 1997) as *in vitro* on rat PC12

cells (Obin *et al.*, 1999). Many studies indicate that ubiquitination and ubiquitin-dependent proteolysis are respectively positive and negative regulators of neurite outgrowth (Obin *et al.*, 1999; Takada *et al.*, 1994; Hondermarck *et al.*, 1992; Maufroid *et al.*, 1996).

Among E2 family members, UBE2H, located in locus 7q32, corresponds to the Human UBC8 homologous of *Saccharomyces cerevisiae*. UBE2H is composed of two functionally independent domains, including an N-terminal part with the classical functions of ubiquitin conjugation, and a C-terminal domain that interacts with the substrate (Kaiser *et al.*, 1995). The Kaiser team was also the first to describe the complex pattern of expression of UBE2H with identification of at least five different transcripts in the human placenta (Kaiser *et al.*, 1994).

UBE2H is constitutively expressed in human skeletal muscle and heart, in the murine limb muscles and in myotubes in culture (Li *et al.*, 2003). Its expression is also increased in muscle by TNF-alpha (Li *et al.*, 2003). UBE2H is known to act on histones and cytoskeletal proteins. It has been demonstrated *in vivo* that UBE2H was capable of histone H2A ubiquitination independently of E3 enzyme (Kaiser *et al.*, 1994).

Regarding its functional role, it affects different areas. UBE2H has been involved in erythroid differentiation (Wefes *et al.*, 1995). It has also been described that the accumulation of high levels of certain enzymes of the ubiquitin conjugation pathway including UBE2H was specific to breast cancer, since, otherwise no quantitative change could be detected in tissue extracts of primary colon cancer (Chen and Madura, 2005). UBE2H has also recently been heavily involved in the etiology of hepatocellular carcinoma (Keng *et al.*, 2009). Finally, given its physical location and function, the involvement of UBE2H has been reported by our team in the autistic disorder and an association could be demonstrated with a silent polymorphism in exon 6 of UBE2H (Vourc'h *et al.*, 2003). However, no association could be established between UBE2H and amyotrophic lateral sclerosis (Martin *et al.*, 2008).

Concerning neuronal development and ubiquitin conjugation system, P. Kavakebi *et al.* (2005) have shown that down-regulation of UBE2B mRNA in PC12 cells leads to a reduction of neuronal growth factor (NGF)-induced neurite length; moreover, *in vitro* pharmacological inhibition of ubiquitin-dependent protein degradation seems to significantly reduce axonal length and branching of adult sensory neurons. More broadly, in *Drosophila*, ubiquitin-dependant mechanisms may regulate the synaptic development.

All these results underscore the importance of ubiquitination mechanism in neuronal differentiation and the role of UBE2H in this pathway deserves to be clarified.

Methods

1. Neural stem cells (NSC) culture

The embryos of Wistar rats after 14 days of gestation were taken and preserved in an HBSS medium (well-balanced salt solution of Hanks-Gibco) before dissection. To generate the NSCs, brain cells were mechanically dissociated and cultured in a chemically defined proliferation medium composed of Neurobasal-A medium (Invitrogen), added of 100 U/ml of penicillin and streptomycin. The medium was supplemented with EGF (20 ng/ml), bFGF (20 ng/ml), L-glutamine (2 mM) and B27. Dissociated NSCs were plated in culture flasks in the defined media together with the growth factors, and incubated at 37°C, CO₂ 5 %. NSC proliferated forming cellular aggregates called neurospheres.

Neuronal Differentiation of the NSC was obtained after neurospheres dissociation. Cell suspension was then added to 24 well plates containing 500 µl of neural differentiation medium (Neurobasal-A medium supplemented with N2, L-glutamine 2 mM, bFGF 20 ng/ml, and penicillin and streptomycin 100U/ml).

2. Reverse Transcription and real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from cultured cells using TRIzol[®] method (Invitrogen) described Chomczynski and Sacchi (1987). 10 µl aliquots of the products were run on a 1.2 % agarose Tris–acetate gel containing 0.05 µg/ml ethidium bromide to control sample quality. The products were visualized through a UV transilluminator, captured in a digital format using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories) on a PC computer.

Aliquots (500 ng) of total RNA from the cells were reverse transcribed in the presence of 10 U Superscript II revert transcriptase, 1 mM dNTP, 10 mM dithiotreitol (DTT) (Invitrogen), during 45 min at 42°C before revert transcriptase distortion at 92°C 5 min.

Real-time quantitative PCR amplification was performed using standard procedure with Taq Polymerase. Aliquots of cDNA equivalent to 10 ng of total RNA were amplified in 25 µl reactions containing 12,5 µl of Platinum SYBR green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) and 3.5 pmol of each primer. The PCR primers specific to each transcript were as follows: GAPDH (control) forward (F) 5'ctgcaccaccaactgcttag3', reverse (R) 5'gtcttctgggtggcagtgat3' and UBE2H (F) 5'ggactcaatgaattgtgtgtaa3', (R) 5'tggaccttctgataaataccct3'. These specific primers were designed using the Primer3Plus software (Steve Rozen and Helen J. Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386).

PCR was performed using the following thermal profile: 5 min at 94°C; 30 sec at 94°C, 30 sec at T_m, 30 sec at 72°C, for 30 cycles; 10 min at 72°C, and finally a soak at 4°C. 10 µl aliquots of the amplified products were run on a 1.2 % agarose Tris–acetate gel containing 0.05 µg/ml ethidium bromide. The products were visualized through a UV transilluminator, captured in a digital format using Quantity One Gel Analysis software (Bio-Rad Laboratories) on a PC computer.

Expression level of *UBE2H* gene was determined by the method of $2^{-\Delta\Delta C_t}$, with $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t_{\text{time 1}} - \Delta C_t_{\text{time 0}}$ (time 0 = neurosphere and time 1 = J+2 or J+7). ΔC_t was obtained with regard to the gene of standardization *GAPDH* ($\Delta C_t = C_t \text{ UBE2H gene in time t} - C_t \text{ GAPDH gene in time t}$).

3. Effect of TNF-alpha on the expression of UBE2H in cultures of neural stem cell in differentiation

NSC was exposed to 4 different concentrations of TNF- α (0, 10, 50 or 100 ng/ml) for 2 possible exposure times: 16 hours and 3 days. For each condition tested, a study by RT-PCR and immunocytochemical studies are conducted in parallel. The study of RT-PCR allows highlighting the variation of *UBE2H* expression, while immunocytochemical study allows us to observe the effects on the morphology of neuronal cells obtained.

4. Cloning of the coded sequence of UBE2H in the plasmid pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO

The total RNA of frontal cortex of an adult rat brain was extracted with TRIzol. 1 μ l of RNA was reverse-transcribed in a final volume of 50 μ l containing 100 ng/ μ l hexamers (Promega), 0,1 million dithiotréitol, 1 nM of dNTP, buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT), and 1 μ l superscript TM II (Reverse Transcriptase, Invitrogen).

The PCR amplification of *UBE2H* coding sequence was carried out in 1X AccuPrimeTM buffer containing AccuPrimeTM DNA polymerase (Invitrogen) and specific primers UBE2H-F 5'-tgacagacgggccaaggagg-3' and UBE2H-R 5'-attagagtctgcttctcatggttagg-3'.

The TA cloning has been achieved by mixing purified PCR product in saline buffer with pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO[®] plasmid. Competent *Escherichia coli* (TOP10) were transformed by this product for amplification.

5. Preparation and analysis by sequencing DNA plasmid

Plasmidic DNA was extracted using the Wizard Plus kit (Promega). Purified DNA was sequenced to check the orientation and the lack of mutation. The sequencing used was based on the general principle of the Sanger method (capillary sequencer Applied 3130xl).

6. Transfection of NSC and study of the proliferation

Neurospheres were separated by treatment with Accumax and pipetting. Cells were transfected by electroporation (Amaxa system[®]) and cultivated for 2 days in proliferation medium. The second-generation of neurospheres obtained after 2 days of proliferation has been separated before sowing in differentiation medium (described in 2.1.) containing 20ng/ml of bFGF during 24 hours.

The proliferation study was carried out by adding 10 μ M BrdU during proliferation of NSC. 48 hours after addition of BrdU, cells were fixed in 4% paraformaldehyde, 4°C for 30 min. Revelation of the presence of BrdU in nuclear DNA of cells was performed by immunocytochemistry. Cells were subjected to treatment with hydrochloric acid 2 M for 1 h, then in borate buffer 0.1 mol/L, pH 8.5 for 30 min. They were incubated 12 h at 4°C with an anti-BrdU (Sigma, 1:200) before being washed 4 times with PBS for 5 minutes, then incubated with secondary antibody for 2 h with slow stirring. The secondary antibody was coupled to cyanine 3 (red fluorescence). After three successive washes with PBS for 5 min, cells were covered with a drop of Vectastain supplemented with DAPI (Di Aminido Phenyl Indol). Cells were observed in inverted microscope. 10 fields (objective 40x) were analyzed in 3 independent experiments for each condition (control, UBE2H).

Results

1. Expression profile of UBE2H during development in rats

We sought to describe the expression profile of UBE2H in the brain during development in rats (first 12 weeks postpartum) (figure 1). The results highlight a peak of expression during the fifth week postpartum, suggesting a possible role of UBE2H in the neural maturation of the CNS.

We intend to explore this observation by studying UBE2H expression during the differentiation of neural cells.

2. Gene expression of UBE2H during the differentiation of neural stem cells

RT-qPCR results using the method $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (with $\Delta C_t = C_t \text{ gene interest} - C_t \text{ gene GAPDH}$) on a range of 10 embryos showed a decreased expression of UBE2H gene during neural differentiation (figure 2), suggesting a preferential role of UBE2H during the proliferation of neural stem cells.

3. Functional study of UBE2H in neural stem cells

3.1. Effect of TNF- α on the expression of UBE2H during differentiation of cultured neural stem cells

NSC was exposed to four different concentrations of TNF- α (0, 10, 50 or 100 ng/ml) during two possible exposure times: 16 hours or 3 days. For each condition tested, RT-PCR and immunocytochemical studies were conducted in parallel, exploring the variation in UBE2H expression and the effects on the morphology of obtained neuronal cells, respectively.

3.1.1. Variation of UBE2H expression under effect of exposure to TNF- α

A decreased expression of UBE2H during neuronal differentiation is observed in the absence of TNF- α after 3 days of differentiation (figure 3). Similarly, the expression of UBE2H seems to be diminished after 16 hours exposure to 100 ng/ml TNF- α . However exposure of 3 days to TNF- α appears to allow an increased expression of UBE2H in a dose-dependent manner. Note that after 6 days exposure to 50ng/ml of TNF- α , all cells died (data not shown).

3.1.2. Size of the longest neurite under the effect of TNF- α

Student and Mann Whitney tests do not show any significant difference in the neurite length except for TNF0 cultures (without addition of TNF- α) after 3 days of exposure compared to other cultures after 3 days of exposition ($p = 0.005$ with the Student test) (figure 4).

We can therefore conclude from these results that, after 16 hours of exposure the effect of TNF- α appears to be negligible, while after three days of exposure it appears to inhibit the development of neurites.

3.1.3. The number of neurospheres

No difference can be significantly highlighted by the Student test concerning the average number of neurospheres between each condition. However it seems that the number of neurospheres decreases logically after three days of differentiation, emphasizing the progressive output of these differentiated neurons from neurospheres.

3.1.4. Correlation with UBE2H expression

Combining these results with those concerning the effect of TNF- α on differentiation of neural stem cells into neurons, we cannot conclude anything after 16 hours of exposure, but can contrariwise hypothesize a role of UBE2H decreased expression during neuronal

differentiation that favors the growth of neurites, while prolonged exposure to TNF- α limit neurite growth by stimulating the expression of UBE2H.

3.2. Effects of UBE2H overexpression on cultured neural stem cells

Expression pattern of UBE2H seemed to indicate a particular role during the proliferation phase of NSC. Overexpression of UBE2H in neural stem cells allows observing the effects on the proliferation of neural cells obtained in the presence of bromodeoxyuridine (BrdU) (figure 6).

Overexpression of UBE2H by the NSC is associated with a significantly increased number of BrdU-labeled cells, and thus with a greater proliferation of NSC. We can hypothesis that UBE2H gene is therefore a gene promoting proliferation of NSC.

Discussion

Mutations in genes involved in ubiquitination have already been implied in a few human disorders, and particularly mutations in ubiquitin ligase genes (UBE3A for Angelman syndrome (OMIM 105830), PARK2 for familial early-onset Parkinson's disease (OMIM 600116), MGNR1 for spongiform neurodegeneration, SIMPLE for Charcot-Marie-Tooth disease (OMIM 302800), NHLRC1 for Lafora disease (myoclonus epilepsy, OMIM 254780), MID1 for Opitz G/BBB Syndrome (OS, MIM 300000), TOPORS for autosomal dominant retinitis pigmentosa (OMIM 609923), VHL for von Hippel-Lindau disease (OMIM 193300), CUL7 for 3-M syndrome (intrauterine growth retardation, OMIM 273750), TRIM32 for autosomal recessive Bardet-Biedl syndrome type 11 (OMIM 209900) and for Limb-girdle muscular dystrophy type 2H (OMIM 254110), AIRE for autoimmune polyendocrinopathy

syndrome type 1 (OMIM 240300), UBE2A for X-linked mental retardation (OMIM 312180).

All these pathologies underlight the importance of ubiquitin pathway in cell.

To understand the mechanism by which this enzyme can cause neurodevelopmental abnormalities, we first observed the expression profile of UBE2H during neural differentiation. The increase of UBE2H gene expression during the fifth week postpartum in rat brain suggests a possible role of UBE2H in the neural maturation of the CNS. UBE2H expression during the differentiation of neural cells showed a decreased expression of UBE2H gene, suggesting a preferential role of UBE2H during the proliferation of neural stem cells.

The study of Li *et al.* (2003) emphasized the effect of TNF- α on UBE2H overexpression in muscle. Furthermore, *in vitro* studies have demonstrated the inhibitory effect of TNF- α on neurite growth and branching (Bessis *et al.*, 2005) as well as on neuronal differentiation (Liu *et al.*, 2005). TNF- α seems to induce cell death of neurons in cultures of neural stem cells (Liu *et al.*, 2005). It was therefore interesting to see whether there was a correlation between the change in morphology of neurons under the effect of TNF- α and the variations in the expression of UBE2H.

A decreased expression of UBE2H during neuronal differentiation is observed in the absence of TNF- α after 3 days of differentiation. Similarly, the expression of UBE2H seems to be diminished after 16 hours exposure to 100 ng/ml TNF- α . However exposure of 3 days to TNF- α appears to allow an increased expression of UBE2H in a dose-dependent manner.

After 3 days of differentiation neurite lengths were significantly higher without addition of TNF- α compared to other cultures exposed to TNF- α ($p = 0.005$), indicating that after 16 hours of exposure the effect of TNF- α appears to be negligible, while after three days of exposure it appears to inhibit the development of neurites.

The purpose of this study was to show if, as demonstrated in the muscle, TNF- α was able to induce overexpression of UBE2H in neural stem cell differentiation, if this variation of

expression was dependent on the concentration and exposure time of TNF- α , and if the expression of UBE2H could be directly correlated with the modified morphology of obtained neurons.

Combining these results with those concerning the effect of TNF- α on differentiation of neural stem cells into neurons, we cannot conclude anything after 16 hours of exposure, but can contrariwise hypothesize a role of UBE2H decreased expression during neuronal differentiation that favors the growth of neurites, while prolonged exposure to TNF- α limit neurite growth by stimulating the expression of UBE2H .

We can thus assume from this study that the expression of UBE2H prevents neuronal differentiation.

Finally expression pattern of UBE2H seemed to indicate a particular role during the proliferation phase of NSC. Overexpression of UBE2H by the NSC significantly increased the proliferation of NSC. We can also hypothesis that UBE2H gene is therefore a gene promoting proliferation of neural stem cells. By its capacity to monoubiquitinate H2A and H2B histones, UBE2H may cause inhibition of gene expression. It seems likely from our results that the expression of UBE2H in neural stem cells is associated with inhibition of genes of neuronal differentiation (neurogenin for example), thereby promoting cell proliferation.

Conclusion

All these results suggest an important role for UBE2H during neurogenesis. Our results showed that not only UBE2H promotes proliferation of NSC but also prevents neuronal differentiation.

UBE2H protein, like other enzymes of the ubiquitin pathway, is involved in ubiquitination of histone. Therefore, epigenetic mechanisms involved in neurogenesis could have an important role in the aetiology of disease affecting the development of central nervous system in general, and mental deficiencies in particular.

Given these results we can hypothesis a possible role of UBE2H in the differentiation of neuronal cells. In 2003, our team observed an association between a polymorphism of UBE2H and a group of autistic patients (Vourc'h *et al.*, 2003). Our results suggest that the involvement of UBE2H could occur very early during brain development, altering the neural maturation of central nervous system. UBE2H also appears as a potential candidate in other neurodevelopmental disorders such as mental retardation.

Acknowledgements

IFR 135, INSERM

Figure 1: expression profile of *UBE2H* gene during the first 12 weeks postpartum in rat brain (n = 4). Error bars represent standard deviations of the mean.

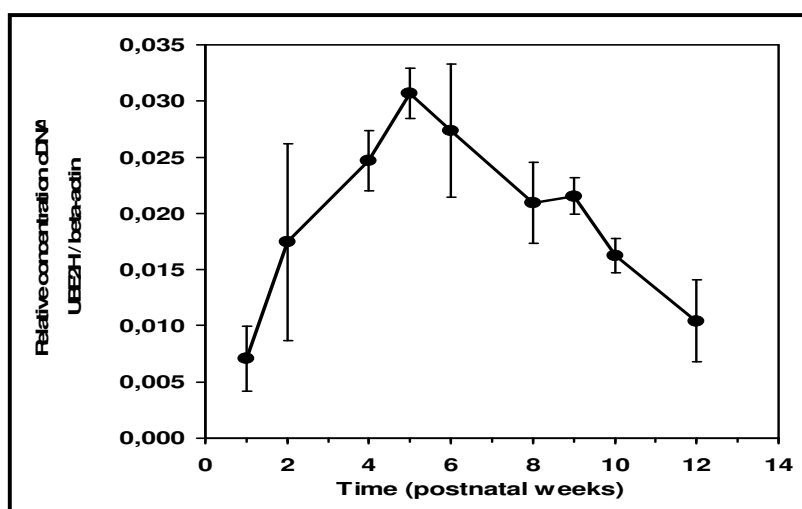


Figure 2: Relative gene expression profile of *UBE2H* (compared to *GAPDH* expression) during the differentiation of NSC from rat embryos (n = 10), at neurosphere stage and after 2 and 7 days of differentiation.

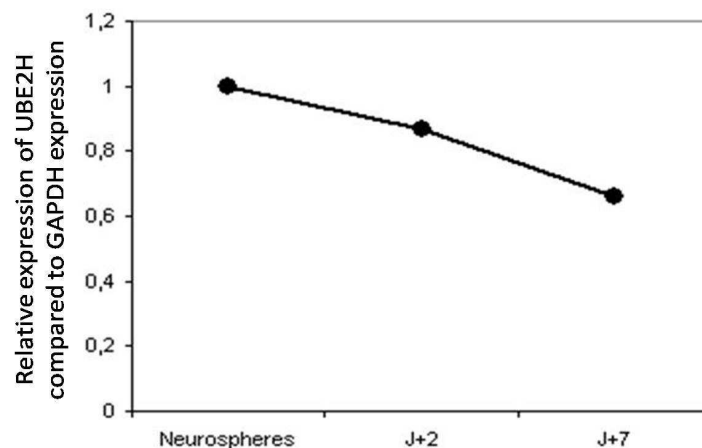


Figure 3: Variations of *UBE2H* expression under effect of exposure to $\text{TNF-}\alpha$. TNF0 = culture in the absence of $\text{TNF-}\alpha$, TNF10 = culture in the presence of 10 ng/ml of $\text{TNF-}\alpha$, TNF50 = culture in the presence of 50 ng/ml of $\text{TNF-}\alpha$, TNF100 = culture in the presence of 100 ng/ml of $\text{TNF-}\alpha$.

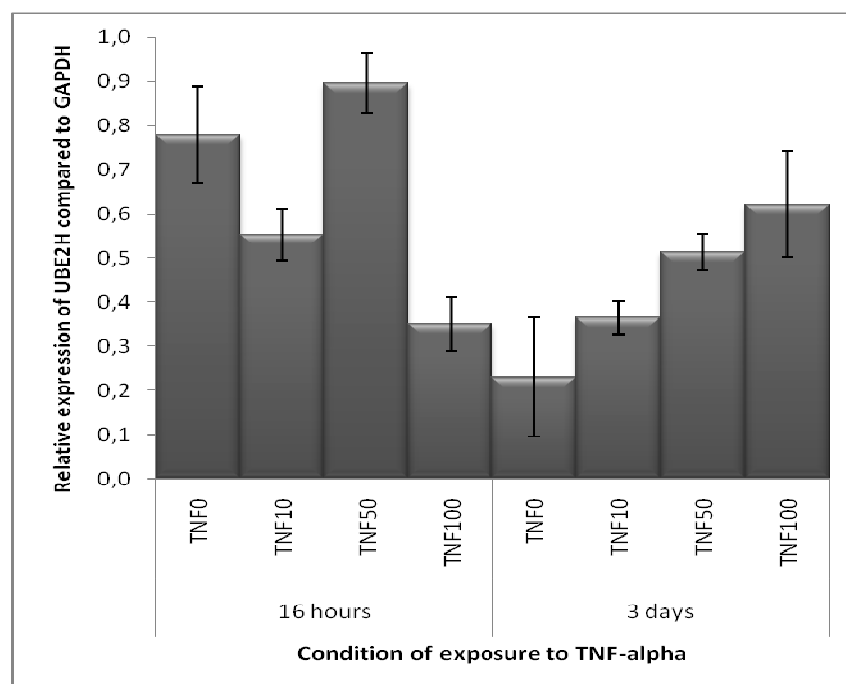


Figure 4: Size of the longest neurite under the effect of TNF- α . TNF0 = culture in the absence of TNF- α , TNF10 = culture in the presence of 10 ng/ml of TNF- α , TNF50 = culture in the presence of 50 ng/ml of TNF- α , TNF100 = culture in the presence of 100 ng/ml of TNF- α . * P = 0.005 (Student test).

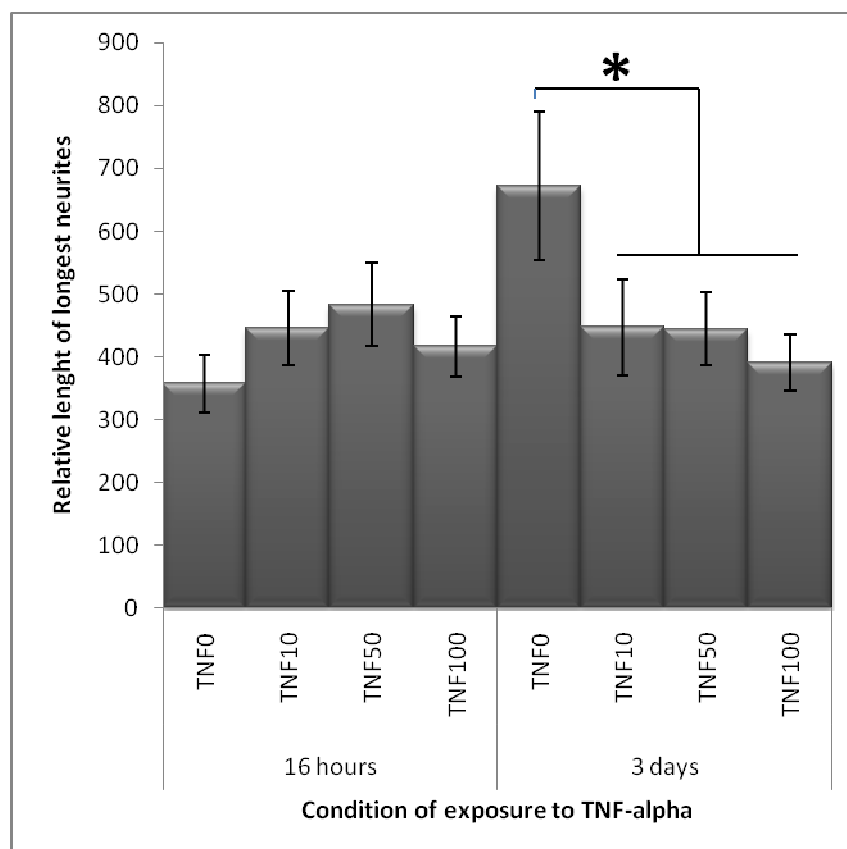


Figure 5: Average number of neurospheres per plate for different concentrations of TNF- α .

TNF0 = culture in the absence of TNF- α , TNF10 = culture in the presence of 10 ng/ml of TNF- α , TNF50 = culture in the presence of 50 ng/ml of TNF- α , TNF100 = culture in the presence of 100 ng/ml of TNF- α .

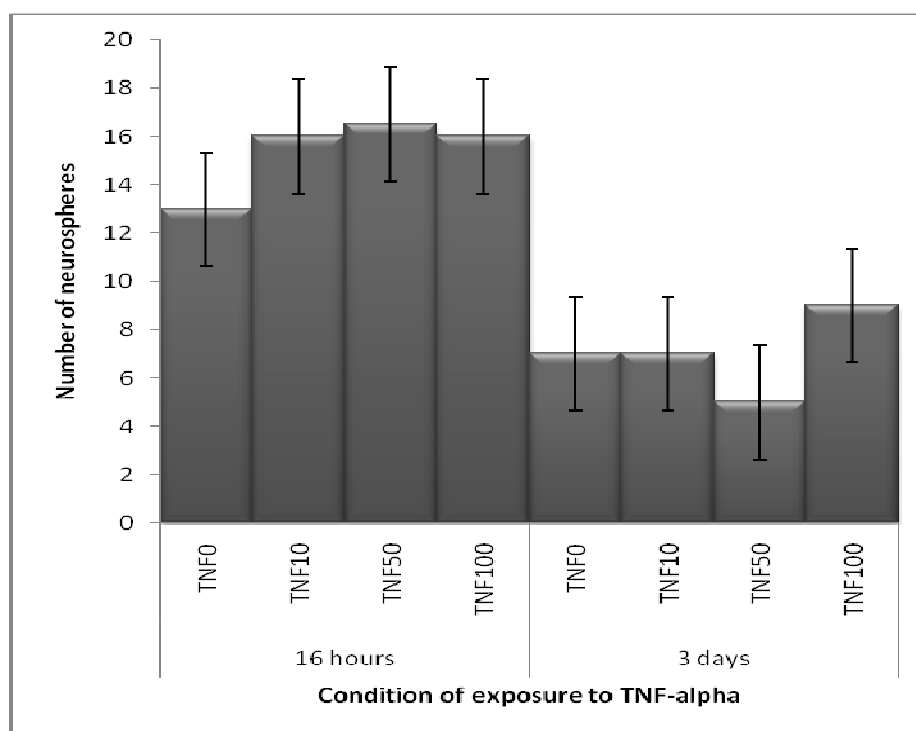
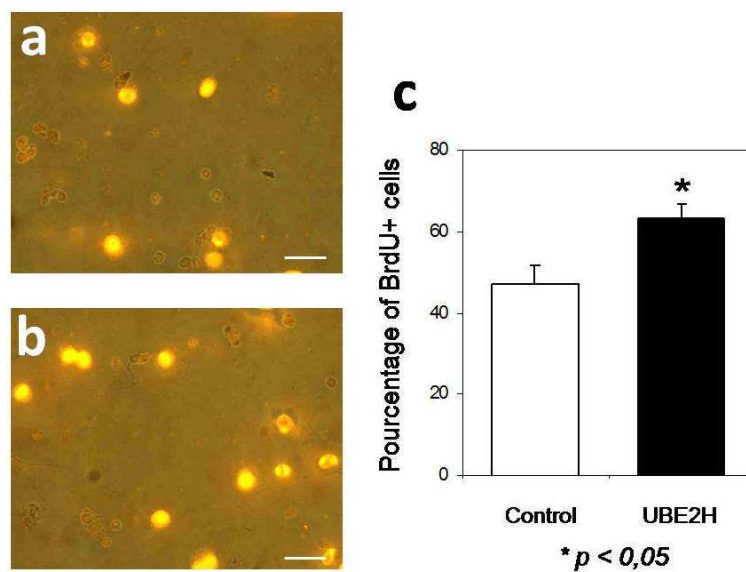


Figure 6: UBE2H overexpression study on proliferation of NSC (a) transfected by pGFP or (b) co-transfected by pGFP and pUBE2H (Scale bar = 60 μ m). (c) Percentage of BrdU+ cells after UBE2H overexpression from three independent experiments (* $p < 0.05$, Mann-Whitney test).



Étude du profil d'expression d'*UBE2A* au cours de la différenciation des cellules souches neurales

Position du problème

Les récentes découvertes de l'équipe de Nascimento concernant la présence d'une mutation stop responsable d'un syndrome de déficience mentale liée à l'X au sein du gène *UBE2A* nous a conforté dans notre idée de l'implication des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine dans les pathologies neurodéveloppementales.

Des études *in vitro* ont ainsi été menées sur le rôle d'*UBE2A* dans la maturation des CSN.

Résultats

Étude du profil d'expression d'*UBE2A* au cours de la différenciation des CSN

Les résultats RT-qPCR indiquent une augmentation régulière de l'expression du gène *UBE2A* au cours de la différenciation neurale.

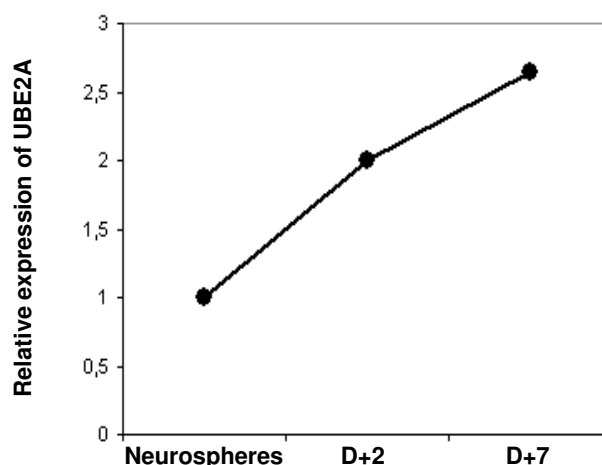


Figure 22 : Profil d'expression relative d'*UBE2A* par rapport à l'expression du gène GAPDH au cours de la différenciation des CSN d'embryons de rats (n = 10), au stade neurosphères et après 2 et 7 jours de différenciation.

Etude *in vitro* des effets d'une surexpression d'*UBE2A* sur des cultures de cellules souches neurales en différenciation

Les observations effectuées lors de l'étude du profil d'expression d'*UBE2A* suggéraient un rôle potentiel lors de la phase de différenciation des CSN en neurones. Par ailleurs, sa forte homologie avec la protéine UBE2B nous a orientés vers un mécanisme d'action possible à explorer, car UBE2B semblerait favoriser la croissance des neurites (Nascimento *et al.*, 2006). Nos résultats indiquent que la surexpression de la protéine UBE2A provoquerait une augmentation de la taille des neurites, confirmant l'idée d'un rôle de la protéine UBE2A lors de la différenciation des CSN en neurones.

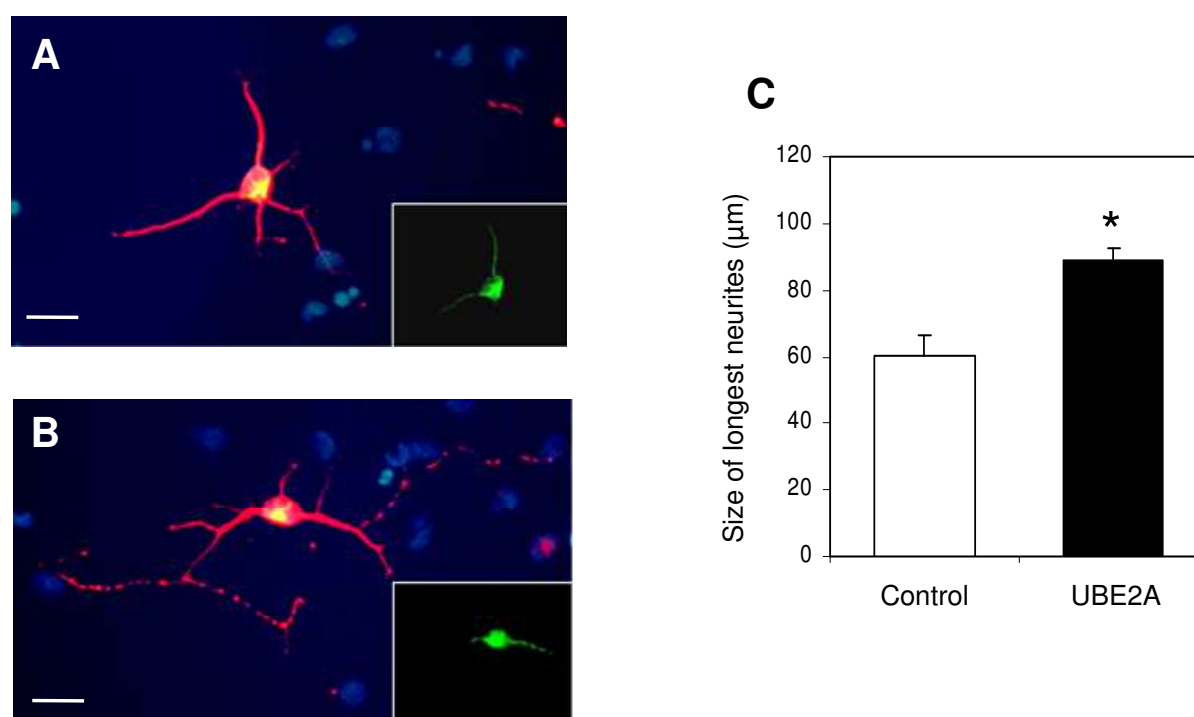


Figure 23 : Effets d'une surexpression d'*UBE2A* sur la croissance des neurites à partir de CSN transfectées par la GFP (A) ou co-transfectées par la GFP et un plasmide permettant la surexpression d'*UBE2A* (B) (échelle de taille : 20 µm). (C) Taille du plus long neurite des cellules GFP⁺/β-III tubuline⁺ après surexpression d'*UBE2A* (n = 3 expériences ; * p < 0,05 par le test de Mann-Whitney).

Modélisation de la protéine UBE2A

La séquence protéique humaine d'*UBE2A* présente 95 % d'homologie avec la protéine humaine UBE2B qui a été cristallisée. Nous avons donc utilisé la structure 3D d'UBE2B

(code pdb : 1jas) pour construire un modèle tridimensionnel de la protéine UBE2A. Ce modèle montre qu'UBE2A est une protéine composée d'une hélice α , d'un feuillet β comportant à son extrémité C-terminale la cystéine active Cys 88, et cinq hélices α comportant une sérine phosphorylable Ser 120. Ce modèle montre une grande proximité (3,7 Å) entre la Cys 88 et la Ser 120.

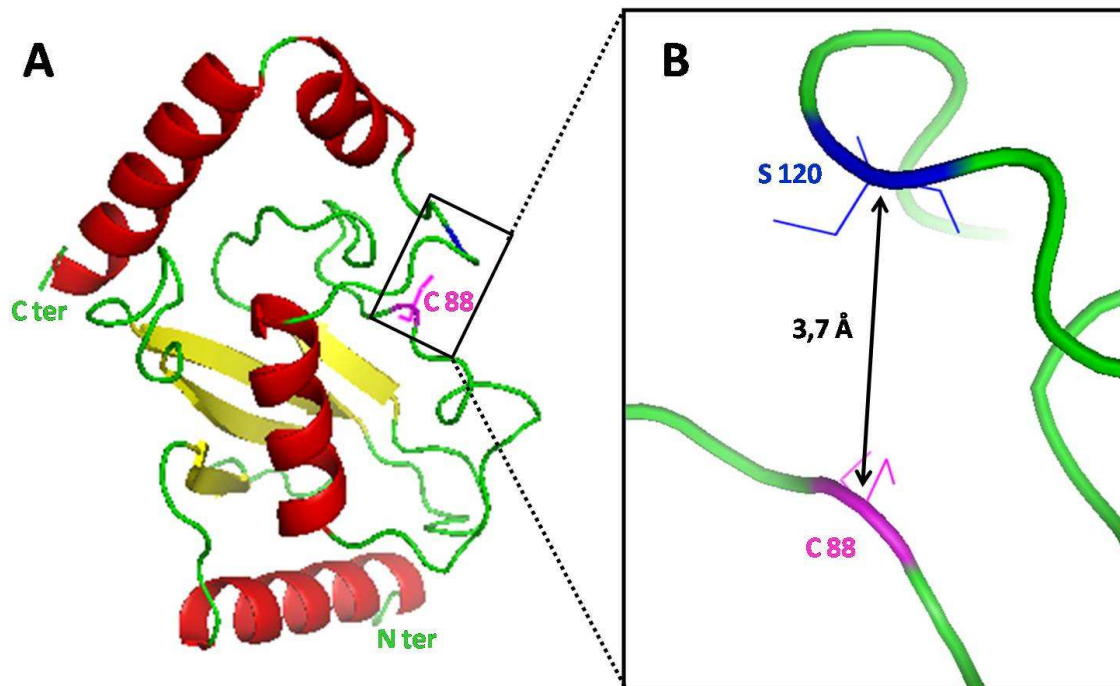


Figure 24 : Modèle tridimensionnel de la protéine UBE2A obtenu à partir de la structure 3D d'UBE2B (PDB : 1jas). (A) Modèle tridimensionnel d'UBE2A. (B) Agrandissement de la zone du site actif d'UBE2A. La cystéine active Cys 88 est représentée en vert, la présence d'une serine phosphorylable Ser 120 en mis en évidence en rouge.

Dans la mesure où une mutation a été décrite et impliquée dans une pathologie du SNC, nous avons cherché à modéliser la protéine mutée pour tenter de comprendre l'effet de cette mutation stop sur la fonctionnalité de l'enzyme. Cette modélisation a été réalisée grâce au logiciel Pymol et nous avons obtenu la modélisation suivante :

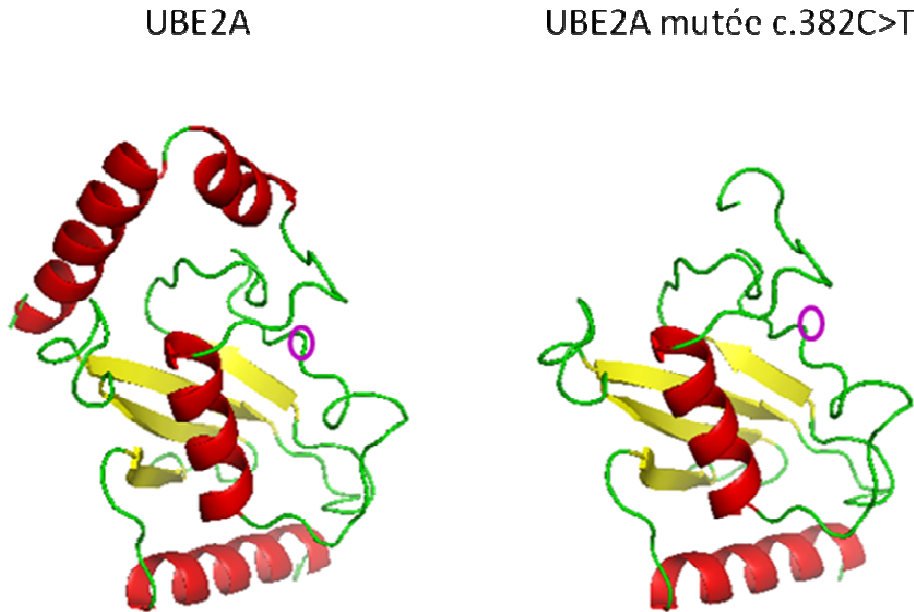


Figure 25 : Modélisation de la structure tridimensionnelle de la protéine UBE2A et de son mutant c.382C>T. La modélisation a été réalisée grâce au serveur Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>) et visualisé grâce au logiciel Pymol (<http://pymol.org/>) ; le cercle rose permet de localiser le site actif.

On constate donc que la mutation stop c.382C>T d'UBE2A rapportée par l'équipe de Nascimento chez des patients atteints de déficience mentale liée à l'X supprime toute l'extrémité C-terminale de la protéine, faisant disparaître les deux dernières hélices.

Il a été démontré que la capacité de Rad6, homologue d'UBE2A chez la levure *S. cerevisiae*, à ubiquitinyler les histones *in vitro* dépendait de la présence de son extrémité C-terminale qui permettait une reconnaissance des histones H2A et H2B (Sung *et al.*, 1988). Il apparaît ainsi clairement que la mutation stop d'UBE2A entraîne de graves conséquences fonctionnelles pouvant expliquer l'apparition de la pathologie.

Discussion

Analyse phylogénomique des E2

Le premier problème auquel nous avons été confrontés pour débiter nos travaux était de déterminer quelles seraient les enzymes E2 les plus intéressantes à étudier en priorité dans l'autisme. Pour cela la liste complète des enzymes E2 humaines était nécessaire pour pouvoir effectuer une sélection des protéines d'intérêt. Or les recherches bibliographiques nous ont rapidement mené à la conclusion que ce travail de recensement des E2 humaines n'avait jamais été fait et même qu'une certaine confusion régnait pour les enzymes auxquelles ont attribué différents noms, le plus souvent sans même s'en rendre compte.

Un gros travail de recherches bibliographique a donc été mené, non seulement pour relever toutes les enzymes humaines E2 déjà décrites mais également pour rechercher les enzymes E2 décrites dans d'autres espèces. Nous nous sommes ainsi concentrés sur des recherches dans les espèces les plus étudiées et représentatives de la diversité du vivant, à savoir la plante *A. thaliana*, les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, le ver *C. elegans*, la mouche *D. melanogaster*, la souris *M. musculus* et bien évidemment l'homme *H. sapiens*. Ce tri des E2 s'est basé sur la reconnaissance de motifs consensus du domaine Ubc des enzymes E2 ainsi que sur des scores d'homologie avec des enzymes E2 clairement identifiées. Cette recherche dans différentes espèces a été très utile pour plusieurs points :

1. Tout d'abord elle nous a permis de réaliser des Blast chez l'homme à la recherche de séquences homologues qui correspondraient à d'autres enzymes E2 humaines non encore étudiées. Ainsi la liste initiale de 32 enzymes humaines déjà décrites et citées dans des publications scientifiques a été étoffée de 18 enzymes supplémentaires grâce à des homologies de séquences avec des enzymes E2 d'autres espèces.
2. Mais elle nous a également permis par la suite de caractériser toutes les enzymes E2 humaines ainsi listées en les regroupant par familles d'enzymes comprenant des représentants des diverses espèces étudiées. Certaines enzymes ayant été étudiées chez différentes espèces, le regroupement en famille permet d'appliquer les caractéristiques connues des enzymes déjà décrites à toute la famille grâce à leur forte homologie. De même, les enzymes humaines d'une même famille peuvent laisser penser à une redondance de fonction ou à une certaine complémentarité d'action.

C'est ainsi que les 37 enzymes E2 humaines ont pu être classées en 17 familles.

Dans la mesure où des dysfonctionnements de la voie d'ubiquitinylation peuvent jouer un rôle important dans divers pathologies, il est important d'identifier les véritables orthologies des enzymes E2 chez les organismes modèles et chez l'homme.

La phylogénie de notre famille de protéines est importante pour identifier la véritable homologie des protéines (orthologie) chez les différentes espèces. L'étude d'une grande superfamille de protéines par le biais de diverses espèces est extrêmement difficile et c'est donc sans surprise que nous avons trouvé plusieurs erreurs dans la nomenclature des orthologues dans la littérature que nous avons répertoriées. De même, des enzymes classiquement considérées comme appartenant à la superfamille des enzymes de conjugaison E2 ont dû être écartées de notre étude car elles ne répondaient pas à suffisamment de critères pour être apparentées à de véritables orthologues : c'est le cas de la famille TSG101-UEVLD, de la famille UFC1, et des enzymes de conjugaison ATG3 et ATG10. Toutes ces protéines peuvent être considérées comme des enzymes éloignées ou ayant convergé vers une même structure tridimensionnelle que la superfamille des enzymes de conjugaison E2.

Le regroupement en familles que nous proposons devra bien sûr être validé par d'autres espèces animales et végétales. Le fait que le génome de l'anémone de mer, utilisé pour valider notre approche, contienne une série de gènes E2 parfaitement classables avec notre approche, milite en faveur de l'exhaustivité de notre description de familles. Cependant, le génome humain n'est pas encore connu actuellement dans toute son intégralité et n'est pas complètement annoté ; de plus de nouvelles espèces pourraient apporter de nouveaux gènes.

Criblage génétique des gènes E2 candidats dans l'autisme

L'origine génétique des troubles du spectre autistique est étayée par les études menées sur les patients jumeaux et sur les familles des patients : la preuve la plus convaincante en faveur d'une forte héritabilité est le taux de concordance plus élevé pour les jumeaux monozygotes (50 %) par rapport à la concordance observée pour les jumeaux dizygotes (environ 3 %) (Lord *et al.*, 2000), suggérant également des effets génétiques multiplicatifs pour lesquels plusieurs gènes contribuent de concert au risque élevé pour les jumeaux monozygotes.

Un des résultats majeurs de ce travail est l'observation du polymorphisme rs8063 situé dans la zone 3'UTR de l'exon 7 d'*UBE2I* qui a été associé de façon significative avec notre population d'autistes. Ces résultats pourraient fournir une preuve du rôle d'une voie nouvelle dans l'étiologie de l'autisme. Toutefois, les conséquences potentielles fonctionnelles de ce polymorphisme associé demeurent inconnues pour le moment. Le variant associé est en effet localisé au sein de la région flanquante 3', donc aucun changement direct dans la séquence d'acides aminés ne peut être prédit. Il est possible que ce polymorphisme puisse être lié à un autre polymorphisme fonctionnel situé à proximité, ou compte tenu de la forte conservation des séquences de ces gènes parmi les différentes espèces, il pourrait agir comme élément de régulation de l'épissage de l'ARN ou de l'expression.

Concernant l'étude du gène *UBE2H*, une différence significative ($p = 0,004$) des fréquences de l'allèle G du polymorphisme rs12539800 avait été trouvée entre les patients autistes pour lesquels le coefficient de développement était supérieur à 30 et les individus témoins. Cependant les résultats de notre étude d'association ne permettent pas de retrouver cette association dans notre population d'autistes. Il est probable que cette différence d'observation provienne du fait que lors de l'étude des familles aucune distinction de coefficient de développement n'a pu être réalisée et que la population de patients autistes est donc sensiblement différente de celle étudiée au moment de l'étude d'association publiée en 2003. En revanche la nouvelle étude d'association réalisée sur le gène entier a permis de découvrir deux nouveaux polymorphismes non encore répertoriés, dont un particulièrement intéressant

localisé en amont de l'exon 7 et pour lequel une association significative a pu être mise en évidence avec notre population de patients autistes.

Ces résultats qui peuvent apparaître au premier abord comme discordants mais pour lesquels il apparaît probable que la différence méthodologique aboutit à des variations des résultats permettent cependant de laisser présager un rôle d'UBE2H dans le développement de l'autisme ou du spectre plus large des troubles envahissants du développement. Aucun effet fonctionnel de ce polymorphisme n'est connu. Le mécanisme d'action doit encore être approfondi pour mieux saisir la voie par laquelle *UBE2H* semble impliqué dans l'étiologie d'une pathologie neurodéveloppementale.

Études *in vitro*

Pour comprendre le mécanisme par lequel les enzymes de conjugaison à l'ubiquitine peuvent provoquer des anomalies du développement du système nerveux, nous avons d'abord observé leur profil d'expression au cours de la différenciation neurale. La variation de leur expression au cours de la différenciation des cellules neurales suggère en effet un rôle potentiel au cours de la prolifération et/ou de la différenciation des cellules souches neurales.

Concernant *UBE2H*, le but de notre étude était de montrer si, comme il a été rapporté dans le muscle, le TNF- α était capable d'induire la surexpression d'*UBE2H* au sein des cellules souches neurales en différenciation, si cette variation d'expression est dépendante de la concentration et la durée d'exposition de TNF- α , et si l'expression d'*UBE2H* pouvait être directement corrélée à la modification de la morphologie des neurones obtenus.

En combinant les résultats obtenus, on peut raisonnablement émettre l'hypothèse d'un rôle de la diminution de l'expression d'*UBE2H* lors de la différenciation neuronale qui favoriserait la croissance des neurites, tandis que l'exposition prolongée des cellules souches neurales au TNF- α limiterait la croissance des neurites en stimulant l'expression d'*UBE2H*. En outre, la surexpression d'*UBE2H* augmente de façon significative la prolifération des cellules souches neurales. Il est donc possible de proposer que, à l'image d'autres gènes jouant un rôle à la fois sur la régulation de la prolifération des cellules souches neurales et neuroblastes et sur la croissance des neurites (NCAM, NF1, MAG, OMgp, ...), l'expression d'*UBE2H* inhibe la différenciation neuronale et favorise la prolifération. De par sa capacité à monoubiquitinyler les histones H2A et H2B, *UBE2H* peut entraîner une inhibition de l'expression de gènes. Il semble donc probable d'après nos résultats que l'expression d'*UBE2H* dans les cellules souches neurales soit associée à l'inhibition de gènes de la différenciation neuronale (neurogénines par exemple), favorisant ainsi la prolifération cellulaire. Des expériences précises visant à démontrer cet effet sont envisageables.

Nos résultats suggèrent donc que l'implication d'*UBE2H* dans l'étiologie de l'autisme pourrait intervenir dans la pathologie de façon très précoce au moment du développement cérébral, en altérant la maturation neurale du système nerveux central. *UBE2H* apparaît ainsi également comme un candidat potentiel dans d'autres pathologies neurodéveloppementales,

telle que la déficience mentale. Ces mécanismes sont en effet impliqués par exemple dans la neurofibromatose de type 1 puisque nous avons tout récemment rapporté que le gène *OMG* codant OMgp, situé dans l'intron 27b du gène *NF1* (17q11.2) présentait des fonctions inverse : OMgp influence négativement la prolifération des CSN par le contrôle de leur multiplication, tandis que la forme neuronale d'OMgp exprimée par les CSN différenciées n'affecte pas la croissance des neurites (Martin *et al.*, 2009). On estime qu'entre 5 et 10 % des patients ayant une neurofibromatose de type 1 présentent une microdélétion hétérozygote du locus *NF1* (Jenne *et al.*, 2001 ; Kluwe *et al.*, 2004) ; par conséquent, ces patients ne possèdent qu'un seul exemplaire du gène *OMG*, c'est pourquoi une implication d'OMgp dans les gliomes, les neurofibrosarcomes et les troubles de l'apprentissage associés à la neurofibromatose de type 1 a été proposée. UBE2H, aux fonctions inverses, pourrait donc également intervenir dans divers troubles neurodéveloppementaux.

Concernant maintenant UBE2A, il s'agit de la première enzyme de conjugaison à l'ubiquitine dont la mutation est directement liée à une pathologie, conduisant à des anomalies neurodéveloppementales.

Pour comprendre le mécanisme par lequel cette enzyme peut entraîner une déficience cognitive, nous avons d'abord observé le profil d'expression d'*UBE2A* cours de la différenciation neurale. L'augmentation de l'expression du gène suggère qu'*UBE2A* jouerait un rôle au moment de la différenciation des cellules souches neurales. Nous avons donc testé *in vitro* les effets d'une surexpression d'*UBE2A* dans des cultures de cellules souches neurales au cours de la différenciation neuronale, constatant ainsi que la surexpression d'*UBE2A* est associée à une augmentation significative de la taille des neurites.

La forte conservation des séquences protéiques des homologues d'*UBE2A* au cours de l'évolution entre les différentes espèces suggère l'importance de la protéine. Comme pour UBE2H, la monoubiquitinylation des histones H2B par UBE2A pourrait modifier la condensation de la chromatine au sein des noyaux et ainsi influencer des mécanismes épigénétiques en conduisant à une inhibition de l'expression génique. Un rôle potentiel d'*UBE2A* serait donc d'après nos résultats de réguler négativement l'expression de gènes inhibiteurs de la croissance des neurites, tels qu'*OMG* ou *NOGO-A*, ou plus probablement de stimuler les gènes directement impliqués dans la neuritogenèse, telles que les voies Rhos, Rac, stathmine, neuritine, narp, α -tubuline, cofiline...

D'une manière globale, l'implication des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine dans le syndrome autistique soutient l'idée de mécanismes épigénétiques intervenant dans l'étiologie de pathologies neurodéveloppementales, mais ces enzymes peuvent aussi agir sur des substrats directement impliqués dans ces mécanismes. Ces cibles pourront faire l'objet d'études détaillées d'ubiquitylation.

Perspectives

Exploration *in silico* du système ubiquitine

La classification que nous avons établie peut servir de point de départ à un travail plus fin sur les enzymes de conjugaison à l'ubiquitine humaines, et pourrait nécessiter l'analyse d'espèces supplémentaires qui permettraient d'obtenir une vue générale des enzymes E2 eucaryotes. Ces études complémentaires pourraient également se concentrer sur la recherche des partenaires des enzymes E2, qu'il s'agisse des enzymes E3 ou de toute autre protéine d'interaction, et identifier les substrats précis de chaque complexe enzymatique E1-E2-E3.

Exploration génétique du système ubiquitine

Ces travaux seront poursuivis par le criblage génétique de nouvelles enzymes de conjugaison E2 dans notre population de patients autistes. La cohorte de patients étant en constante évolution, les études génétiques réalisées dans ce travail pourront être effectuées sur les nouveaux patients autistes recrutés afin de venir confirmer ou infirmer les résultats présentés ici. Il serait particulièrement intéressant de pouvoir affiner les résultats en classifiant la population si hétérogène de patients autistes en groupe d'études selon les critères du diagnostic clinique tels que le coefficient de développement ou le coefficient intellectuel, la présence de langage, ou les scores ADI, la macrocéphalie, l'épilepsie, *etc.* Ces études pourraient être complétées par une approche endophénotypique, permettant d'améliorer l'homogénéité des échantillons par des évaluations phénotypiques détaillées.

Ces mêmes explorations génétiques sont également menées au sein de populations souffrant d'autres maladies neurodéveloppementales, telle qu'une population de déficients mentaux.

Exploration *in vitro* du système ubiquitine

Des études *in vitro* doivent tout d'abord être menées afin d'identifier des fonctions d'UBE2I qui a pu être associé à l'autisme par nos travaux. Le but ces études sera de déterminer l'implication d'UBE2I dans la croissance et la maturation neuronale, tant par l'observation des effets d'une surexpression que d'une inhibition de son expression par siRNA dans les CSN.

Les rôles de nos deux enzymes d'étude UBE2H et UBE2A au cours de la neurogénèse restent à approfondir. Au cours de ces travaux de thèse de nombreux plasmides ont été construits,

permettant de tester *in vitro* les conséquences directes d'une surexpression d'*UBE2H* ou d'*UBE2A* sur les cultures de cellules souches neurales et sur leur différenciation en différentes voies neuronales ou gliales. De plus des plasmides ont été créés permettant la surexpression de ces protéines mutées, au niveau de leur cystéine active, mais également au niveau d'autres aides aminés clés, comme c'est le cas pour *UBE2A* : la modélisation nous avait permis de souligner la présence d'un acide aminé clé dans la configuration spatiale de la protéine en raison de la présence d'une sérine phosphorylable en vis-à-vis du site actif, et la mutation de cette sérine en alanine affecte également probablement la fonctionnalité de l'enzyme. Un plasmide permettant l'expression de la protéine *UBE2A* comportant la mutation décrite chez des patients atteints d'un syndrome de déficience mentale liée à l'X (Nascimento *et al.*, 2006) a également été mis au point et permettra de comprendre l'implication d'*UBE2A* dans l'apparition de symptômes neurologiques.

Il serait également nécessaire de tester leurs effets sur le modèle de cultures primaires de cellules neurales d'hippocampes embryonnaires murins, dernièrement mis en place au sein de notre laboratoire par Frédérique Laumonnier. Pour chacune des études de nombreux paramètres peuvent être pris en considération, outre la mesure de la croissance des neurites.

Bien sûr de nouveaux plasmides seront également construits afin de mener des études sur les effets d'une surexpression de ces nouvelles E2 étudiées dans des cultures de cellules souches neurales en différenciation et dans des cultures primaires de neurones.

Toutes ces études de surexpression des protéines d'intérêt devront être complétées par les observations complémentaires des effets d'une inhibition de l'expression de ces enzymes E2 par siRNA, là encore aussi bien dans des cultures de cellules souches neurales en différenciation que dans des cultures primaires de neurones.

Les enzymes de conjugaison à l'ubiquitine étant fréquemment impliquées dans l'ubiquitination des histones, une autre voie d'étude pourrait concerner l'ubiquitinylation de ces histones. Les sous-unités concernées par cette ubiquitinylation sont les histones H2A et H2B qui sont les seules à présenter des sites d'ubiquitinylation sur des lysines situées à leur extrémité carboxyterminale. L'élargissement de l'offre commerciale proposant des anticorps dirigés contre les enzymes de conjugaison à l'ubiquitine et contre les histones ubiquitinyllées ou non permettra de simplifier de telles études.

Plus précisément concernant l'étude d'*UBE2H* il serait intéressant d'observer la chromatine au niveau de gènes de la différenciation neuronale tels que la neurogénine par exemple, dans le but de valider notre modèle des effets d'*UBE2H* sur l'inhibition de gènes de la différenciation neuronale, favorisant alors la prolifération cellulaire. De même pour *UBE2A* où notre étude nous a conduits à l'hypothèse d'un rôle potentiel d'*UBE2A* dans l'inhibition de l'expression de gènes inhibiteurs de la croissance des neurites, tels qu'*OMG* ou *NOGO-A*.

Il a également été fait le projet d'approfondir nos connaissances sur les enzymes de conjugaison en recherchant leurs protéines cibles et partenaires, notamment par des techniques de Far Western. Les découvertes réalisées sur ces protéines associées mèneront probablement à de nouvelles études génétiques et expérimentales.

De même, les profils d'expression des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine ont très peu été étudiés, mais sont pourtant essentiels à la compréhension de leur rôle dans le développement de pathologies neurologiques. C'est pourquoi l'étude de ces profils d'expression a fait l'objet d'un sujet de Master 2 mené par Agathe Paubel dont les premiers résultats sont très prometteurs.

Article 7 : Agathe Paubel, Caroline Michelle, Frédéric Laumonnier, Sébastien Tourlet, Rose-Anne Thépault, Martine Raynaud, Christian R. Andres, Patrick Vourc'h (2009). Neuronal expression of ubiquitin conjugating enzymes: new candidate genes in autism and mental deficiency. *En préparation*.

L'expression des 39 gènes E2 de la souris a été étudiée *in vitro* pendant le développement et la maturation des neurones d'hippocampes d'embryons (E17) de souris. Sur ces 39 gènes E2, 38 s'expriment dans les neurones et présentent des profils d'expression variables en fonction du stade de développement neuronal : neuritogenèse, synaptogenèse, après stimulation (1 heure ; 12 heures) par un analogue du glutamate, le NMDA, connu pour modifier l'expression de nombreux gènes impliqués dans la plasticité synaptique.

Les premières observations sont les suivantes :

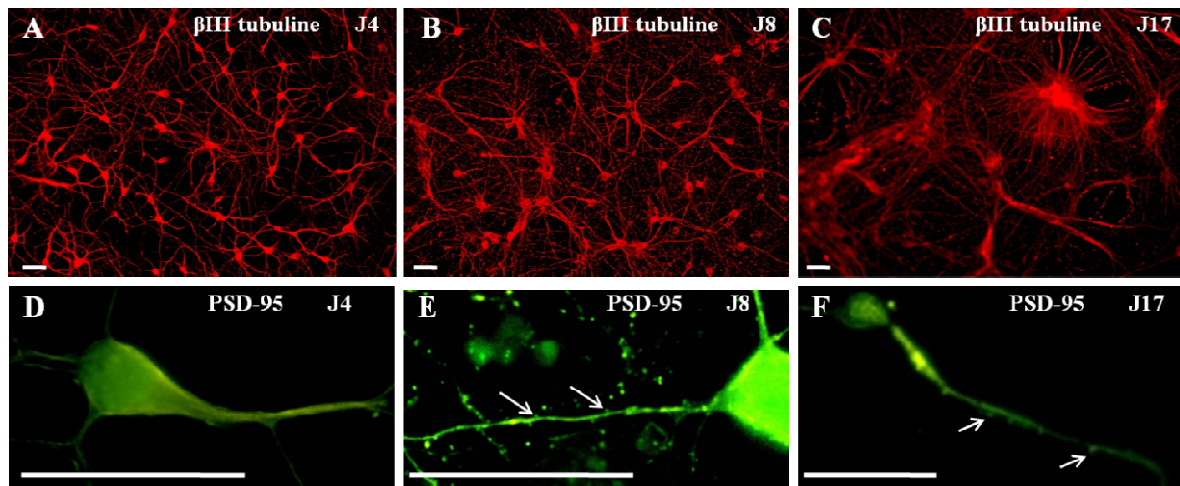


Figure 26 : Immunocytochimie anti β 3-tubuline et anti PSD-95 à J4, J8 et J17 (cultures de neurones de souris). Les flèches indiquent la localisation des épines dendritiques. Barre d'échelle = 50 μ m.

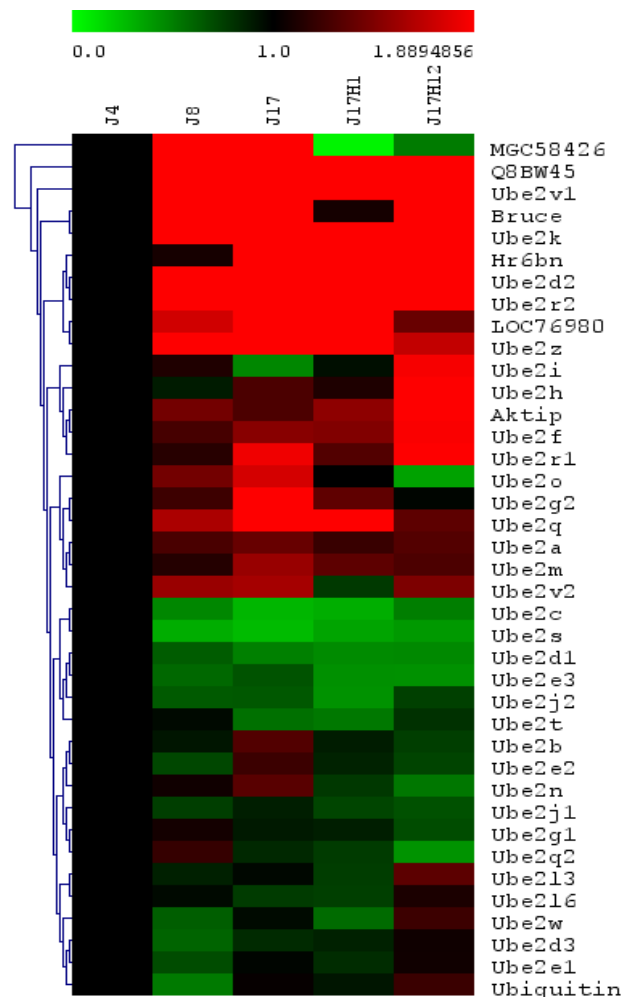


Figure 27 : Cluster hiérarchique représentant la classification des E2 étudiées en fonction de leur profil d'expression relative au cours du temps basé sur la méthode de calcul des $\Delta\Delta C_p$ normalisée à J4.

Une analyse hiérarchique a permis de classer les gènes E2 selon leur profil d'expression et d'extraire de nouveaux candidats dans l'autisme et la déficience mentale. Ces gènes sont en cours de séquençage dans des cohortes de patients. Par ailleurs, les études d'expression couplées à l'analyse *in silico* des promoteurs des gènes E2 nous permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la physiologie neuronale et la plasticité synaptique.

Conclusion

Mon travail de thèse a débuté par une clarification nécessaire de la nomenclature et des orthologies au sein de la superfamille des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine E2. Nous nous sommes concentrés sur sept espèces fréquemment étudiées dont les génomes ont été entièrement séquencés. Cette analyse met en évidence les spécificités de chaque espèce, qui sont importantes lors des études sur les fonctions et les orthologies chez des modèles animaux. En définissant le rôle des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine humaines, il deviendra également possible de comprendre leur implication dans diverses maladies.

Dans l'immédiat ce travail m'a surtout permis d'avoir une vision globale de la famille des E2 humaines et de sélectionner six gènes qui apparaissaient ainsi comme particulièrement intéressants dans le cadre de mes recherches sur les enzymes de conjugaison à l'ubiquitine pouvant être impliquées dans l'étiologie de l'autisme : *UBE2H*, *UBE2A*, *UBE2K*, *UBE2N*, *UBE2I* et *UBE2E3*.

Aucune mutation n'a pu être détectée pour aucun de ces six gènes dans notre population d'autistes. De plus notre étude n'a pu apporter aucun argument pour l'implication des gènes *UBE2K*, *UBE2A* et *UBE2N* dans la pathologie autistique. En revanche une association génotypique significative a pu être mise en évidence avec le polymorphisme rs61738651 du gène *UBE2E3*, semblant indiquer un rôle potentiel du gène *UBE2E3* dans l'autisme et pour lequel les études doivent donc être poursuivies.

De même concernant l'enzyme de conjugaison particulière *UBE2I* intervenant dans la sumoylation, notre étude a montré une forte association de l'allèle rare A du polymorphisme rs8063 situé au sein de l'exon 7 dans sa partie 3'UTR avec notre population de patients autistes. Des variations du gène *UBE2I* pourraient donc aussi jouer un rôle dans la physiopathologie de l'autisme.

Enfin le gène *UBE2H* a pu être associé au syndrome autistique, supportant l'hypothèse de son implication. Les recherches sur ce gène doivent donc être poursuivies afin de comprendre la façon dont *UBE2H* peut être à l'origine du développement d'une telle pathologie.

Suite à ces études génétiques, les études *in vitro* nous ont permis de mettre en évidence les rôles importants des enzymes *UBE2H* et *UBE2A* au cours de la neurogénèse. Nos résultats indiquent qu'*UBE2H* favorise la prolifération des cellules souches neurales tout en empêchant la différenciation neuronale. *UBE2H* pourrait survenir très tôt dans l'étiologie de l'autisme au cours du développement cérébral, en modifiant la maturation des neurones du système

nerveux central. Ce rôle éventuel d'UBE2H dans la différenciation des cellules neuronales permet de supposer qu'UBE2H pourrait également être à l'origine d'autres pathologies neurologiques du développement que l'autisme, tels que déficience mentale. Ces hypothèses peuvent en effet être rapprochées de la fonction d'*OMG*, situé sur le locus du gène *NFI* et associé à l'autisme (Mbarek *et al.*, 1999 ; Vourc'h *et al.*, 2003 ; Martin *et al.*, 2007), sur les cellules neurales en influençant négativement la prolifération des CSN sans modification de la croissance des neurites (Martin *et al.*, 2009), ainsi que des gènes impliqués dans les syndromes de macrocéphalie, et en particulier *PTEN* qui régule la prolifération des cellules souches neurales (Groszer *et al.*, 2001).

Nous avons par ailleurs montré qu'UBE2A pourrait jouer un rôle au cours de la phase de différenciation des cellules souches neurales en neurones en provoquant une augmentation de la taille des neurites. Ce défaut de croissance des neurites pourrait être la cause du retard mental observé chez les patients présentant une mutation stop au sein du gène *UBE2A*.

Plus globalement ces enzymes de la voie de l'ubiquitine sont impliquées dans l'ubiquitinylation des histones. Par conséquent, des mécanismes épigénétiques impliqués dans la neurogénèse pourraient avoir un rôle important dans l'étiologie de maladie touchant le développement du système nerveux central en général.

S'il semble évident que la voie de l'ubiquitine est une voie essentielle au bon développement et fonctionnement du système nerveux, et que toute perturbation du fonctionnement des enzymes clés de ce mécanisme telles que les enzymes E2 de conjugaison à l'ubiquitine engendrerait des anomalies au sein même du système nerveux central, le domaine reste encore largement à explorer, et la poursuite des recherches reste encouragée par ces premiers résultats sur le sujet qui apparaissent très prometteurs.

Bibliographie

Publications

Abrahams BS, Geschwind DH. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat. Rev. Genet*, 2008, 95, 341-55.

Aguilera M, Oliveros M, Martinez-Padron M, Barbas JA, Ferrus A. Ariadne-1: a vital Drosophila gene is required in development and defines a new conserved family of ring-finger proteins. *Genetics*, 2000, 155, 1231-44.

Aizenstein ML, Korf J. Aspects of influx and efflux of homovanillic acid of rat cerebrospinal fluid. *Brain Res*, 1978, 149(1):129-40.

Alarcón M, Abrahams BS, Stone JL, Duvall JA, Perederiy JV, Bomar JM, Sebat J, Wigler M, Martin CL, Ledbetter DH, Nelson SF, Cantor RM, Geschwind DH. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(1), 150-9.

Alarcón M, Cantor RM, Liu J, Gilliam TC, Geschwind DH; Autism Genetic Research Exchange Consortium. Evidence for a language quantitative trait locus on chromosome 7q in multiplex autism families. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(1), 60-71.

Alarcón M, Yonan AL, Gilliam TC, Cantor RM, Geschwind DH. Quantitative genome scan and Ordered-Subsets Analysis of autism endophenotypes support language QTLs. *Mol Psychiatry*, 2005, 10(8), 747-57.

Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Boudos R, DuBray MB, Oakes TR, Miller JN, Lu J, Jeong EK, McMahon WM, Bigler ED, Lainhart JE. Diffusion tensor imaging of the corpus callosum in Autism. *Neuroimage*, 2007, 34(1), 61-73.

Alfred S, Moore KM, Fitzgerald M, Waring RH. Plasma amino acid levels in children with autism and their families. *J Autism Dev Disord*, 2003, 33, 93–97.

Al-Hakim AK, Zagorska A, Chapman L, Deak M, Pegg M, Alessi DR. Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. *Biochem J*, 2008, 411(2), 249-60.

Allen DA. Autistic spectrum disorders: clinical presentation in preschool children. *Journal of Child Neurology*, 1988, 3(Suppl.), S48-56.

Amaral DG, Schumann CM, Nordahl CW. Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci*, 2008, 31, 137-145.

Amaral DG, Sinnamon HM. The locus coeruleus: neurobiology of a central noradrenergic nucleus. *Prog Neurobiol*, 1977, 9(3), 147-96.

- 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.
- Andersen PL, Zhou H, Pastushok L, Moraes T, McKenna S, Ziola B, Ellison MJ, Dixit VM, Xiao W. Distinct regulation of Ubc13 functions by the two ubiquitin-conjugating enzyme variants Mms2 and Uev1A. *J Cell Biol*, 2005, 170(5), 745-55.
- Anderson GM, Freedman DX, Cohen DJ, Volkmar FR, Hoder EL, McPhedran P, Minderaa RB, Hansen CR, Young JG. Whole blood serotonin in autistic and normal subjects. *J Child Psychol Psychiatry*, 1987, 28(6), 885-900.
- Anderson GM, Hoshino Y. *Neurochemical studies in autism*. In: Cohen DJ, Volkmar FR (Eds.) *Handbook of autism and pervasive developmental disorders (second edition)*. New-York: John Wiley Sons, 1997, 325-343 pp.
- Anderson GM. *Studies on the neurochemistry in autism*. In: Bauman ML, Kemper TL (Eds.) *The Neurobiology of Autism*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1994, 227-242 pp.
- Aravamudan B, Broadie K. Synaptic Drosophila UNC-13 is regulated by antagonistic G-protein pathways via a proteasome-dependent degradation mechanism. *J Neurobiol*, 2003, 54(3), 417-38.
- Arking DE, Cutler DJ, Brune CW, Teslovich TM, West K, Ikeda M, Rea A, Guy M, Lin S, Cook EH, Chakravarti A. A common genetic variant in the neurexine superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(1), 160-4.
- Aronson M, Hagberg B, Gillberg C. Attention deficits and autistic spectrum problems in children exposed to alcohol during gestation: a follow-up study. *Dev Med Child Neurol*, 1997, 39(9), 583-7.
- Asano E, Chugani DC, Muzik O, Behen M, Janisse J, Rothermel R, Mangner TJ, Chakraborty PK, Chugani HT. Autism in tuberous sclerosis complex is related to both cortical and subcortical dysfunction. *Neurology*, 2001, 57(7), 1269-77.
- Asato MR, Hardan AY. Neuropsychiatric problems in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol*, 2004, 19(4), 241-9.
- Ashley C, Pastushok L, McKenna S, Ellison MJ, Xiao W. Roles of mouse UBC13 in DNA postreplication repair and Lys63-linked ubiquitination. *Gene*, 2002, 285(1-2), 183-91.
- Ashley-Koch AE, Jaworski J, Ma de Q, Mei H, Ritchie MD, Skaar DA, Robert Delong G, Worley G, Abramson RK, Wright HH, Cuccaro ML, Gilbert JR, Martin ER, Pericak-Vance MA. Investigation of potential gene-gene interactions between APOE and RELN contributing to autism risk. *Psychiatr Genet*, 2007, 17(4), 221-6.

Auranen M, Vanhala R, Varilo T, Ayers K, Kempas E, Ylisaukko-Oja T, Sinsheimer JS, Peltonen L, Järvelä I. A genomewide screen for autism-spectrum disorders: evidence for a major susceptibility locus on chromosome 3q25-27. *Am J Hum Genet*, 2002, 71(4), 777-90.

Azuma Y, Arnaoutov A, Dasso M. SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis. *J Cell Biol*, 2003, 163(3), 477-87.

Baarends WM, van der Laan R, Grootegoed JA. Specific aspects of the ubiquitin system in spermatogenesis. *J Endocrinol Invest*, 2000, 23(9), 597-604.

Bacheré N, Diene G, Delagnes V, Molinas C, Moulin P, Tauber M. Early diagnosis and multidisciplinary care reduce the hospitalization time and duration of tube feeding and prevent early obesity in PWS infants. *Horm Res*, 2008, 69(1), 45-52.

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, 251, 63-77.

Bailey A, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, Montgomery M, Rutter M, Lantos P. A clinicopathological study of autism. *Brain*, 1998, 121(Pt 5), 889-905.

Bakkaloglu B, O'Roak BJ, Louvi A, Gupta AR, Abelson JF, Morgan TM, Chawarska K, Klin A, Ercan-Sencicek AG, Stillman AA, Tanriover G, Abrahams BS, Duvall JA, Robbins EM, Geschwind DH, Biederer T, Gunel M, Lifton RP, State MW. Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(1), 165-73.

Barberis C, Tribollet E. Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol*, 1996, 10(1), 119-54.

Barkovich AJ, Lindan CE. Congenital cytomegalovirus infection of the brain: imaging analysis and embryologic considerations. *AJNR Am J Neuroradiol*, 1994, 15(4), 703-15.

Barrett S, Beck JC, Bernier R, Bisson E, Braun TA, Casavant TL, Childress D, Folstein SE, Garcia M, Gardiner MB, Gilman S, Haines JL, Hopkins K, Landa R, Meyer NH, Mullane JA, Nishimura DY, Palmer P, Piven J, Purdy J, Santangelo SL, Searby C, Sheffield V, Singleton J, Slager S, *et al.* An autosomal genomic screen for autism. Collaborative linkage study of autism. *Am J Med Genet*, 1999, 88(6), 609-15.

Barthelemy C, Bruneau N, Cottet-Eymard JM, Domenech-Jouve J, Garreau B, Lelord G, Muh JP, Peyrin L. Urinary free and conjugated catecholamines and metabolites in autistic children. *J Autism Dev Disord*, 1988, 18(4), 583-91.

Barthélémy C, Roux S, Adrien JL, Hameury L, Guérin P, Garreau B, Fermanian J, Lelord G. Validation of the Revised Behavior Summarized Evaluation Scale. *J Autism Dev Disord*, 1997, 272, 139-153.

- Bauman M, Kemper TL. Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology*, 1985, 35(6), 866-74.
- Bauman ML, Kemper TL. *Neuroanatomic observations of the brain in autism*. In: Bauman ML, Kemper TL (Eds.) *The neurobiology of autism*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1994, 119-145 pp.
- Bauman ML. Brief report: neuroanatomic observations of the brain in pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord*, 1996, 26(2), 199-203.
- Bauman ML. Microscopic neuroanatomic abnormalities in autism. *Pediatrics*, 1991, 87(5 Pt 2), 791-6.
- Beaudet AL. Autism: highly heritable but not inherited. *Nat Med*, 2007, 13(5), 534-6.
- Bedford FK, Kittler JT, Muller E, Thomas P, Uren JM, Merlo D, Wisden W, Triller A, Smart TG, Moss SJ. GABA(A) receptor cell surface number and subunit stability are regulated by the ubiquitin-like protein Plic-1. *Nat Neurosci*, 2001, 4(9), 908-16.
- Belendiuk K, Belendiuk GW, Freedman DX. Blood monoamine metabolism in Huntington's disease. *Arch Gen Psychiatry*, 1980, 37(3), 325-32.
- Benayed R, Gharani N, Rossman I, Mancuso V, Lazar G, Kamdar S, Bruse SE, Tischfield S, Smith BJ, Zimmerman RA, Dicicco-Bloom E, Brzustowicz LM, Millonig JH. Support for the homeobox transcription factor gene ENGRAILED 2 as an autism spectrum disorder susceptibility locus. *Am J Hum Genet*, 2005, 77(5), 851-68.
- Ben-Saadon R, Zaaroor D, Ziv T, Ciechanover A. The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its *in vitro* histone H2A ligase activity. *Mol Cell*, 2006, 24(5), 701-11.
- Berger-Sweeney J. Using mice to model cognitive deficits in neurologic disorders: narrowing in on Rett syndrome. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2003, 3, 185-187.
- Bessis A, Bernard D, Triller A. Tumor necrosis factor-alpha and neuronal development. *Neuroscientist*, 2005, 11(4), 277-81.
- Bittigau P, Ikonomidou C. Glutamate in neurologic diseases. *J Child Neurol*, 1997, 12(8), 471-85.
- Blasi F, Bacchelli E, Pesaresi G, Carone S, Bailey AJ, Maestrini E; International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). Absence of coding mutations in the X-linked genes neuroligine 3 and neuroligine 4 in individuals with autism from the IMGSAC collection. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2006, 141B(3), 220-1.
- Bobée S, Mariette E, Tremblay-Leveau H, Caston J. Effects of early midline cerebellar lesion on cognitive and emotional functions in the rat. *Behav Brain Res*, 2000, 112, 107-117

Boccone L, Dessì V, Zappu A, Piga S, Piludu MB, Rais M, Massidda C, De Virgiliis S, Cao A, Loudianos G. Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome with reactive nodular lymphoid hyperplasia and autism and a PTEN mutation. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(18), 1965-9.

Boggio R, Chiocca S. Gam1 and the SUMO pathway. *Cell Cycle*, 2005, 4(4), 533-5.

Boggio R, Passafaro A, Chiocca S. Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation. *J Biol Chem*, 2007, 282(21), 15376-82.

Bohnsack RN, Haas AL. Conservation in the mechanism of Nedd8 activation by the human AppBp1-Uba3 heterodimer. *J Biol Chem*, 2003, 278(29), 26823-30.

Bolton PF, Griffiths PD. Association of tuberous sclerosis of temporal lobes with autism and atypical autism. *Lancet*, 1997, 349(9049), 392-5.

Bolton PF, Griffiths PD. Association of tuberous sclerosis of temporal lobes with autism and atypical autism. *Lancet*, 1997, 349(9049), 392-5.

Bonora E, Beyer KS, Lamb JA, Parr JR, Klauck SM, Benner A, Paolucci M, Abbott A, Ragoussis I, Poustka A, Bailey AJ, Monaco AP; International Molecular Genetic Study of Autism (IMGSAC). Analysis of reelin as a candidate gene for autism. *Mol Psychiatry*, 2003, 8(10), 885-92.

Borelina D, Engel N, Esperante S, Ferreira V, Ferrer M, Torrado M, Goldschmidt E, Francipane L, Szijan I. Combined cytogenetic and molecular analyses for the diagnosis of Prader-Willi/Angelman syndromes. *J Biochem Mol Biol*, 2004, 37(5), 522-6.

Brambilla F, Viani F, Rossotii V. Endocrine aspects of child psychoses. *Diseases of the Nervous System*, 1969, 30, 627-632.

Brambilla P, Hardan A, di Nemi SU, Perez J, Soares JC, Barale F. Brain anatomy and development in autism: review of structural MRI studies. *Brain Res Bull*, 2003, 61(6), 557-69.

Bruneau N, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Adrien JL, Barthélémy C. Cortical auditory processing and communication in children with autism: electrophysiological/behavioral relations. *Int J Psychophysiol*, 2003, 51(1), 17-25.

Bucan M, Abrahams BS, Wang K, Glessner JT, Herman EI, Sonnenblick LI, Alvarez Retuerto AI, Imielinski M, Hadley D, Bradfield JP, Kim C, Gidaya NB, Lindquist I, Hutman T, Sigman M, Kustanovich V, Lajonchere CM, Singleton A, Kim J, Wassink TH, McMahon WM, Owley T, Sweeney JA, Coon H, Nurnberger JI, Li M, Cantor RM, Minshew NJ, Sutcliffe JS, Cook EH, Dawson G, Buxbaum JD, Grant SF, Schellenberg GD, Geschwind DH, Hakonarson H. Genome-wide analyses of exonic copy number variants in a family-based study point to novel autism susceptibility genes. *PLoS Genet*, 2009, 5(6), e1000536.

- Büttner C, Sadtler S, Leyendecker A, Laube B, Griffon N, Betz H, Schmalzing G. Ubiquitination precedes internalization and proteolytic cleavage of plasma membrane-bound glycine receptors. *J Biol Chem*, 2001, 276(46), 42978-85.
- Burbea M, Dreier L, Dittman JS, Grunwald ME, Kaplan JM. Ubiquitin and AP180 regulate the abundance of GLR-1 glutamate receptors at postsynaptic elements in *C. elegans*. *Neuron*, 2002, 35(1), 107-20.
- Burroughs AM, Jaffee M, Iyer LM, Aravind L. Anatomy of the E2 ligase fold: implications for enzymology and evolution of ubiquitin/Ub-like protein conjugation. *J Struct Biol*, 2008, 162(2), 205-18.
- Butler JV, Whittington JE, Holland AJ, Boer H, Clarke D, Webb T. Prevalence of, and risk factors for, physical ill-health in people with Prader-Willi syndrome: a population-based study. *Dev Med Child Neurol*, 2002, 44(4), 248-55.
- Butler MG, Dasouki MJ, Zhou XP, Talebizadeh Z, Brown M, Takahashi TN, Miles JH, Wang CH, Stratton R, Pilarski R, Eng C. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J Med Genet*, 2005, 42(4), 318-21.
- Buxbaum JD, Cai G, Chaste P, Nygren G, Goldsmith J, Reichert J, Anckarsäter H, Rastam M, Smith CJ, Silverman JM, Hollander E, Leboyer M, Gillberg C, Verloes A, Betancur C. Mutation screening of the PTEN gene in patients with autism spectrum disorders and macrocephaly. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2007, 144B(4), 484-91.
- Buxbaum JD, Silverman JM, Smith CJ, Greenberg DA, Kilifarski M, Reichert J, Cook EH Jr, Fang Y, Song CY, Vitale R. Association between a GABRB3 polymorphism and autism. *Mol Psychiatry*, 2002, 7(3), 311-6.
- Buxbaum JD, Silverman JM, Smith CJ, Kilifarski M, Reichert J, Hollander E, Lawlor BA, Fitzgerald M, Greenberg DA, Davis KL. Evidence for a susceptibility gene for autism on chromosome 2 and for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(6), 1514-20.
- Calne D, Chase TN, Barbeau A. *Dopaminergic mechanisms*. In: Calne D, Chase TN, Barbeau A (Eds.) *Advances in Neurology Vol. 9*. New York: Raven Press, 1974, 81-92 pp.
- Campbell DB, D'Oronzio R, Garbett K, Ebert PJ, Mirnics K, Levitt P, Persico AM. Disruption of cerebral cortex MET signaling in autism spectrum disorder. *Ann Neurol*, 2007, 62(3), 243-50.
- Campbell DB, Sutcliffe JS, Ebert PJ, Militeri R, Bravaccio C, Trillo S, Elia M, Schneider C, Melmed R, Sacco R, Persico AM, Levitt P. A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(45), 16834-9.

- Campbell DS, Holt CE. Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*, 2001, 32(6), 1013-26.
- Campbell M, Friedman E, DeVito E, Greenspan L, Collins PJ. Blood serotonin in psychotic and brain damaged children. *J Autism Child Schizophr*, 1974, 4(1), 33-41.
- Cantor RM, Kono N, Duvall JA, Alvarez-Retuerto A, Stone JL, Alarcón M, Nelson SF, Geschwind DH. Replication of autism linkage: fine-mapping peak at 17q21. *Am J Hum Genet*, 2005, 76(6), 1050-6.
- Cantor RM, Yoon JL, Furr J, Lajonchere CM. Paternal age and autism are associated in a family-based sample. *Mol Psychiatry*, 2007, 12(5), 419-21.
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*, 1996, 383(6599), 443-6.
- Carlson BX, Elster L, Schousboe A. Pharmacological and functional implications of developmentally-regulated changes in GABA(A) receptor subunit expression in the cerebellum. *Eur J Pharmacol*, 1998, 352(1), 1-14.
- Carper RA, Courchesne E. Inverse correlation between frontal lobe and cerebellum sizes in children with autism. *Brain*, 2000, 123 (Pt 4), 836-44.
- Carper RA, Courchesne E. Localized enlargement of the frontal cortex in early autism. *Biol Psychiatry*, 2005, 57(2), 126-33.
- Carper RA, Moses P, Tigue ZD, Courchesne E. Cerebral lobes in autism: early hyperplasia and abnormal age effects. *Neuroimage*, 2002, 16(4), 1038-51.
- Casanova MF, Buxhoeveden DP, Brown C. Clinical and macroscopic correlates of minicolumnar pathology in autism. *J Child Neurol*, 2002, 17(9), 692-5.
- Casanova MF, van Kooten IA, Switala AE, van Engeland H, Heinsen H, Steinbusch HW, Hof PR, Trippe J, Stone J, Schmitz C. Minicolumnar abnormalities in autism. *Acta Neuropathol*, 2006, 112(3), 287-303.
- Casanova MF. Neuropathological and genetic findings in autism: the significance of a putative minicolumnopathy. *Neuroscientist*, 2006, 12(5), 435-41.
- Castermans D, Wilquet V, Steyaert J, Van de Ven W, Fryns JP, Devriendt K. Chromosomal anomalies in individuals with autism: a strategy towards the identification of genes involved in autism. *Autism*, 2004, 8(2), 141-61.
- Chakrabarti S, Fombonne E. Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *Am J Psychiatry*, 2005, 162(6), 1133-41.

- Chen B, Mariano J, Tsai YC, Chan AH, Cohen M, Weissman AM. The activity of a human endoplasmic reticulum-associated degradation E3, gp78, requires its Cue domain, RING finger, and an E2-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103, 341-346.
- Chen L, Madura K. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. *Cancer Res*, 2005, 65(13), 5599-606.
- Chen L, Toth M. Fragile X mice develop sensory hyperreactivity to auditory stimuli. *Neuroscience*, 2001, 103, 1043-1050.
- Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol*, 2005, 7(8), 758-65.
- Chess S. The meaning of classification. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1997, 36(5), 575.
- Chinnadurai G. Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(9), 1593-607.
- Chiu YH, Sun Q, Chen ZJ. E1-L2 activates both ubiquitin and FAT10. *Mol Cell*, 2007, 27(6), 1014-23.
- Choleris, E. et al. An estrogen-dependent four-gene micronet regulating social recognition: a study with oxytocin and estrogen receptor-alpha and -beta knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100, 6192-6197.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162(1), 156-9.
- Chugani DC, Muzik O, Behen M, Rothermel R, Janisse JJ, Lee J, Chugani HT. Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. *Ann Neurol*, 1999, 45(3), 287-95.
- Chugani DC, Muzik O, Rothermel R, Behen M, Chakraborty P, Mangner T, da Silva EA, Chugani HT. Altered serotonin synthesis in the dentatohalamocortical pathway in autistic boys. *Ann Neurol*, 1997, 42(4), 666-9.
- Ciechanover A. The ubiquitin proteolytic system: from an idea to the patient bed. *Proc Am Thorac Soc*, 2006, 3(1), 21-31.
- Clayton-Smith J, Watson P, Ramsden S, Black GC. Somatic mutation in MECP2 as a non-fatal neurodevelopmental disorder in males. *Lancet*, 2000, 356(9232), 830-2.
- Clifford S, Dissanayake C, Bui QM, Huggins R, Taylor AK, Loesch DZ. Autism spectrum phenotype in males and females with fragile X full mutation and premutation. *J Autism Dev Disord*, 2007, 37(4), 738-47.

- Cohen D, Pichard N, Tordjman S, Baumann C, Burglen L, Excoffier E, Lazar G, Mazet P, Pinquier C, Verloes A, Héron D. Specific genetic disorders and autism: clinical contribution towards their identification. *J Autism Dev Disord*, 2005, 35(1), 103-16.
- Cohen DJ, Caparulo BK, Shaywitz BA, Bowers MB Jr. Dopamine and serotonin metabolism in neuropsychiatrically disturbed children. CSF homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Arch Gen Psychiatry*, 1977, 34(5), 545-50.
- Cohen DJ, Shaywitz BA, Johnson WT, Bowers M Jr. Biogenic amines in autistic and atypical children. Cerebrospinal fluid measures of homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Arch Gen Psychiatry*, 1974, 31(6), 845-53.
- Cohen IL, Nolin SL, Sudhalter V, Ding XH, Dobkin CS, Brown WT. Mosaicism for the FMR1 gene influences adaptive skills development in fragile X-affected males. *Am J Med Genet*, 1996, 64(2), 365-9.
- Comery TA, Harris JB, Willems P, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94, 5401-5404.
- Comi AM, Zimmerman AW, Frye VH, Law PA, Peeden JN. Familial clustering of autoimmune disorders and evaluation of medical risk factors in autism. *J Child Neurol*, 1999, 14(6), 388-94.
- Comings DE, Comings BG, Muhleman D, Dietz G, Shahbahrani B, Tast D, Knell E, Kocsis P, Baumgarten R, Kovacs BW, *et al.* The dopamine D2 receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders. *JAMA*, 1991, 266(13), 1793-800.
- Comings DE, Gade R, Muhleman D, Sverd J. No association of a tyrosine hydroxylase gene tetranucleotide repeat polymorphism in autism, Tourette syndrome, or ADHD. *Biol Psychiatry*, 1995, 37(7), 484-6.
- Conciatori M, Stodgell CJ, Hyman SL, O'Bara M, Militeri R, Bravaccio C, Trillo S, Montecchi F, Schneider C, Melmed R, Elia M, Crawford L, Spence SJ, Muscarella L, Guarnieri V, D'Agruma L, Quattrone A, Zelante L, Rabinowitz D, Pascucci T, Puglisi-Allegra S, Reichelt KL, Rodier PM, Persico AM. Morphogenetic effect of the HOXA1 A218G polymorphism on head circumference in patients with autism. *Biol Psychiatry*, 2004, 55, 413-419.
- Conroy J, Cochrane L, Anney RJ, Sutcliffe JS, Carthy P, Dunlop A, Mullarkey M, O'hici B, Green AJ, Ennis S, Gill M, Gallagher L. Fine mapping and association studies in a candidate region for autism on chromosome 2q31-q32. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2009, 150B(4), 535-44.

Constantino JN, Lajonchere C, Lutz M, Gray T, Abbacchi A, McKenna K, Singh D, Todd RD. Autistic social impairment in the siblings of children with pervasive developmental disorders. *Am J Psychiatry*, 2006, 163(2), 294-6.

Cook EH Jr, Courchesne R, Lord C, Cox NJ, Yan S, Lincoln A, Haas R, Courchesne E, Leventhal BL. Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. *Mol Psychiatry*, 1997, 2(3), 247-50.

Cook EH Jr, Courchesne RY, Cox NJ, Lord C, Gonen D, Guter SJ, Lincoln A, Nix K, Haas R, Leventhal BL, Courchesne E. Linkage-disequilibrium mapping of autistic disorder, with 15q11-13 markers. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(5), 1077-83.

Cook EH Jr, Leventhal BL, Freedman DX. Free serotonin in plasma: autistic children and their first-degree relatives. *Biol Psychiatry*, 1988, 24(4), 488-91.

Cook EH Jr, Leventhal BL, Heller W, Metz J, Wainwright M, Freedman DX. Autistic children and their first-degree relatives: relationships between serotonin and norepinephrine levels and intelligence. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1990, 2(3), 268-74.

Cornish E. Gluten and casein free diets in autism: a study of the effects on food choice and nutrition. *J Hum Nutr Diet*, 2002, 15(4), 261-9.

Côté F, Fligny C, Bayard E, Launay JM, Gershon MD, Mallet J, Vodjdani G. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(1), 329-34.

Cottee PA, Abs EL-Osta YG, Nisbet AJ, Gasser RB. Ubiquitin-conjugating enzyme genes in *Oesophagostomum dentatum*. *Parasitol Res*, 2006, 99(2), 119-25.

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, Karns CM, Davis HR, Ziccardi R, Carper RA, Tigue ZD, Chisum HJ, Moses P, Pierce K, Lord C, Lincoln AJ, Pizzo S, Schreibman L, Haas RH, Akshoomoff NA, Courchesne RY. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study. *Neurology*, 2001, 57(2), 245-54.

Courchesne E, Müller RA, Saitoh O. Brain weight in autism: normal in the majority of cases, megalencephalic in rare cases. *Neurology*, 1999, 52(5), 1057-9.

Courchesne E, Redcay E, Kennedy DP. The autistic brain: birth through adulthood. *Curr Opin Neurol*, 2004, 17(4), 489-96.

Courchesne E, Saitoh O, Yeung-Courchesne R, Press GA, Lincoln AJ, Haas RH, Schreibman L. Abnormality of cerebellar vermal lobules VI and VII in patients with infantile autism:

identification of hypoplastic and hyperplastic subgroups with MR imaging. *AJR Am J Roentgenol*, 1994, 162(1), 123-30.

Courchesne E, Yeung-Courchesne R, Press GA, Hesselink JR, Jernigan TL. Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. *N Engl J Med*, 1988, 318(21), 1349-54.

Courchesne E. Abnormal early brain development in autism. *Mol Psychiatry*, 2002, 7 Suppl 2, S21-3.

Crawley JN. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol*, 2007, 17(4), 448-59.

Crino PB. Molecular pathogenesis of tuber formation in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol*, 2004, 19(9), 716-25.

Croonenberghs J, Delmeire L, Verkerk R, Lin AH, Meskal A, Neels H, Van der Planken M, Scharpe S, Deboutte D, Pison G, Maes M. Peripheral markers of serotonergic and noradrenergic function in post-pubertal, caucasian males with autistic disorder. *Neuropsychopharmacology*, 2000, 22(3), 275-83.

Cuccaro ML, Wright HH, Abramson RK, Marsteller FA, Valentine J. Whole-blood serotonin and cognitive functioning in autistic individuals and their first-degree relatives. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1993, 5(1), 94-101.

Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. *Lancet*, 2008, 372(9639), 657-68.

Curatolo P, Porfirio MC, Manzi B, Seri S. Autism in tuberous sclerosis. *Eur J Paediatr Neurol*, 2004, 8(6), 327-32.

Curatolo P. The International Child Neurology Association: personal view. *J Child Neurol*, 2003, 18(11), 786-94.

Curran S, Roberts S, Thomas S, Veltman M, Browne J, Medda E, Pickles A, Sham P, Bolton PF. An association analysis of microsatellite markers across the Prader-Willi/Angelman critical region on chromosome 15 (q11-13) and autism spectrum disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2005, 137B(1), 25-8.

Davis E, Fennoy I, Laraque D, Kanem N, Brown G, Mitchell J. Autism and developmental abnormalities in children with perinatal cocaine exposure. *J Natl Med Assoc*, 1992, 84(4), 315-9.

de Pril R, Fischer DF, Roos RA, van Leeuwen FW. Ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K increases aggregate formation and cell death in polyglutamine diseases. *Mol Cell Neurosci*, 2007, 34(1), 10-9.

- Debonneville C, Staub O. Participation of the ubiquitin-conjugating enzyme UBE2E3 in Nedd4-2-dependent regulation of the epithelial Na⁺ channel. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(6), 2397-409.
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, 2000, 103(2), 351-61.
- DeStefano F. Vaccines and autism: evidence does not support a causal association. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 82(6), 756-9.
- Desterro JM, Thomson J, Hay RT. Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett*, 1997, 417(3), 297-300.
- Devlin B, Bennett P, Dawson G, Figlewicz DA, Grigorenko EL, McMahon W, Minshew N, Pauls D, Smith M, Spence MA, Rodier PM, Stodgell C, Schellenberg GD; CPEA Genetics Network. Alleles of a reelin CGG repeat do not convey liability to autism in a sample from the CPEA network. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2004, 126B(1), 46-50.
- DiAntonio A, Haghighi AP, Portman SL, Lee JD, Amaranto AM, Goodman CS. Ubiquitination-dependent mechanisms regulate synaptic growth and function. *Nature*, 2001, 412(6845), 449-52.
- Diergaarde L et al. Early amygdala damage disrupts performance on medial prefrontal cortex-related tasks but spares spatial learning and memory in the rat. *Neuroscience*, 2005, 130, 581–590
- Dierssen M, Fillat C, Crnic L, Arbones M, Florez J, Estivill X. Murine models for Down syndrome. *Physiol Behav*, 2001, 73, 859–871.
- DiMario FJ Jr. Brain abnormalities in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol*, 2004, 19(9), 650-7.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, 1999, 51(1), 7-61.
- Dittmar GA, Wilkinson CR, Jedrzejewski PT, Finley D. Role of a ubiquitin-like modification in polarized morphogenesis. *Science*, 2002, 295(5564), 2442-6.
- Doja A, Roberts W. Immunizations and autism: a review of the literature. *Can J Neurol Sci*, 2006, 33(4), 341-6.
- Duittoz AH, Hevor T. Primary culture of neural precursors from the ovine central nervous system (CNS). *J Neurosci Methods*, 2001, 107(1-2), 131-40.
- Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, Montagner M, Zacchigna L, Adorno M, Martello G, Stinchfield MJ, Soligo S, Morsut L, Inui M, Moro S, Modena N, Argenton F, Newfeld SJ,

- Piccolo S. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell*, 2009, 136(1), 123-35.
- Durfee LA, Kelley ML, Huibregtse JM. The basis for selective E1-E2 interactions in the ISG15 conjugation system. *J Biol Chem*, 2008, 283(35), 23895-902.
- Dutta S, Guhathakurta S, Sinha S, Chatterjee A, Ahmed S, Ghosh S, Gangopadhyay PK, Singh M, Usha R. Reelin gene polymorphisms in the Indian population: a possible paternal 5'UTR-CGG-repeat-allele effect on autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2007, 144B(1), 106-12.
- Dutta S, Sinha S, Ghosh S, Chatterjee A, Ahmed S, Usha R. Genetic analysis of reelin gene (RELN) SNPs: no association with autism spectrum disorder in the Indian population. *Neurosci Lett*, 2008, 441(1), 56-60.
- Duvall JA, Lu A, Cantor RM, Todd RD, Constantino JN, Geschwind DH. A quantitative trait locus analysis of social responsiveness in multiplex autism families. *Am J Psychiatry*, 2007, 164(4), 656-62.
- Dykens EM, Cassidy SB, King BH. Maladaptive behavior differences in Prader-Willi syndrome due to paternal deletion *versus* maternal uniparental disomy. *Am J Ment Retard*, 1999, 104(1), 67-77.
- Eaton EM, Sealy L. Modification of CCAAT/enhancer-binding protein-beta by the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family members, SUMO-2 and SUMO-3. *J Biol Chem*, 2003, 278(35), 33416-21.
- Edgecomb RS, Ghatti C, Schneiderman AM. Bendless alters thoracic musculature in *Drosophila*. *J Neurogenet*, 1993, 8(4), 201-19.
- Eeg-Olofsson O, al-Zuhair AG, Teebi AS, Zaki M, Daoud AS. A boy with the Rett syndrome? *Brain Dev*, 1990, 12(5), 529-32.
- Egaas B, Courchesne E, Saitoh O. Reduced size of corpus callosum in autism. *Arch Neurol*, 1995, 52(8), 794-801.
- Ehlers MD. Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci*, 2003, 6(3), 231-42.
- Eluvathingal TJ, Behen ME, Chugani HT, Janisse J, Bernardi B, Chakraborty P, Juhasz C, Muzik O, Chugani DC. Cerebellar lesions in tuberous sclerosis complex: neurobehavioral and neuroimaging correlates. *J Child Neurol*, 2006, 21(10), 846-51.
- Ernst M, Devi L, Silva RR, Gonzalez NM, Small AM, Malone RP, Campbell M. Plasma beta-endorphin levels, naltrexone, and haloperidol in autistic children. *Psychopharmacol Bull*, 1993, 29(2), 221-7.

- Ewart-Toland A, Briassouli P, de Koning JP, Mao JH, Yuan J, Chan F, MacCarthy-Morrogh L, Ponder BA, Nagase H, Burn J, Ball S, Almeida M, Linardopoulos S, Balmain A. Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nat Genet*, 2003, 34(4), 403-12.
- Ewens WJ, Spielman RS. What is the significance of a significant TDT? *Hum Hered*, 2005, 60, 206-210.
- Fang P, Lev-Lehman E, Tsai TF, Matsuura T, Benton CS, Sutcliffe JS, Christian SL, Kubota T, Halley DJ, Meijers-Heijboer H, Langlois S, Graham JM Jr, Beuten J, Willems PJ, Ledbetter DH, Beaudet AL. The spectrum of mutations in UBE3A causing Angelman syndrome. *Hum Mol Genet*, 1999, 81, 129-135.
- 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.
- Fatemi SH, Halt AR, Stary JM, Kanodia R, Schulz SC, Realmuto GR. Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices. *Biol Psychiatry*, 2002, 52(8), 805-10.
- Feligioni M, Nishimune A, Henley JM. Protein SUMOylation modulates calcium influx and glutamate release from presynaptic terminals. *Eur J Neurosci*, 2009, 29(7), 1348-56.
- Feng J, Schroer R, Yan J, Song W, Yang C, Bockholt A, Cook EH Jr, Skinner C, Schwartz CE, Sommer SS. High frequency of neurexine 1beta signal peptide structural variants in patients with autism. *Neurosci Lett*, 2006, 409(1), 10-3.
- Ferguson JN et al. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci*, 2001, 21, 8278–8285
- Ferguson JN et al. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet*, 2000, 25, 284–288
- Filipek PA, Accardo PJ, Baranek GT, Cook EH Jr, Dawson G, Gordon B, Gravel JS, Johnson CP, Kallen RJ, Levy SE, Minshew NJ, Ozonoff S, Prizant BM, Rapin I, Rogers SJ, Stone WL, Teplin S, Tuchman RF, Volkmar FR. The screening and diagnosis of autistic spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 1999, 29(6), 439-84.
- Flann S, Hawkes RB, Riederer BM, Rider CC, Beesley PW. Changes in ubiquitin immunoreactivity in developing rat brain: a putative role for ubiquitin and ubiquitin conjugates in dendrite outgrowth and differentiation. *NeuroScience*, 1997, 81(1), 173-87.
- Folstein S, Rutter M. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry*, 1977, 18(4), 297-321.

- Folstein SE, Rosen-Sheidley B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet*, 2001, 2, 943-955.
- Fombonne E. The prevalence of autism. *JAMA*, 2003, 289, 87–89.
- Frankland PW, Wang Y, Rosner B, Shimizu T, Balleine BW, Dykens EM, Ornitz EM, Silva AJ. Sensorimotor gating abnormalities in young males with fragile X syndrome and Fmr1-knockout mice. *Mol Psychiatry*, 2004, 9, 417–425.
- Freedman DX, Belendiuk K, Belendiuk GW, Crayton JW. Blood tryptophan metabolism in chronic schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry*, 1981, 38(6), 655-9.
- Gaffney GR, Kuperman S, Tsai LY, Minchin S. Morphological evidence for brainstem involvement in infantile autism. *Biol Psychiatry*, 1988, 24(5), 578-86.
- Garber HJ, Ritvo ER, Chiu LC, Griswold VJ, Kashanian A, Freeman BJ, Oldendorf WH. A magnetic resonance imaging study of autism: normal fourth ventricle size and absence of pathology. *Am J Psychiatry*, 1989, 146(4), 532-4.
- Gauthier J, Bonnel A, St-Onge J, Karemera L, Laurent S, Mottron L, Fombonne E, Joober R, Rouleau GA. NLGN3/NLGN4 gene mutations are not responsible for autism in the Quebec population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2005, 132B(1), 74-5.
- Gazdoui S, Yamoah K, Wu K, Pan ZQ. Human Cdc34 employs distinct sites to coordinate attachment of ubiquitin to a substrate and assembly of polyubiquitin chains. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(20), 7041-52.
- Gehrke SG, Riedel HD, Herrmann T, Hadaschik B, Bents K, Veltkamp C, Stremmel W. UbcH5A, a member of human E2 ubiquitin-conjugating enzymes, is closely related to SFT, a stimulator of iron transport, and is up-regulated in hereditary hemochromatosis. *Blood*, 2003, 101(8), 3288-93.
- Gervais H, Belin P, Boddaert N, Leboyer M, Coez A, Sfaello I, Barthélémy C, Brunelle F, Samson Y, Zilbovicius M. Abnormal cortical voice processing in autism. *Nat Neurosci*, 2004, 7(8), 801-2.
- Geschwind DH, Levitt P. Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Curr Opin Neurobiol*, 2007, 17(1), 103-11.
- Geschwind DH, Sowinski J, Lord C, Iversen P, Shestack J, Jones P, Ducat L, Spence SJ; AGRE Steering Committee. The autism genetic resource exchange: a resource for the study of autism and related neuropsychiatric conditions. *Am J Hum Genet*, 2001, 69(2), 463-6.
- Ghaziuddin M, Burmeister M. Deletion of chromosome 2q37 and autism: a distinct subtype? *J Autism Dev Disord*, 1999, 29(3), 259-63.

- Ghaziuddin M, Zaccagnini J, Tsai L, Elardo S. Is megalencephaly specific to autism? *J Intellect Disabil Res*, 1999, 43(Pt 4), 279-82.
- Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev*, 2004, 18(17), 2046-59.
- Gillberg C, Svennerholm L, Hamilton-Hellberg C. Childhood psychosis and monoamine metabolites in spinal fluid. *J Autism Dev Disord*, 1983, 13(4), 383-96.
- Gillberg C, Svennerholm L. CSF monoamines in autistic syndromes and other pervasive developmental disorders of early childhood. *Br J Psychiatry*, 1987, 151, 89-94.
- Gillberg C, Terenius L, Hagberg B, Witt-Engerström I, Eriksson I. CSF beta-endorphins in childhood neuropsychiatric disorders. *Brain Dev*, 1990, 12(1), 88-92.
- Gillberg C. Plasma beta-endorphin concentrations in autism. *J Autism Dev Disord*, 1992, 22(1), 131-3.
- 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, Glaberson W, Flory J, Otieno F, Garriss M, Soorya L, Klei L, Piven J, Meyer KJ, Anagnostou E, Sakurai T, Game RM, Rudd DS, Zurawiecki D, McDougle CJ, Davis LK, Miller J, Posey DJ, Michaels S, Kolevzon A, Silverman JM, Bernier R, Levy SE, Schultz RT, Dawson G, Owley T, McMahon WM, Wassink TH, Sweeney JA, Nurnberger JI, Coon H, Sutcliffe JS, Minshew NJ, Grant SF, Bucan M, Cook EH, Buxbaum JD, Devlin B, Schellenberg GD, Hakonarson H. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature*, 2009, 459(7246), 569-73.
- Goehring AS, Rivers DM, Sprague GF Jr. Urmylelation: a ubiquitin-like pathway that functions during invasive growth and budding in yeast. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(11), 4329-41.
- Goldman GS, Yazbak FE. An investigation of the association between MMR vaccination and autism in Denmark. *J Am Phy Surg*, 2004, 9(3), 70-5
- Goodwin MS, Cowen MA, Goodwin TC. Malabsorption and cerebral dysfunction: a multivariate and comparative study of autistic children. *J Autism Child Schizophr*, 1971, 1(1), 48-62.
- Goorden SM, van Woerden GM, van der Weerd L, Cheadle JP, Elgersma Y. Cognitive deficits in Tsc1+/- mice in the absence of cerebral lesions and seizures. *Ann Neurol*, 2007, 62(6), 648-55.
- Gottesman II, Gould TD. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry*, 2003, 160(4), 636-45.

Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Lesche R, Trumpp A, Zack JA, Kornblum HI, Liu X, Wu H. Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science*, 2001, 294(5549), 2186-9.

Guerrini R, Carrozzo R, Rinaldi R, Bonanni P. Angelman syndrome: etiology, clinical features, diagnosis, and management of symptoms. *Paediatr Drugs*, 2003, 5(10), 647-61.

Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL, Legallie 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, Tortorella G, Di Rosa G, Barthelemy C, Andres C, Faivre L, Frébourg T, Saugier Veber P, Champion D. 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.

Gupta S, Aggarwal S, Rashanravan B, Lee T. Th1 and Th2-like cytokines in CD4+ and CD8+ T cells in autism. *J Neuroimmunol*, 1998, 85(1), 106-9.

Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, Williams JR, Knight GJ, Gagnon J, O'Heir CE, Mitchell ML, Hermos RJ, Waisbren SE, Faix JD, Klein RZ. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N Engl J Med*, 1999, 341(8), 549-55.

Hagberg B, Aicardi J, Dias K, Ramos O. A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol*, 1983, 14(4), 471-9.

Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Kaufmann WE, Ono MY, Tartaglia N, Lachiewicz A, Kronk R, Delahunty C, Hessel D, Visootsak J, Picker J, Gane L, Tranfaglia M. Advances in the treatment of fragile X syndrome. *Pediatrics*, 2009, 123(1), 378-90.

Hagglund R, Roizman B. Herpes simplex virus 1 mutant in which the ICP0 HUL-1 E3 ubiquitin ligase site is disrupted stabilizes cdc34 but degrades D-type cyclins and exhibits diminished neurotoxicity. *J Virol*, 2007, 7(24), 13194-202.

Hall SS, Lightbody AA, Reiss AL. Compulsive, self-injurious, and autistic behavior in children and adolescents with fragile X syndrome. *Am J Ment Retard*, 2008, 113(1), 44-53.

Hamerman JA, Hayashi F, Schroeder LA, Gygi SP, Haas AL, Hampson L, Coughlin P, Aebersold R, Aderem A. Serpin 2a is induced in activated macrophages and conjugates to a ubiquitin homolog. *J Immunol*, 2002, 168(5), 2415-23.

Hanley HG, Stahl SM, Freedman DX. Hyperserotonemia and amine metabolites in autistic and retarded children. *Arch Gen Psychiatry*, 1977, 34(5), 521-31.

- Happé F, Frith U. The weak coherence account: detail-focused cognitive style in autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 2006, 36(1), 5-25.
- Hardan AY, Minshew NJ, Keshavan MS. Corpus callosum size in autism. *Neurology*, 2000, 55(7), 1033-6.
- Hashimoto T, Tayama M, Miyazaki M, Murakawa K, Kuroda Y. Brainstem and cerebellar vermis involvement in autistic children. *J Child Neurol*, 1993, 8(2), 149-53.
- Hashimoto T, Tayama M, Miyazaki M, Sakurama N, Yoshimoto T, Murakawa K, Kuroda Y. Reduced brainstem size in children with autism. *Brain Dev*, 1992, 14(2), 94-7.
- Hatton DD, Sideris J, Skinner M, Mankowski J, Bailey DB Jr, Roberts J, Mirrett P. Autistic behavior in children with fragile X syndrome: prevalence, stability, and the impact of FMRP. *Am J Med Genet A*, 2006, 140A(17), 1804-13.
- Hebebrand J, Martin M, Körner J, Roitzheim B, de Braganca K, Werner W, Remschmidt H. Partial trisomy 16p in an adolescent with autistic disorder and Tourette's syndrome. *Am J Med Genet*, 1994, 543, 268-270.
- Hérault J, Martineau J, Petit E, Perrot A, Sauvage D, Barthélémy C, Mallet J, Müh JP, Lelord G. Genetic markers in autism: association study on short arm of chromosome 11. *J Autism Dev Disord*, 1994, 24(2), 233-6.
- Hérault J, Perrot A, Barthélémy C, Büchler M, Cherpi C, Leboyer M, Sauvage D, Lelord G, Mallet J, Müh JP. Possible association of c-Harvey-Ras-1 (HRAS-1) marker with autism. *Psychiatry Res*, 1993, 46(3), 261-7.
- Hérault J, Petit E, Martineau J, Perrot A, Lenoir P, Cherpi C, Barthélémy C, Sauvage D, Mallet J, Müh JP. Autism and genetics: clinical approach and association study with two markers of HRAS gene. *Am J Med Genet*, 1995, 60(4), 276-81.
- Herman GE, Butter E, Enrile B, Pastore M, Prior TW, Sommer A. Increasing knowledge of PTEN germline mutations: Two additional patients with autism and macrocephaly. *Am J Med Genet A*, 2007, 143(6), 589-93.
- Herman ZS, Stachura Z. Spinal effects of alpha-endorphin in mice. *Pol J Pharmacol Pharm*, 1986, 38(5-6), 449-53.
- Hernandez RN, Feinberg RL, Vaurio R, Passanante NM, Thompson RE, Kaufmann WE. Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: a longitudinal evaluation. *Am J Med Genet A*, 2009, 149A(6), 1125-37.
- Hershko A, Ciechanover A, Varshavsky A. The ubiquitin system. *Nat Med*, 2000, 6, 1073-1081.

- Hessl D, Tassone F, Loesch DZ, Berry-Kravis E, Leehey MA, Gane LW, Barbato I, Rice C, Gould E, Hall DA, Grigsby J, Wegelin JA, Harris S, Lewin F, Weinberg D, Hagerman PJ, Hagerman RJ. Abnormal elevation of FMR1 mRNA is associated with psychological symptoms in individuals with the fragile X premutation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2005, 139B(1), 115-21.
- Hill JM, Ades AM, McCune SK, Sahir N, Moody EM, Abebe DT, Crnic LS, Brenneman DE. Vasoactive intestinal peptide in the brain of a mouse model of Down syndrome. *Exp Neurol*, 2003, 183, 56–65.
- Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 2002, 419(6903), 135-41.
- Hofmann RM, Pickart CM. In vitro assembly and recognition of Lys-63 polyubiquitin chains. *J Biol Chem*, 2001, 276(30), 27936-43.
- Hofmann RM, Pickart CM. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*, 1999, 96(5), 645-53.
- Hollander E, King A, Delaney K, Smith CJ, Silverman JM. Obsessive-compulsive behaviors in parents of multiplex autism families. *Psychiatry Res*, 2003, 117(1), 11-6.
- Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, Greenberg F. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics*, 1993, 91(2), 398-402.
- Holtum JR, Minshew NJ, Sanders RS, Phillips NE. Magnetic resonance imaging of the posterior fossa in autism. *Biol Psychiatry*, 1992, 32(12), 1091-101.
- Hondermarck H, Sy J, Bradshaw RA, Arfin SM. Dipeptide inhibitors of ubiquitin-mediated protein turnover prevent growth factor-induced neurite outgrowth in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 189(1), 280-8.
- Hori T, Osaka F, Chiba T, Miyamoto C, Okabayashi K, Shimbara N, Kato S, Tanaka K. Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene*, 1999, 18(48), 6829-34.
- Howard MT, Shirts BH, Zhou J, Carlson CL, Matsufuji S, Gesteland RF, Weeks RS, Atkins JF. Cell culture analysis of the regulatory frameshift event required for the expression of mammalian antizymes. *Genes Cells*, 2001, 6(11), 931-41.
- Howard RA, Sharma P, Hajjar C, Caldwell KA, Caldwell GA, du Breuil R, Moore R, Boyd L. Ubiquitin conjugating enzymes participate in polyglutamine protein aggregation. *BMC Cell Biol*, 2007, 8, 32.

- Huber CG, Oefner PJ, Bonn GK. High-performance liquid chromatographic separation of detritylated oligonucleotides on highly cross-linked poly-(styrene-divinylbenzene) particles. *J Chromatogr*, 1992, 599(1-2), 113-8.
- Hussman JP. Suppressed GABAergic inhibition as a common factor in suspected etiologies of autism. *J Autism Dev Disord*, 2001, 31(2), 247-8.
- 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.
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 2000, 408(6811), 488-92.
- Ideguchi H, Ueda A, Tanaka M, Yang J, Tsuji T, Ohno S, Hagiwara E, Aoki A, Ishigatsubo Y. Structural and functional characterization of the USP11 deubiquitinating enzyme, which interacts with the RanGTP-associated protein RanBPM. *Biochem J*, 2002, 367(Pt 1), 87-95.
- Ingram JL, Peckham SM, Tisdale B, Rodier PM. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol Teratol*, 2000, 22, 319-324.
- Insel TR, O'Brien DJ, Leckman JF. Oxytocin, vasopressin, and autism: is there a connection? *Biol Psychiatry*, 1999, 45(2), 145-57.
- Insel TR, Shapiro LE. Oxytocin receptors and maternal behavior. *Ann NY Acad Sci*, 1992, 652, 122-41.
- International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). A genomewide screen for autism: strong evidence for linkage to chromosomes 2q, 7q, and 16p. *Am J Hum Genet*, 2001, 69(3), 570-81.
- International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(3), 571-8.
- International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). Further characterization of the autism susceptibility locus AUTS1 on chromosome 7q. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(9), 973-82.
- Ishida T, Mizushima S, Azuma S, Kobayashi N, Tojo T, Suzuki K, Aizawa S, Watanabe T, Mosialos G, Kieff E, Yamamoto T, Inoue J. Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol Chem*, 1996, 271(46), 28745-8.

Ito K, Adachi S, Iwakami R, Yasuda H, Muto Y, Seki N, Okano Y. N-Terminally extended human ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) mediate the ubiquitination of RING-finger proteins, ARA54 and RNF8. *Eur J Biochem*, 2001, 268(9), 2725-32.

Ito K, Kato S, Matsuda Y, Kimura M, Okano Y. cDNA cloning, characterization, and chromosome mapping of UBE2E3 (alias UbcH9), encoding an N-terminally extended human ubiquitin-conjugating enzyme. *Cytogenet Cell Genet*, 1999, 84(1-2), 99-104.

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.

JAMAin S, Quach H, Betancur C, Rastam 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.

Jedele KB. The overlapping spectrum of rett and angelman syndromes: a clinical review. *Semin Pediatr Neurol*, 2007, 14(3), 108-17.

Jenne DE, Tinschert S, Reimann H, Lasinger W, Thiel G, Hameister H, Kehrer-Sawatzki H. Molecular characterization and gene content of breakpoint boundaries in patients with neurofibromatosis type 1 with 17q11.2 microdeletions. *Am J Hum Genet*, 2001, 69(3), 516-27.

Jiang Y, Lev-Lehman E, Bressler J, Tsai TF, Beaudet AL. Genetics of Angelman syndrome. *Am J Hum Genet*, 1999, 65(1), 1-6.

Jiang YH, Armstrong D, Albrecht U, Atkins CM, Noebels JL, Eichele G, Sweatt JD, Beaudet AL. Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron*, 1998, 21, 799-811.

Jiang YH, Beaudet AL. Human disorders of ubiquitination and proteasomal degradation. *Curr Opin Pediatr*, 2004, 16(4), 419-26.

Jiang YH, Sahoo T, Michaelis RC, Bercovich D, Bressler J, Kashork CD, Liu Q, Shaffer LG, Schroer RJ, Stockton DW, Spielman RS, Stevenson RE, Beaudet AL. A mixed epigenetic/genetic model for oligogenic inheritance of autism with a limited role for UBE3A. *Am J Med Genet A*, 2004, 131(1), 1-10.

- Johnson CP, Myers SM; American Academy of *Pediatrics* Council on Children With Disabilities. Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*, 2007, 120(5), 1183-215.
- Jones D, Crowe E, Stevens TA, Candido EP. Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: ubiquitin-conjugating enzymes, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins. *Genome Biol*, 2002, 3(1), RESEARCH0002.
- Just MA, Cherkassky VL, Keller TA, Minshew NJ. Cortical activation and synchronization during sentence comprehension in high-functioning autism: evidence of underconnectivity. *Brain*, 2004, 127(Pt 8), 1811-21.
- Jyonouchi H, Sun S, Le H. Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *J Neuroimmunol*, 2001, 120(1-2), 170-9.
- Kaiser P, Mandl S, Schweiger M, Schneider R. Characterization of functionally independent domains in the human ubiquitin conjugating enzyme UbcH2. *FEBS Lett*, 1995, 377(2), 193-6.
- Kaiser P, Seufert W, Hofferer L, Kofler B, Sachsenmaier C, Herzog H, Jentsch S, Schweiger M, Schneide R. A human ubiquitin-conjugating enzyme homologous to yeast UBC8. *J Biol Chem*, 1994, 269, 8797-8802.
- Kalat JW. Speculations on similarities between autism and opiate addiction. *J Autism Child Schizophr*, 1978, 8(4), 477-9.
- Kalchman MA, Graham RK, Xia G, Koide HB, Hodgson JG, Graham KC, Goldberg YP, Gietz RD, Pickart CM, Hayden MR. Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem*, 1996, 271(32), 19385-94.
- Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous child*, 1943, 2, 217-250.
- Katayama ML, Pasini FS, Folgueira MA, Snitcovsky IM, Brentani MM. Molecular targets of 1,25(OH)2D3 in HC11 normal mouse mammary cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 84(1), 57-69.
- Kaufman AS, O'Neal MR, Avant AH, Long SW. Introduction to the Kaufman Assessment Battery for Children (K-ABC) for pediatric neuroclinicians. *J Child Neurol*, 1987, 2(1), 3-16.
- Kaufmann WE, Abrams MT, Chen W, Reiss AL. Genotype, molecular phenotype, and cognitive phenotype: correlations in fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, 1999, 83(4), 286-95.
- Kaufmann WE, Cortell R, Kau AS, Bukelis I, Tierney E, Gray RM, Cox C, Capone GT, Stanard P. Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: communication, social interaction, and specific behaviors. *Am J Med Genet A*, 2004, 129A(3), 225-34.

Kaufmann WE, Reiss AL. Molecular and cellular genetics of fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, 1999, 88(1), 11-24.

Kavakebi P, Hausott B, Tomasino A, Ingorokva S, Klimaschewski L. The N-end rule ubiquitin-conjugating enzyme, HR6B, is up-regulated by nerve growth factor and required for neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 29(4), 559-68.

Kayagaki N, Phung Q, Chan S, Chaudhari R, Quan C, O'Rourke KM, Eby M, Pietras E, Cheng G, Bazan JF, Zhang Z, Arnott D, Dixit VM. DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science*, 2007, 318(5856), 1628-32.

Kemper TL, Bauman ML. The contribution of neuropathologic studies to the understanding of autism. *Neurol Clin*, 1993, 11(1), 175-87.

Keng VW, Villanueva A, Chiang DY, Dupuy AJ, Ryan BJ, Matise I, Silverstein KA, Sarver A, Starr TK, Akagi K, Tessarollo L, Collier LS, Powers S, Lowe SW, Jenkins NA, Copeland NG, Llovet JM, Largaespada DA. A conditional transposon-based insertional mutagenesis screen for genes associated with mouse hepatocellular carcinoma. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(3), 264-74.

Kim HG, Kishikawa S, Higgins AW, Seong IS, Donovan DJ, Shen Y, Lally E, Weiss LA, Najm J, Kutsche K, Descartes M, Holt L, Braddock S, Troxell R, Kaplan L, Volkmar F, Klin A, Tsatsanis K, Harris DJ, Noens I, Pauls DL, Daly MJ, MacDonald ME, Morton CC, Quade BJ, Gusella JF. Disruption of neurexine 1 associated with autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(1), 199-207.

Kim KI, Giannakopoulos NV, Virgin HW, Zhang DE. Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation. *Mol Cell Biol*, 2004, 24, 9592-9600.

Kim SJ, Cox N, Courchesne R, Lord C, Corsello C, Akshoomoff N, Guter S, Leventhal BL, Courchesne E, Cook EH Jr. Transmission disequilibrium mapping at the serotonin transporter gene (SLC6A4) region in autistic disorder. *Mol Psychiatry*, 2002, 7(3), 278-88.

Kipreos ET. Ubiquitin-mediated pathways in *C. elegans*. *WormBook*, 2005, 1, 1-24.

Kirkpatrick DS, Hathaway NA, Hanna J, Elsasser S, Rush J, Finley D, King RW, Gygi SP. Quantitative analysis of *in vitro* ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(7), 700-10.

Kishino T, Lalande M, Wagstaff J. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet*, 1997, 15(1), 70-3.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 1998, 392(6676), 605-8.

- Klauck SM, Poustka F, Benner A, Lesch KP, Poustka A. Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? *Hum Mol Genet*, 1997, 6(13), 2233-8.
- Kleefstra T, Hamel BC. X-linked mental retardation: further lumping, splitting and emerging phenotypes. *Clin Genet*, 2005, 67(6), 451-67.
- Kluwe L, Siebert R, Gesk S, Friedrich RE, Tinschert S, Kehrer-Sawatzki H, Mautner VF. Screening 500 unselected neurofibromatosis 1 patients for deletions of the NF1 gene. *Hum Mutat*, 2004, 23(2), 111-6.
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, 1999, 96(5), 635-44.
- Koken MH, Hoogerbrugge JW, Jasper-Dekker I, de Wit J, Willemsen R, Roest HP, Grootegoed JA, Hoeijmakers JH. Expression of the ubiquitin-conjugating DNA repair enzymes HHR6A and B suggests a role in spermatogenesis and chromatin modification. *Dev Biol*, 1996, 173(1), 119-32.
- Koken MH, Reynolds P, Jaspers-Dekker I, Prakash L, Prakash S, Bootsma D, Hoeijmakers JH. Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene RAD6. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(20), 8865-9.
- Kooy RF. Of mice and the Fragile X syndrome. *Trends Genet*, 2003, 19, 148-154.
- Kornhuber J, Mack-Burkhardt F, Kornhuber ME, Riederer P. [3H]MK-801 binding sites in post-mortem human frontal cortex. *Eur J Pharmacol*, 1989, 162(3), 483-90.
- Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israël A, Wallach D, Courtois G. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature*, 2003, 424(6950), 801-5.
- Kraft E, Stone SL, Ma L, Su N, Gao Y, Lau OS, Deng XW, Callis J. Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2005, 139(4), 1597-611.
- Kramer K, Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM. In vitro release of [3H]5-hydroxytryptamine from fetal and maternal brain by drugs of abuse. *Brain Res Dev Brain Res*, 1994, 78(1), 142-6.
- Kwon CH, Luikart BW, Powell CM, Zhou J, Matheny SA, Zhang W, Li Y, Baker SJ, Parada LF. Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron*, 2006, 50(3), 377-88.
- Kyllerman M. On the prevalence of Angelman syndrome. *Am J Med Genet*, 1995, 59(3), 405.
- Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, Vargha-Khadem F, Monaco AP. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature*, 2001, 413(6855), 519-23.

- Laine A, Topisirovic I, Zhai D, Reed JC, Borden KL, Ronai Z. Regulation of p53 localization and activity by Ubc13. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(23), 8901-13.
- Lainhart JE, Bigler ED, Bocian M, Coon H, Dinh E, Dawson G, Deutsch CK, Dunn M, Estes A, Tager-Flusberg H et al. Head circumference and height in autism: a study by the Collaborative Program of Excellence in Autism. *Am J Med Genet A*, 2006, 140, 2257-2274.
- Lainhart JE, Piven J, Wzorek M, Landa R, Santangelo SL, Coon H, Folstein SE. Macrocephaly in children and adults with autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1997, 36(2), 282-90.
- Lake CR, Ziegler MG, Murphy DL. Increased norepinephrine levels and decreased dopamine-beta-hydroxylase activity in primary autism. *Arch Gen Psychiatry*, 1977, 34(5), 553-6.
- Lalande M, Calciano MA. Molecular epigenetics of Angelman syndrome. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(7-8), 947-60.
- Larsson HJ, Eaton WW, Madsen KM, Vestergaard M, Olesen AV, Agerbo E, Schendel D, Thorsen P, Mortensen PB. Risk factors for autism: perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status. *Am J Epidemiol*, 2005, 161(10), 916-25
- 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, Barthelemy C, Moraine C, Briault S. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligine family. *Am J Hum Genet*, 2004, 74(3), 552-7.
- Laumonnier F, Cuthbert PC, Grant SGN. The role of neuronal complexes in Human X-linked brain diseases. *Am J Hum Genet*, 2007, 80, 205-220.
- Launay JM, Bursztejn C, Ferrari P, Dreux C, Braconnier A, Zarifian E, Lancrenon S, Fermanian J. Catecholamines metabolism in infantile autism: a controlled study of 22 autistic children. *J Autism Dev Disord*, 1987, 17(3), 333-47.
- 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.
- Le Couteur A, Rutter M, Lord C, Rios P, Robertson S, Holdgrafer M, McLennan J. Autism diagnostic interview: a standardized investigator-based instrument. *J Autism Dev Disord*, 1989, 19, 363-387.

- Leboyer M, Bouvard MP, Launay JM, Tabuteau F, Waller D, Dugas M, Kerdelhue B, Lensing P, Panksepp J. Brief report: a double-blind study of naltrexone in infantile autism. *J Autism Dev Disord*, 1992, 22(2), 309-19.
- Leboyer M, Bouvard MP, Recasens C, Philippe A, Guilloud-Bataille M, Bondoux D, Tabuteau F, Dugas M, Panksepp J, Launay JM, *et al.* Difference between plasma N- and C-terminally directed beta-endorphin immunoreactivity in infantile autism. *Am J Psychiatry*, 1994, 151(12), 1797-801.
- Leboyer M, Philippe A, Bouvard M, Guilloud-Bataille M, Bondoux D, Tabuteau F, Feingold J, Mouren-Simeoni MC, Launay JM. Whole blood serotonin and plasma beta-endorphin in autistic probands and their first-degree relatives. *Biol Psychiatry*, 1999, 45(2), 158-63.
- Lee JT, Wheeler TC, Li L, Chin LS. Ubiquitination of alpha-synuclein by Siah-1 promotes alpha-synuclein aggregation and apoptotic cell death. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(6), 906-17.
- Lee M, Martin-Ruiz C, Graham A, Court J, Jaros E, Perry R, Iversen P, Bauman M, Perry E. Nicotinic receptor abnormalities in the cerebellar cortex in autism. *Brain*, 2002, 125(Pt 7), 1483-95.
- Lenoir P, Bodier C. *L'autisme de l'enfant : nouvelles approches pédopsychiatriques*. Paris : Congrès de psychiatrie et de neurologie de langue française, Médias Flashs, 2000.
- Leventhal BL, Cook EH Jr, Morford M, Ravitz A, Freedman DX. Relationships of whole blood serotonin and plasma norepinephrine within families. *J Autism Dev Disord*, 1990, 20(4), 499-511.
- Li J, Nguyen L, Gleason C, Lotspeich L, Spiker D, Risch N, Myers RM. Lack of evidence for an association between WNT2 and RELN polymorphisms and autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2004, 126B(1), 51-7.
- Li YP, Lecker SH, Chen Y, Waddell ID, Goldberg AL, Reid MB. TNF-alpha increases ubiquitin-conjugating activity in skeletal muscle by up-regulating UbcH2/E220k. *FASEB J*, 2003, 17(9), 1048-57.
- Li Z, Wang D, Na X, Schoen SR, Messing EM, Wu G. Identification of a deubiquitinating enzyme subfamily as substrates of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 294(3), 700-9.
- Lin SC, Chung JY, Lamothe B, Rajashankar K, Lu M, Lo YC, Lam AY, Darnay BG, Wu H. Molecular basis for the unique deubiquitinating activity of the NF-kappaB inhibitor A20. *J Mol Biol*, 2008, 376(2), 526-40.

Liu J, Nyholt DR, Magnussen P, Parano E, Pavone P, Geschwind D, Lord C, Iversen P, Hoh J, Ott J, Gilliam TC; Autism Genetic Resource Exchange Consortium. A genomewide screen for autism susceptibility loci. *Am J Hum Genet*, 2001, 69(2), 327-40.

Liu YP, Lin HI, Tzeng SF. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-18 modulate neuronal cell fate in embryonic neural progenitor culture. *Brain Res*, 2005, 1054(2), 152-8.

Lois LM, Lima CD. Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1. *EMBO J*, 2005, 24(3), 439-51.

Lord C, Cook EH, Leventhal BL, Amaral DG. Autism spectrum disorders. *Neuron*, 2000, 282, 355-364.

Lord C, Risi S, Lambrecht L, Cook Jr EH, Leventhal BL, DiLavore PC, Pickles A, Rutter M. The autism diagnostic observation schedule-generic: a standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. *J Autism Dev Disord*, 2000, 30, 205-223.

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 Autism Dev Disord*, 1994, 24, 659-685.

Lorick KL, Jensen JP, Weissman AM. Expression, purification, and properties of the Ubc4/5 family of E2 enzymes. *Methods Enzymol*, 2005, 398, 54-68.

Losh M, Adolphs R, Poe MD, Couture S, Penn D, Baranek GT, Piven J. Neuropsychological profile of autism and the broad autism phenotype. *Arch Gen Psychiatry*, 2009, 66(5), 518-26.

Losh M, Sullivan PF, Trembath D, Piven J. Current developments in the genetics of autism: from phenome to genome. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008, 67(9), 829-37.

Lotspeich LJ, Ciaranello RD. The neurobiology and genetics of infantile autism. *Int Rev Neurobiol*, 1993, 35, 87-129.

Luat AF, Makki M, Chugani HT. Neuroimaging in tuberous sclerosis complex. *Curr Opin Neurol*, 2007, 20(2), 142-50.

Lucito R, Healy J, Alexander J, Reiner A, Esposito D, Chi M, Rodgers L, Brady A, Sebat J, Troge J, West JA, Rostan S, Nguyen KC, Powers S, Ye KQ, Olshen A, Venkatraman E, Norton L, Wigler M. Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res*, 2003, 13(10), 2291-305.

Lüders J, Pyrowolakis G, Jentsch S. The ubiquitin-like protein HUB1 forms SDS-resistant complexes with cellular proteins in the absence of ATP. *EMBO Rep*, 2003, 4(12), 1169-74.

Lukusa T, Vermeesch JR, Holvoet M, Fryns JP, Devriendt K. Deletion 2q37.3 and autism: molecular cytogenetic mapping of the candidate region for autistic disorder. *Genet Couns*, 2004, 15(3), 293-301.

Lupski JR. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat Genet*, 2007, 39(7 Suppl), S43-7.

Ma DQ, Cuccaro ML, Jaworski JM, Haynes CS, Stephan DA, Parod J, Abramson RK, Wright HH, Gilbert JR, Haines JL, Pericak-Vance MA. Dissecting the locus heterogeneity of autism: significant linkage to chromosome 12q14. *Mol Psychiatry*, 2007, 12(4), 376-84.

Maas JW, Hattox SE, Greene NM, Landis DH. Estimates of dopamine and serotonin synthesis by the awake human brain. *J Neurochem*, 1980, 34(6), 1547-9.

Maddalena A, Richards CS, McGinniss MJ, Brothman A, Desnick RJ, Grier RE, Hirsch B, Jacky P, McDowell GA, Popovich B, Watson M, Wolff DJ. Technical standards and guidelines for fragile X: the first of a series of disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. Quality Assurance Subcommittee of the Laboratory Practice Committee. *Genet Med*, 2001, 3(3), 200-5.

Maestrini E, Lai C, Marlow A, Matthews N, Wallace S, Bailey A, Cook EH, Weeks DE, Monaco AP. Serotonin transporter (5-HTT) and gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. The International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. *Am J Med Genet*, 1999, 88(5), 492-6.

Maher KR, Harper JF, Macleay A, King MG. Peculiarities in the endocrine response to insulin stress in early infantile autism. *J Nerv Ment Dis*, 1975, 161(3), 180-4.

Malakhov MP, Kim KI, Malakhova OA, Jacobs BS, Borden EC, Zhang DE. High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *J Biol Chem*, 2003, 278(19), 16608-13.

Malzac P, Webber H, Moncla A, Graham JM, Kukolich M, Williams C, Pagon RA, Ramsdell LA, Kishino T, Wagstaff J. Mutation analysis of UBE3A in Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet*, 1998, 626, 1353-1360.

Manes F, Piven J, Vrancic D, Nanclares V, Plebst C, Starkstein SE. An MRI study of the corpus callosum and cerebellum in mentally retarded autistic individuals. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1999, 11(4), 470-4.

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, Summers A, Gibbons CA, Teebi A, Chitayat D, Weksberg R, Thompson A, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Baatjes R, Zwaigenbaum L, Roberts W, Fernandez B, Szatmari P, Scherer SW. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(2), 477-88.
- Martin CL, Ledbetter DH. Autism and cytogenetic abnormalities: solving autism one chromosome at a time. *Curr Psychiatry Rep*, 2007, 9(2), 141-7.
- Martin ER, Menold MM, Wolpert CM, Bass MP, Donnelly SL, Ravan SA, Zimmerman A, Gilbert JR, Vance JM, Maddox LO, Wright HH, Abramson RK, DeLong GR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA. Analysis of linkage disequilibrium in gamma-aminobutyric acid receptor subunit genes in autistic disorder. *Am J Med Genet*, 2000, 96(1), 43-8.
- Martin I, Andres CR, Védérine S, Tabagh R, Michelle C, Jourdan ML, Heuze-Vourc'h N, Corcia P, Duittoz A, Vourc'h P. Effect of the oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) on the expansion and neuronal differentiation of rat neural stem cells. *Brain Res*, 2009, 1284, 22-30.
- Martin I, Gauthier J, D'Amelio M, Védérine S, Vourc'h P, Rouleau GA, Persico AM, Andres CR. Transmission disequilibrium study of an oligodendrocyte and myelin glycoprotein gene allele in 431 families with an autistic proband. *Neurosci Res*, 2007, 59(4), 426-30.
- Martin I, Vourc'h P, Mahe M, Thepault RA, Antar C, Védérine S, Praline J, Camu W, Andres CR, Corcia P. Association study of the ubiquitin conjugating enzyme gene UBE2H in sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler*, 2008, 1-4.
- Martineau J, Barthélémy C, Jouve J, Muh JP, Lelord G. Monoamines (serotonin and catecholamines) and their derivatives in infantile autism: age-related changes and drug effects. *Dev Med Child Neurol*, 1992, 34(7), 593-603.
- Martineau J, Hérault J, Petit E, Guérin P, Hameury L, Perrot A, Mallet J, Sauvage D, Lelord G, Müh JP. Catecholaminergic metabolism and autism. *Dev Med Child Neurol*, 1994, 36(8), 688-97.
- Martinez-Noel G, Müller U, Harbers K. Identification of molecular determinants required for interaction of ubiquitin-conjugating enzymes and RING finger proteins. *Eur J Biochem*, 2001, 268(22), 5912-9.
- Martin-Ruiz CM, Lee M, Perry RH, Baumann M, Court JA, Perry EK. Molecular analysis of nicotinic receptor expression in autism. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004, 123(1-2), 81-90.
- Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene UBE3A in Angelman syndrome. *Nat Genet*, 1997, 151, 74-77.

- Maufroid JP, Bradshaw RA, Boilly B, Hondermarck H. Nerve growth factor induced neurite outgrowth from amphibian neuroepithelial precursor cells is prevented by dipeptides inhibiting ubiquitin-mediated proteolysis. *Int J Dev Biol*, 1996, 40(3), 609-11.
- Mbarek O, Marouillat S, Martineau J, Barthélémy C, Müh JP, Andres C. Association study of the NF1 gene and autistic disorder. *Am J Med Genet*, 1999, 88(6), 729-32.
- McBride PA, Anderson GM, Hertzog ME, Snow ME, Thompson SM, Khait VD, Shapiro T, Cohen DJ. Effects of diagnosis, race, and puberty on platelet serotonin levels in autism and mental retardation. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1998, 37(7), 767-76.
- McCauley JL, Olson LM, Delahanty R, Amin T, Nurmi EL, Organ EL, Jacobs MM, Folstein SE, Haines JL, Sutcliffe JS. A linkage disequilibrium map of the 1-Mb 15q12 GABA(A) receptor subunit cluster and association to autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2004, 131B(1), 51-9.
- McDougle CJ, Naylor ST, Cohen DJ, Aghajanian GK, Heninger GR, Price LH. Effects of tryptophan depletion in drug-free adults with autistic disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 1996, 53(11), 993-1000.
- McDougle CJ, Naylor ST, Cohen DJ, Volkmar FR, Heninger GR, Price LH. A double-blind, placebo-controlled study of fluvoxamine in adults with autistic disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 1996, 53(11), 1001-8.
- McKenna S, Moraes T, Pastushok L, Ptak C, Xiao W, Spyropoulos L, Ellison MJ. An NMR-based model of the ubiquitin-bound human ubiquitin conjugation complex Mms2.Ubc13. The structural basis for lysine 63 chain catalysis. *J Biol Chem*, 2003, 278(15), 13151-8.
- McKusick VA. Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. *Am J Hum Genet*, 2007, 80(4), 588-604.
- Meetei AR, Yan Z, Wang W. FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination. *Cell Cycle*, 2004, 3(2), 179-81.
- Melner MH, Haas AL, Klein JM, Brash AR, Boeglin WE, Nagdas SK, Winfrey VP, Olson GE. Demonstration of ubiquitin thiolester formation of UBE2Q2 (UBCi), a novel ubiquitin-conjugating enzyme with implantation site-specific expression. *Biol Reprod*, 2006, 75(3), 395-406.
- Minderaa RB, Anderson GM, Volkmar FR, Akkerhuis GW, Cohen DJ. Neurochemical study of dopamine functioning in autistic and normal subjects. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1989, 28(2), 190-4.

- Minderaa RB, Anderson GM, Volkmar FR, Akkerhuis GW, Cohen DJ. Noradrenergic and adrenergic functioning in autism. *Biol Psychiatry*, 1994, 36(4), 237-41.
- Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T, Ohsumi Y. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem*, 1998, 273(51), 33889-92.
- Mo YY, Moschos SJ. Targeting Ubc9 for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 2005, 96, 1203-1216.
- Modahl C, Green L, Fein D, Morris M, Waterhouse L, Feinstein C, Levin H. Plasma oxytocin levels in autistic children. *Biol Psychiatry*, 1998, 43(4), 270-7.
- Moeschler JB, Mohandas TK, Hawk AB, Noll WW. Estimate of prevalence of proximal 15q duplication syndrome. *Am J Med Genet*, 2002, 111(4), 440-2.
- Moessner R, Marshall CR, Sutcliffe JS, Skaug J, Pinto D, Vincent J, Zwaigenbaum L, Fernandez B, Roberts W, Szatmari P, Scherer SW. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet*, 2007, 81(6), 1289-97.
- Money J, Bobrow NA, Clarke FC. Autism and autoimmune disease: a family study. *J Autism Child Schizophr*, 1971, 1(2), 146-60.
- Moore RY, Bloom FE. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annu Rev Neurosci*, 1979, 2, 113-68.
- Moraes TF, Edwards RA, McKenna S, Pastushok L, Xiao W, Glover JN, Ellison MJ. Crystal structure of the human ubiquitin conjugating enzyme complex, hMms2-hUbc13. *Nat Struct Biol*, 2001, 8(8), 669-73.
- Moran TH, Capone GT, Knipp S, Davisson MT, Reeves RH, Gearhart JD. The effects of piracetam on cognitive performance in a mouse model of Down's syndrome. *Physiol Behav*, 2002, 77, 403-409.
- Moretti P, Bouwknecht JA, Teague R, Paylor R, Zoghbi HY. Abnormalities of social interactions and home-cage behavior in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet*, 2005, 14, 205-220.
- Moretti-Ferreira D, Koiffmann CP, Listik M, Setian N, Wajntal A. Macrosomia, obesity, macrocephaly and ocular abnormalities (MOMO syndrome) in two unrelated patients: delineation of a newly recognized overgrowth syndrome. *Am J Med Genet*, 1993, 46(5), 555-8.
- Moss J, Howlin P. Autism spectrum disorders in genetic syndromes: implications for diagnosis, intervention and understanding the wider autism spectrum disorder population. *J Intellect Disabil Res*, 2009, 53(10), 852-73.

- Mulder EJ, Anderson GM, Kema IP, Brugman AM, Ketelaars CE, de Bildt A, van Lang ND, den Boer JA, Minderaa RB. Serotonin transporter intron 2 polymorphism associated with rigid-compulsive behaviors in Dutch individuals with pervasive developmental disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2005, 133B(1), 93-6.
- Muralidhar MG, Thomas JB. The *Drosophila* bendless gene encodes a neural protein related to ubiquitin-conjugating enzymes. *Neuron*, 1993, 11(2), 253-66.
- Nagamitsu S. CSF beta-endorphin levels in pediatric neurologic disorders. *Kurume Med J*, 1993, 40(4), 233-41.
- Nakamura M, Xavier RM, Tanigawa Y. Monoclonal nonspecific suppressor factor beta inhibits interleukin-4 secretion by a type-2 helper T cell clone. *Eur J Immunol*, 1995, 25(8), 2417-9.
- Nalepa G, Rolfe M, Harper JW. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(7), 596-613.
- Nanson JL. Autism in fetal alcohol syndrome: a report of six cases. *Alcohol Clin Exp Res*, 1992, 16(3), 558-65.
- Narayan M, Srinath S, Anderson GM, Meundi DB. Cerebrospinal fluid levels of homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in autism. *Biological Psychiatry*, 1992, 33, 630-635.
- Narita N, Kato M, Tazoe M, Miyazaki K, Narita M, Okado N. Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide- and valproic acid-exposed rat: putative animal models for autism. *Pediatr Res*, 2002, 52(4), 576-9.
- Nascimento RM, Otto PA, de Brouwer AP, Vianna-Morgante AM. UBE2A, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet*, 2006, 793, 549-555.
- Nielsen DM, Derber WJ, McClellan DA, Crnic LS. Alterations in the auditory startle response in *Fmr1* targeted mutant mouse models of fragile X syndrome. *Brain Res*, 2002, 927, 8-17.
- Obin M, Lee BY, Meinke G, Bohm A, Lee RH, Gaudet R, Hopp JA, Arshavsky VY, Willardson BM, Taylor A. Ubiquitylation of the transducin betagamma subunit complex. Regulation by phosphducin. *J Biol Chem*, 2002, 277(46), 44566-75.
- Obin M, Mesco E, Gong X, Haas AL, Joseph J, Taylor A. Neurite outgrowth in PC12 cells. Distinguishing the roles of ubiquitylation and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Biol Chem*, 1999, 274(17), 11789-95.

- Oh CE, McMahon R, Benzer S, Tanouye MA. Bendless, a *Drosophila* gene affecting neuronal connectivity, encodes a ubiquitin-conjugating enzyme homolog. *J Neurosci*, 1994, 14, 3166-3179.
- 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), 1838-44.
- Ozkan E, Yu H, Deisenhofer J. Mechanistic insight into the allosteric activation of a ubiquitin-conjugating enzyme by RING-type ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(52), 18890-5.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*, 1995, 269(5224), 682-5.
- Pallante P, Berlingieri MT, Troncone G, Kruhoffer M, Orntoft TF, Viglietto G, Caleo A, Migliaccio I, Decaussin-Petrucci M, Santoro M, Palombini L, Fusco A. UbcH10 overexpression may represent a marker of anaplastic thyroid carcinomas. *Br J Cancer*, 2005, 93(4), 464-71.
- Panksepp J, Najam N, Soares F. Morphine reduces social cohesion in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1979, 11(2), 131-4.
- Pare CM, Sandler M, Stacey RS. 5-Hydroxyindoles in mental deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1960, 23, 341-6.
- Partington MW, Tu JB, Wong CY. Blood serotonin levels in severe mental retardation. *Dev Med Child Neurol*, 1973, 15(5), 616-27.
- Pastore YD, Jelinek J, Ang S, Guan Y, Liu E, Jedlickova K, Krishnamurti L, Prchal JT. Mutations in the VHL gene in sporadic apparently congenital polycythemia. *Blood*, 2003, 101(4), 1591-5.
- Pastushok L, Moraes TF, Ellison MJ, Xiao W. A single Mms2 "key" residue insertion into a Ubc13 pocket determines the interface specificity of a human Lys63 ubiquitin conjugation complex. *J Biol Chem*, 2005, 280(18), 17891-900.
- Patrick GN, Bingol B, Weld HA, Schuman EM. Ubiquitin-mediated proteasome activity is required for agonist-induced endocytosis of GluRs. *Curr Biol*, 2003, 13(23), 2073-81.
- Perry EK, Lee ML, Martin-Ruiz CM, Court JA, Volsen SG, Merrit J, Folly E, Iversen PE, Bauman ML, Perry RH, Wenk GL. Cholinergic activity in autism: abnormalities in the cerebral cortex and basal forebrain. *Am J Psychiatry*, 2001, 158(7), 1058-66.
- Persico AM, D'Agruma L, Maiorano N, Totaro A, Militeri R, Bravaccio C, Wassink TH, Schneider C, Melmed R, Trillo S, Montecchi F, Palermo M, Pascucci T, Puglisi Allegra S,

Reichelt KL, Conciatori M, Marino R, Quattrocchi CC, Baldi A, Zelante L, Gasparini P, Keller F. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. *Mol Psychiatry*, 2001, 6, 150-159.

Persico AM, Pascucci T, Puglisi-Allegra S, Militerni R, Bravaccio C, Schneider C, Melmed R, Trillo S, Montecchi F, Palermo M, Rabinowitz D, Reichelt KL, Conciatori M, Marino R, Keller F. Serotonin transporter gene promoter variants do not explain the hyperserotonemia in autistic children. *Mol Psychiatry*, 2002, 7(7), 795-800.

Petit E, Hérault J, Raynaud M, Cherpi C, Perrot A, Barthélémy C, Lelord G, Müh JP. X chromosome and infantile autism. *Biol Psychiatry*, 1996, 406, 457-464.

Philippe A, Martinez M, Guillaud-Bataille M, Gillberg C, Rastam M, Sponheim E, Coleman M, Zappella M, Aschauer H, Van Maldergem L, Penet C, Feingold J, Brice A, Leboyer M. Genome-wide scan for autism susceptibility genes. Paris Autism Research International Sibpair Study. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(5), 805-12.

Piccardi MP, Ardaù R, Chillotti C, Deleuze JF, Mallet J, Meloni R, Oi A, Severino G, Congiu D, Bayorek M, Del Zompo M. Manic-depressive illness: an association study with the inositol polyphosphate 1-phosphatase and serotonin transporter genes. *Psychiatr Genet*, 2002, 121, 23-27.

Pichler A, Knipscheer P, Oberhofer E, van Dijk WJ, Körner R, Olsen JV, Jentsch S, Melchior F, Sixma TK. SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12(3), 264-9.

Pickart CM, Fushman D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8(6), 610-6.

Pickart CM. Back to the future with ubiquitin. *Cell*, 2004, 116(2), 181-90.

Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70, 503-33.

Pickles A, Bolton P, Macdonald H, Bailey A, Le Couteur A, Sim CH, Rutter M. Latent-class analysis of recurrence risks for complex phenotypes with selection and measurement error: a twin and family history study of autism. *Am J Hum Genet*, 1995, 573, 717-726.

Pickles A, Starr E, Kazak S, Bolton P, Papanikolaou K, Bailey A, Goodman R, Rutter M. Variable expression of the autism broader phenotype: findings from extended pedigrees. *J Child Psychol Psychiatry*, 2000, 41(4), 491-502.

Piven J, Berthier ML, Starkstein SE, Nehme E, Pearlson G, Folstein S. Magnetic resonance imaging evidence for a defect of cerebral cortical development in autism. *Am J Psychiatry*, 1990, 147(6), 734-9.

- Piven J, Palmer P, Jacobi D, Childress D, Arndt S. Broader autism phenotype: evidence from a family history study of multiple-incidence autism families. *Am J Psychiatry*, 1997, 154(2), 185-90.
- Piven J. The biological basis of autism. *Curr Opin Neurobiol*, 1997, 7(5), 708-12.
- Plafker KS, Farjo KM, Wiechmann AF, Plafker SM. The human ubiquitin conjugating enzyme, UBE2E3, is required for proliferation of retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(12), 5611-8.
- Plans V, Scheper J, Soler M, Loukili N, Okano Y, Thomson TM. The RING finger protein RNF8 recruits UBC13 for lysine 63-based self polyubiquitylation. *J Cell Biochem*, 2006, 97(3), 572-82.
- Poliak S, Salomon D, Elhanany H, Sabanay H, Kiernan B, Pevny L, Stewart CL, Xu X, Chiu SY, Shrager P, Furley AJ, Peles E. Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J Cell Biol*, 2003, 162(6), 1149-60.
- Prudden J, Perry JJ, Arvai AS, Tainer JA, Boddy MN. Molecular mimicry of SUMO promotes DNA repair. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(5), 509-16.
- Purcell AE, Jeon OH, Zimmerman AW, Blue ME, Pevsner J. Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism. *Neurology*, 2001, 57(9), 1618-28.
- Putnam NH, Srivastava M, Hellsten U, Dirks B, Chapman J, Salamov A, Terry A, Shapiro H, Lindquist E, Kapitonov VV, Jurka J, Genikhovich G, Grigoriev IV, Lucas SM, Steele RE, Finnerty JR, Technau U, Martindale MQ, Rokhsar DS. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science*, 2007, 317(5834), 86-94.
- Raasi S, Schmidtke G, Groettrup M. The ubiquitin-like protein FAT10 forms covalent conjugates and induces apoptosis. *J Biol Chem*, 2001, 276(38), 35334-43.
- Ramser J, Ahearn ME, Lenski C, Yariz KO, Hellebrand H, von Rhein M, Clark RD, Schmutzler RK, Lichtner P, Hoffman EP, Meindl A, Baumbach-Reardon L. Rare missense and synonymous variants in UBE1 are associated with X-linked infantile spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(1), 188-93.
- Rapin I, Katzman R. Neurobiology of autism. *Ann Neurol*, 1998, 43(1), 7-14.
- Rapin I. Autism. *N Engl J Med*, 1997, 337(2), 97-104.
- Raskind MA, Peskind ER, Halter JB, Jimerson DC. Norepinephrine and MHPG levels in CSF and plasma in Alzheimer's disease. *Arch Gen Psychiatry*, 1984, 41(4), 343-6.
- Raymond GV, Bauman ML, Kemper TL. Hippocampus in autism: a Golgi analysis. *Acta Neuropathol*, 1996, 91(1), 117-9.

- Reichenberg A, Gross R, Weiser M, Bresnahan M, Silverman J, Harlap S, Rabinowitz J, Shulman C, Malaspina D, Lubin G, Knobler HY, Davidson M, Susser E. Advancing paternal age and autism. *Arch Gen Psychiatry*, 2006, 63(9), 1026-32.
- Rett A. On a unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood. *Wien Med Wochenschr*, 1966, 116(37), 723-6.
- Rice DS, Curran T. Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24, 1005-39.
- Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 1996, 273(5281), 1516-7.
- Risch N, Spiker D, Lotspeich L, Nouri N, Hinds D, Hallmayer J, Kalaydjieva L, McCague P, Dimiceli S, Pitts T, Nguyen L, Yang J, Harper C, Thorpe D, Vermeer S, Young H, Hebert J, Lin A, Ferguson J, Chiotti C, Wiese-Slater S, Rogers T, Salmon B, Nicholas P, Petersen PB, Pingree C, McMahon W, Wong DL, Cavalli-Sforza LL, Kraemer HC, Myers RM. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am J Hum Genet*, 1999, 652, 493-507.
- Ritvo ER, Freeman BJ, Scheibel AB, Duong T, Robinson H, Guthrie D, Ritvo A. Lower Purkinje cell counts in the cerebella of four autistic subjects: initial findings of the UCLA-NSAC Autopsy Research Report. *Am J Psychiatry*, 1986, 143(7), 862-6.
- Ritvo ER, Yuwiler A, Geller E, Ornitz EM, Saeger K, Plotkin S. Increased blood serotonin and platelets in early infantile autism. *Arch Gen Psychiatry*, 1970, 23(6), 566-72.
- Rizos H, Woodruff S, Kefford RF. p14ARF interacts with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and promotes the sumoylation of its binding partners. *Cell Cycle*, 2005, 4(4), 597-603.
- Robb SA, Pohl KR, Baraitser M, Wilson J, Brett EM. The 'happy puppet' syndrome of Angelman: review of the clinical features. *Arch Dis Child*, 1989, 641, 83-86.
- Roberts PJ, Woodruff GN, Iversen JJ. *Dopamine*. In: Roberts PJ, Woodruff GN, Iversen LL (Eds.) *Advances in biochemical psychopharmacology (vol 19)*. New York: Raven Press, 1978, 442 p.
- Robinson PD, Schutz CK, Macciardi F, White BN, Holden JJ. Genetically determined low maternal serum dopamine beta-hydroxylase levels and the etiology of autism spectrum disorders. *Am J Med Genet*, 2001, 100(1), 30-6.
- Robinson WP, Bottani A, Xie YG, Balakrishnan J, Binkert F, Mächler M, Prader A, Schinzel A. Molecular, cytogenetic, and clinical investigations of Prader-Willi syndrome patients. *Am J Hum Genet*, 1991, 49(6), 1219-34.
- Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S, Romano J. Embryological origin of autism: developmental anomalies of the cranial motor nuclei. *J Comp Neurol*, 1996, 24, 247-261.

- Rodriguez MS, Dargemont C, Hay RT. SUMO-1 conjugation *in vivo* requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem*, 2001, 276(16), 12654-12659.
- Roest HP, Baarends WM, de Wit J, van Klaveren JW, Wassenaar E, Hoogerbrugge JW, van Cappellen WA, Hoeijmakers JH, Grootegoed JA. The ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme HR6A is a maternal factor essential for early embryonic development in mice. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(12), 5485-95.
- Rojas DC, Bawn SD, Benkers TL, Reite ML, Rogers SJ. Smaller left hemisphere planum temporale in adults with autistic disorder. *Neurosci Lett*, 2002, 328(3), 237-40.
- Rolfe M, Beer-Romero P, Glass S, Eckstein J, Berdo I, Theodoras A, Pagano M, Draetta G. Reconstitution of p53-ubiquitinylation reactions from purified components: the role of human ubiquitin-conjugating enzyme UBC4 and E6-associated protein (E6AP). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(8), 3264-8.
- Román GC. Autism: transient *in utero* hypothyroxinemia related to maternal flavonoid ingestion during pregnancy and to other environmental antithyroid agents. *J Neurol Sci*, 2007, 262(1-2), 15-26.
- Ronald A, Happé F, Plomin R. The genetic relationship between individual differences in social and nonsocial behaviours characteristic of autism. *Dev Sci*, 2005, 8(5), 444-58.
- Ronald A, Happé F, Price TS, Baron-Cohen S, Plomin R. Phenotypic and genetic overlap between autistic traits at the extremes of the general population. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2006, 45(10), 1206-14.
- Roos J, Kelly RB. Preassembly and transport of nerve terminals: a new concept of axonal transport. *Nat Neurosci*, 2000, 3(5), 415-7.
- Ross DL, Klykylo WM, Anderson GM. Cerebrospinal fluid levels of homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in autism. *Annals of Neurology*, 1985, 18, 394.
- Ross DL, Klykylo WM, Hitzemann R. Reduction of elevated CSF beta-endorphin by fenfluramine in infantile autism. *Pediatr Neurol*, 1987, 3(2), 83-6.
- Rousseau F, Heitz D, Tarleton J, MacPherson J, Malmgren H, Dahl N, Barnicoat A, Mathew C, Mornet E, Tejada I, *et al.* A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile X syndrome, using direct diagnosis with probe StB12.3: the first 2,253 cases. *Am J Hum Genet*, 1994, 55(2), 225-37.
- Rousset CI, Chalon S, Cantagrel S, Bodard S, Andres C, Gressens P, Saliba E. Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. *Pediatr Res*, 2006, 59(3), 428-33.

- Rovet JF, Ehrlich R. Psychoeducational outcome in children with early-treated congenital hypothyroidism. *Pediatrics*, 2000, 105(3 Pt 1), 515-22.
- Roy A, Pickar D, De Jong J, Karoum F, Linnoila M. Norepinephrine and its metabolites in cerebrospinal fluid, plasma, and urine. Relationship to hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in depression. *Arch Gen Psychiatry*, 1988, 45(9), 849-57.
- Rozen S, Skaletsky HJ. *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. In: Krawetz S, Misener S (Eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press, 2000, 365-386 pp.
- Rumsey JM, Creasey H, Stepanek JS, Dorwart R, Patronas N, Hamburger SD, Duara R. Hemispheric asymmetries, fourth ventricular size, and cerebellar morphology in autism. *J Autism Dev Disord*, 1988, 18(1), 127-37.
- Rutter M, Kreppner J, Croft C, Murin M, Colvert E, Beckett C, Castle J, Sonuga-Barke E. Early adolescent outcomes of institutionally deprived and non-deprived adoptees. III. Quasi-autism. *J Child Psychol Psychiatry*, 2007, 48(12), 1200-7.
- Rutter M, Silberg J, O'Connor T, Simonoff E. Genetics and child psychiatry: II Empirical research findings. *J Child Psychol Psychiatry*, 1999, 40(1), 19-55.
- Rutter M. Concept of autism: a review of research. *J Child Psychol Psychiatry*, 1968, 9(1), 1-25.
- Sacco R, Militerni R, Frolli A, Bravaccio C, Gritti A, Elia M, Curatolo P, Manzi B, Trillo S, Lenti C *et al*. Clinical, morphological, and biochemical correlates of head circumference in autism. *Biol Psychiatry*, 2007, 62, 1038-1047.
- Salinger WL, Ladrow P, Wheeler C. Behavioral phenotype of the reeler mutant mouse: effects of RELN gene dosage and social isolation. *Behav Neurosci*, 2003, 117, 1257-1275.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Analysis of genomic DNA by southern hybridization*. In: Ford N, Nolan VC, Ferguson M (Eds.) *Molecular Clonings: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 9.31-9.62 pp.
- Sandman CA, Barron JL, Chicz-DeMet A, DeMet EM. Brief report: plasma beta-endorphin and cortisol levels in autistic patients. *J Autism Dev Disord*, 1991, 21(1), 83-7.
- Sarcevic B, Mawson A, Baker RT, Sutherland RL. Regulation of the ubiquitin-conjugating enzyme hHR6A by CDK-mediated phosphorylation. *EMBO J*, 2002, 21(8), 2009-18.
- Saville MK, Sparks A, Xirodimas DP, Wardrop J, Stevenson LF, Bourdon JC, Woods YL, Lane DP. Regulation of p53 by the ubiquitin-conjugating enzymes UbcH5B/C *in vivo*. *J Biol Chem*, 2004, 279(40), 42169-81.

Schaefer GB, Thompson JN, Bodensteiner JB, McConnell JM, Kimberling WJ, Gay CT, Dutton WD, Hutchings DC, Gray SB. Hypoplasia of the cerebellar vermis in neurogenetic syndromes. *Ann Neurol*, 1996, 39(3), 382-5.

Schellenberg GD, Dawson G, Sung YJ, Estes A, Munson J, Rosenthal E, Rothstein J, Flodman P, Smith M, Coon H, Leong L, Yu CE, Stodgell C, Rodier PM, Spence MA, Minshew N, McMahon WM, Wijsman EM. Evidence for multiple loci from a genome scan of autism kindreds. *Mol Psychiatry*, 2006, 11(11), 1049-60.

Schmahmann JD, Sherman JC. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain*, 1998, 121 (Pt 4), 561-79.

Schneider M, Koch M. Deficient social and play behavior in juvenile and adult rats after neonatal cortical lesion: effects of chronic pubertal cannabinoid treatment. *Neuropsychopharmacology*, 2005, 30, 80-89

Schoenfeld AR, Apgar S, Dolios G, Wang R, Aaronson SA. BRCA2 is ubiquitinated *in vivo* and interacts with USP11, a deubiquitinating enzyme that exhibits prosurvival function in the cellular response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(17), 7444-55.

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.

Schumann CM, Hamstra J, Goodlin-Jones BL, Lotspeich LJ, Kwon H, Buonocore MH, Lammers CR, Reiss AL, Amaral DG. The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. *J Neurosci*, 2004, 24(28), 6392-401.

Schwartzman JS, De Souza AM, Faiwichow G, Hercowitz LH. Rett phenotype in patient with XXY karyotype: case report. *Arq Neuropsiquiatr*, 1998, 56(4), 824-8.

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, Gregersen PK, Bregman J, Sutcliffe JS, Jobanputra V, Chung W, Warburton D, King MC, Skuse D, Geschwind DH, Gilliam TC, Ye K, Wigler M. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*, 2007, 316(5823), 445-9.

Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér 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, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, 2004, 305(5683), 525-8.

Sekul EA, Moak JP, Schultz RJ, Glaze DG, Dunn JK, Percy AK. Electrocardiographic findings in Rett syndrome: an explanation for sudden death? *J Pediatr*, 1994, 125(1), 80-2.

Semple CA; RIKEN GER Group; GSL Members. The comparative proteomics of ubiquitination in mouse. *Genome Res*, 2003, 13(6B), 1389-94.

Serajee FJ, Nabi R, Zhong H, Mahbubul Huq AH. Association of INPP1, PIK3CG, and TSC2 gene variants with autistic disorder: implications for phosphatidylinositol signalling in autism. *J Med Genet*, 2003, 40(11), 119.

Seri S, Cerquiglini A, Pisani F, Curatolo P. Autism in tuberous sclerosis: evoked potential evidence for a deficit in auditory sensory processing. *Clin Neurophysiol*, 1999, 110(10), 1825-30.

Shain RJ, Freedman DX. Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. *Journal of Pediatrics*, 1961, 58, 315-320.

Shao Y, Wolpert CM, Raiford KL, Menold MM, Donnelly SL, Ravan SA, Bass MP, McClain C, von Wendt L, Vance JM, Abramson RH, Wright HH, Ashley-Koch A, Gilbert JR, DeLong RG, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA. Genomic screen and follow-up analysis for autistic disorder. *Am J Med Genet*, 2002, 114(1), 99-105.

Shaw P, Greenstein D, Lerch J, Clasen L, Lenroot R, Gogtay N, Evans A, Rapoport J, Giedd J. Intellectual ability and cortical development in children and adolescents. *Nature*, 2006, 440(7084), 676-9.

Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L, Bobrow M, Carter NP. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet*, 2004, 41(4), 241-8.

Shekhar MP, Gerard B, Pauley RJ, Williams BO, Tait L. Rad6B is a positive regulator of beta-catenin stabilization. *Cancer Res*, 2008, 68(6), 1741-50.

Shembade N, Harhaj NS, Yamamoto M, Akira S, Harhaj EW. The human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein requires the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 for NF-kappaB activation. *J Virol*, 2007, 81(24), 13735-42.

Shen Z, Pardington-Purtymun PE, Comeaux JC, Moyzis RK, Chen DJ. Associations of UBE2I with RAD52, UBL1, p53, and RAD51 proteins in a yeast two-hybrid system. *Genomics*, 1996, 37(2), 183-6.

Sherman SL, Marsteller F, Abramowitz AJ, Scott E, Leslie M, Bregman J. Cognitive and behavioral performance among FMR1 high-repeat allele carriers surveyed from special education classes. *Am J Med Genet*, 2002, 114(4), 458-65.

Shiratori T, Shimada H, Kagaya A, Kuboshima M, Nabeya Y, Machida T, Goto K, Takiguchi M, Ochiai T, Hiwasa T. Sensitization against anticancer drugs by transfection with UBE2I variant gene into ras-NIH3H3 mouse fibroblasts. *Anticancer Res*, 2007, 27(5A), 3227-33.

Singh, VK, Rivas, WH. Prevalence of serum antibodies to caudate nucleus in autistic children. *Neurosci Lett*, 2004, 355, 53-56.

Sinkkonen ST, Homanics GE, Korpi ER. Mouse models of Angelman syndrome, a neurodevelopmental disorder, display different brain regional GABA(A) receptor alterations. *NeuroScience Lett*, 2003, 340, 205–208.

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997, 20(4), 399-407.

Song S, Lee H, Kam TI, Tai ML, Lee JY, Noh JY, Shim SM, Seo SJ, Kong YY, Nakagawa T, Chung CW, Choi DY, Oubrahim H, Jung YK. E2-25K/Hip-2 regulates caspase-12 in ER stress-mediated Abeta neurotoxicity. *J Cell Biol*, 2008, 182(4), 675-84.

Souphron J, Waddell MB, Paydar A, Tokgöz-Gromley Z, Roussel MF, Schulman BA. Structural dissection of a gating mechanism preventing misactivation of ubiquitin by NEDD8's E1. *Biochemistry*, 2008, 47(34), 8961-9.

Stahl SM. *Essential psychopharmacology: neuroscientific basis and clinical applications*. Cambridge: Cambridge University Press, 1996, 391 p.

Staropoli JF, McDermott C, Martinat C, Schulman B, Demireva E, Abeliovich A. Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron*, 2003, 37(5), 735-49.

Steffenburg S, Gillberg C, Hellgren L, Andersson L, Gillberg IC, Jakobsson G, Bohman M. A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *J Child Psychol Psychiatry*, 1989, 30(3), 405-16.

Steffenburg S, Gillberg CL, Steffenburg U, Kyllerman M. Autism in Angelman syndrome: a population-based study. *Pediatr Neurol*, 1996, 142, 131-136.

Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I. Possible role of USP26 in patients with severely impaired spermatogenesis. *Eur J Hum Genet*, 2005, 13(3), 336-40.

Strauss KA, Puffenberger EG, Huentelman MJ, Gottlieb S, Dobrin SE, Parod JM, Stephan DA, Morton DH. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *N Engl J Med*, 2006, 354(13), 1370-7.

Sun L, Chen ZJ. The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(2), 119-26.

- Sung P, Prakash S, Prakash L. The RAD6 protein of *Saccharomyces cerevisiae* polyubiquitinates histones, and its acidic domain mediates this activity. *Genes Dev*, 1988, 2(11), 1476-85.
- Suryavathi V, Khattri A, Gopal K, Rani DS, Panneerdoss S, Gupta NJ, Chakravarty B, Deenadayal M, Singh L, Thangaraj K. Novel variants in UBE2B gene and idiopathic male infertility. *J Androl*, 2008, 29(5), 564-71.
- Sutcliffe JS, Delahanty RJ, Prasad HC, McCauley JL, Han Q, Jiang L, Li C, Folstein SE, Blakely RD. Allelic heterogeneity at the serotonin transporter locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors. *Am J Hum Genet*, 2005, 77(2), 265-79.
- Swanson DA, Freund CL, Ploder L, McInnes RR, Valle D. A ubiquitin C-terminal hydrolase gene on the proximal short arm of the X chromosome: implications for X-linked retinal disorders. *Hum Mol Genet*, 1996, 5(4), 533-8.
- Sweeten TL, Posey DJ, McDougale CJ. Brief report: autistic disorder in three children with cytomegalovirus infection. *J Autism Dev Disord*, 2004, 34(5), 583-6.
- Szatmari P *et al.*, Autism Genome Project Consortium. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet*, 2007, 39(3), 319-28.
- Szatmari P, Jones MB, Zwaigenbaum L, MacLean JE. Genetics of autism: overview and new directions. *J Autism Dev Disord*, 1998, 28(5), 351-68.
- Szatmari P, MacLean JE, Jones MB, Bryson SE, Zwaigenbaum L, Bartolucci G, Mahoney WJ, Tuff L. The familial aggregation of the lesser variant in biological and nonbiological relatives of PDD probands: a family history study. *J Child Psychol Psychiatry*, 2000, 41(5), 579-86.
- Szatmari P. Heterogeneity and the genetics of autism. *J Psychiatry Neurosci*, 1999, 24(2), 159-65.
- Szatmari P. The causes of autism spectrum disorders. *BMJ*, 2003, 326(7382), 173-4.
- Tai HC, Schuman EM. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(11), 826-38.
- Takada K, Kanda T, Ohkawa K, Matsuda M. Ubiquitin and ubiquitin-protein conjugates in PC12h cells: changes during neuronal differentiation. *Neurochem Res*, 1994, 19(4), 391-8.
- Takahashi S, Kanai H, Miyamoto Y. Reassessment of elevated serotonin levels in blood platelets in early infantile autism. *J Autism Child Schizophr*, 1976, 6(4), 317-26.
- Takeuchi T, Yokosawa H. ISG15 modification of Ubc13 suppresses its ubiquitin-conjugating activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336(1), 9-13.

- Talebizadeh Z, Butler MG. Insulin resistance and obesity-related factors in Prader-Willi syndrome: comparison with obese subjects. *Clin Genet*, 2005, 67(3), 230-9.
- Tan Z, Qu W, Tu W, Liu W, Baudry M, Schreiber SS. p53 accumulation due to down-regulation of ubiquitin: relevance for neuronal apoptosis. *Cell Death Differ*, 2000, 7(7), 675-81.
- Tecott LH. The genes and brains of mice and men. *Am J Psychiatry*, 2003, 160, 646–656.
- Thomas JB, Wyman RJ. A mutation in *Drosophila* alters normal connectivity between two identified neurones. *Nature*, 1982, 298(5875), 650-1.
- Thomas JB, Wyman RJ. Mutations altering synaptic connectivity between identified neurons in *Drosophila*. *J Neurosci*, 1984, 4(2), 530-8.
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*, 2000, 19(1), 94-102.
- Tidmarsh L and Volkmar FR. Diagnosis and epidemiology of autism spectrum disorder. *The Can J of Psychiatry*, 2003, 48(8), 517-525.
- Tordjman S, Anderson GM, Botbol M, Brailly-Tabard S, Perez-Diaz F, Graignic R, Carlier M, Schmit G, Rolland AC, Bonnot O, Trabado S, Roubertoux P, Bronsard G. Pain reactivity and plasma beta-endorphin in children and adolescents with autistic disorder. *PLoS One*, 2009, 4(8), e5289.
- Tordjman S, Anderson GM, McBride PA, Hertzog ME, Snow ME, Hall LM, Thompson SM, Ferrari P, Cohen DJ. Plasma beta-endorphin, adrenocorticotropin hormone, and cortisol in autism. *J Child Psychol Psychiatry*, 1997, 38(6), 705-15.
- Tordjman S, Gutknecht L, Carlier M, Spitz E, Antoine C, Slama F, Carsalade V, Cohen DJ, Ferrari P, Roubertoux PL, Anderson GM. Role of the serotonin transporter gene in the behavioral expression of autism. *Mol Psychiatry*, 2001, 6(4), 434-9.
- Torres AR, Maciulis A, Stubbs EG, Cutler A, Odell D. The transmission disequilibrium test suggests that HLA-DR4 and DR13 are linked to autism spectrum disorder. *Hum Immunol*, 2002, 63(4), 311-6.
- Townsley FM, Aristarkhov A, Beck S, Hershko A, Ruderman JV. Dominant-negative cyclin-selective ubiquitin carrier protein E2-C/UbcH10 blocks cells in metaphase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(6), 2362-7.
- Trikalinos TA, Karvouni A, Zintzaras E, Ylisaukko-oja T, Peltonen L, Järvelä I, Ioannidis JP. A heterogeneity-based genome search meta-analysis for autism-spectrum disorders. *Mol Psychiatry*, 2006, 11(1), 29-36.
- Tuchman R, Rapin I. Epilepsy in autism. *Lancet Neurol*, 2002, 1(6), 352-8.

- Turner CA, Presti MF, Newman HA, Bugenhagen P, Crnic L, Lewis MH. Spontaneous stereotypy in an animal model of Down syndrome: ts65Dn mice. *Behav Genet*, 2001, 31, 393–400.
- Uchida D, Hatakeyama S, Matsushima A, Han H, Ishido S, Hotta H, Kudoh J, Shimizu N, Doucas V, Nakayama KI, Kuroda N, Matsumoto M. AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase. *J Exp Med*, 2004, 199(2), 167-72.
- Underhill PA, Jin L, Lin AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, Davis RW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res*, 1997, 7(10), 996-1005.
- Ushkaryov YA, Petrenko AG, Geppert M, Südhof TC. Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science*, 1992, 257(5066), 50-6.
- Uthaman SB, Godenschwege TA, Murphey RK. A mechanism distinct from highwire for the *Drosophila* ubiquitin conjugase bendless in synaptic growth and maturation. *J Neurosci*, 2008, 28(34), 8615-23.
- VanDemark AP, Hofmann RM, Tsui C, Pickart CM, Wolberger C. Molecular insights into polyubiquitin chain assembly: crystal structure of the Mms2/Ubc13 heterodimer. *Cell*, 2001, 105(6), 711-20.
- Vawter MP, Crook JM, Hyde TM, Kleinman JE, Weinberger DR, Becker KG, Freed WJ. Microarray analysis of gene expression in the prefrontal cortex in schizophrenia: a preliminary study. *Schizophr Res*, 2002, 58(1), 11-20.
- Veenstra-Vanderweele J, Christian SL, Cook EH Jr. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2004, 5, 379–405.
- Verdot L, Garreau B, Barthelemy C, Martineau J, Ferrer-Di-Martino M, Muh JP, Hoebeke J. Immunoreactivity of sera to a peptide derived from the serotonin 5-HT1A receptor in a group of children with developmental disorders: possible role in non-autistic epilepsy. *Int J Mol Med*, 1998, 1(1), 185-9.
- Vicedomini JP, Corwin JV, Nonneman AJ. Role of residual anterior neocortex in recovery from neonatal prefrontal lesions in the rat. *Physiol Behav*, 1982, 28, 797–806.
- Villagra NT, Navascues J, Casafont I, Val-Bernal JF, Lafarga M, Berciano MT. The PML-nuclear inclusion of human supraoptic neurons: a new compartment with SUMO-1- and ubiquitin-proteasome-associated domains. *Neurobiol Dis*, 2006, 21(1), 181-93.
- Vincent JB, Kolozsvari D, Roberts WS, Bolton PF, Gurling HM, Scherer SW. Mutation screening of X-chromosomal neuroleptine genes: no mutations in 196 autism probands. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2004, 129(1), 82-4.

- Vojdani A, Bazargan M, Vojdani E, Samadi J, Nourian AA, Eghbalieh N, Cooper EL. Heat shock protein and gliadin peptide promote development of peptidase antibodies in children with autism and patients with autoimmune disease. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(3), 515-24.
- Volkmar FR, Lord C, Bailey A, Schultz RT, Klin A. Autism and pervasive developmental disorders. *J Child Psychol Psychiatry*, 2004, 45, 135-170.
- Volkmar FR, Pauls D. Autism. *Lancet*, 2003, 362(9390), 1133-41.
- Vorstman JA, Staal WG, van Daalen E, van Engeland H, Hochstenbach PF, Franke L. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol Psychiatry*, 2006, 11(1), 18-28.
- Vourc'h P, Martin I, Bonnet-Brilhault F, Marouillat S, Barthélémy C, Müh JP, Andres C. Mutation screening and association study of the UBE2H gene on chromosome 7q32 in autistic disorder. *Psychiatr Genet*, 2003, 134, 221-5.
- Waage-Baudet H, Lauder JM, Dehart DB, Kluckman K, Hiller S, Tint GS, Sulik KK. Abnormal serotonergic development in a mouse model for the Smith-Lemli-Opitz syndrome: implications for autism. *Int J Dev Neurosci*, 2003, 21, 451–459.
- Waite KA, Eng C. Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(4), 829-44.
- Wang K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner JT, Abrahams BS, Salyakina D, Imielinski M, Bradfield JP, Sleiman PM, Kim CE, Hou C, Frackelton E, Chiavacci R, Takahashi N, Sakurai T, Rappaport E, Lajonchere CM, Munson J, Estes A, Korvatska O, Piven J, Sonnenblick LI, Alvarez Retuerto AI, Herman EI, Dong H, Hutman T, Sigman M, Ozonoff S, Klin A, Owley T, Sweeney JA, Brune CW, Cantor RM, Bernier R, Gilbert JR, Cuccaro ML, McMahon WM, Miller J, State MW, Wassink TH, Coon H, Levy SE, Schultz RT, Nurnberger JI, Haines JL, Sutcliffe JS, Cook EH, Minshew NJ, Buxbaum JD, Dawson G, Grant SF, Geschwind DH, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Hakonarson H. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature*, 2009, 459(7246), 528-33.
- Wang M, Suzuki T, Kitada T, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Tanaka K, Mizuno Y, Hattori N. Developmental changes in the expression of parkin and UbcR7, a parkininteracting and ubiquitin-conjugating enzyme, in rat brain. *J Neurochem*, 2001, 77, 1561-1568.
- Warren HS, Pembrey RG. Cyclosporin inhibits a two-signal mechanism for the generation of cytotoxic NK-like cells, from small lymphocyte precursors. *Immunol Lett*, 1986, 12(2-3), 69-75.

- Warren RP, Healey MC, Johnston AV, Sidwell RW, Radov LA, Murray RJ, Kinsolving CR. PR 879-317A enhances *in vitro* immune activity of peripheral blood mononuclear cells from patients with Down syndrome. *Int J Immunopharmacol*, 1987, 9(8), 919-26.
- Warren RP, Odell JD, Warren WL, Burger RA, Maciulis A, Daniels WW, Torres AR. Strong association of the third hypervariable region of HLA-DR beta 1 with autism. *J Neuroimmunol*, 1996, 67(2), 97-102.
- Warren RP, Singh VK, Cole P, Odell JD, Pingree CB, Warren WL, DeWitt CW, McCullough M. Possible association of the extended MHC haplotype B44-SC30-DR4 with autism. *Immunogenetics*, 1992, 36(4), 203-7.
- Warren RP, Singh VK, Cole P, Odell JD, Pingree CB, Warren WL, White E. Increased frequency of the null allele at the complement C4b locus in autism. *Clin Exp Immunol*, 1991, 83(3), 438-40.
- Wassif CA, Zhu P, Kratz L, Krakowiak PA, Battaile KP, Weight FF, Grinberg A, Steiner RD, Nwokoro NA, Kelley RI, Stewart RR, Porter FD. Biochemical, phenotypic and neurophysiological characterization of a genetic mouse model of RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Hum Mol Genet*, 2001, 10, 555–564.
- Wassink TH, Hazlett HC, Epping EA, Arndt S, Dager SR, Schellenberg GD, Dawson G, Piven J. Cerebral cortical gray matter overgrowth and functional variation of the serotonin transporter gene in autism. *Arch Gen Psychiatry*, 2007, 64(6), 709-17.
- Wassink TH, Piven J, Vieland VJ, Jenkins L, Frantz R, Bartlett CW, Goedken R, Childress D, Spence MA, Smith M, Sheffield VC. Evaluation of the chromosome 2q37.3 gene CENTG2 as an autism susceptibility gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2005, 136B(1), 36-44.
- Watanabe M, Mizusawa H, Takahashi H. Developmental regulation of rat Ubc13 and Uev1B genes in the nervous system. *Gene Expr Patterns*, 2007, 7(5), 614-9.
- Watanabe M, Takahashi K, Tomizawa K, Mizusawa H, Takahashi H. Developmental regulation of Ubc9 in the rat nervous system. *Acta Biochim Pol*, 2008, 554, 681-686.
- Watanabe TK, Fujiwara T, Kawai A, Shimizu F, Takami S, Hirano H, Okuno S, Ozaki K, Takeda S, Shimada Y, Nagata M, Takaichi A, Takahashi E, Nakamura Y, Shin S. Cloning, expression, and mapping of UBE2I, a novel gene encoding a human homologue of yeast ubiquitin-conjugating enzymes which are critical for regulating the cell cycle. *Cytogenet Cell Genet*, 1996, 721, 86-89.
- Watase K, Zoghbi HY. Modelling brain diseases in mice: the challenges of design and analysis. *Nat Rev Genet*, 2003, 4, 296–307.

- Watts RJ, Hoopfer ED, Luo L. Axon pruning during *Drosophila* metamorphosis: evidence for local degeneration and requirement of the ubiquitin-proteasome system. *Neuron*, 2003, 38(6), 871-85.
- Weaving LS, Ellaway CJ, Gécz J, Christodoulou J. Rett syndrome: clinical review and genetic update. *J Med Genet*, 2005, 42(1), 1-7.
- Webb SJ, Sparks BF, Friedman SD, Shaw DW, Giedd J, Dawson G, Dager SR. Cerebellar vermal volumes and behavioral correlates in children with autism spectrum disorder. *Psychiatry Res*, 2009, 172(1), 61-7.
- Webster JM, Tiwari S, Weissman AM, Wojcikiewicz RJ. Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Ubiquitination Is Mediated by Mammalian Ubc7, a Component of the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation Pathway, and Is Inhibited by Chelation of Intracellular Zn²⁺. *J Biol Chem*, 2003, 278, 38238–38246.
- Weeber EJ, Jiang YH, Elgersma Y, Varga AW, Carrasquillo Y, Brown SE, Christian JM, Mirnikjoo B, Silva A, Beaudet AL, Sweatt JD. Derangements of hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in a mouse model for Angelman mental retardation syndrome. *J Neurosci*, 2003, 23(7), 2634-44.
- Wefes I, Mastrandrea LD, Haldeman M, Koury ST, Tamburlin J, Pickart CM, Finley D. Induction of ubiquitin-conjugating enzymes during terminal erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(11), 4982-6.
- Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, Stefansson H, Ferreira MA, Green T, Platt OS, Ruderfer DM, Walsh CA, Altshuler D, Chakravarti A, Tanzi RE, Stefansson K, Santangelo SL, Gusella JF, Sklar P, Wu BL, Daly MJ; Autism Consortium. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med*, 2008, 358(7), 667-75.
- Weizman R, Gil-Ad I, Dick J, Tyano S, Szekely GA, Laron Z. Low plasma immunoreactive beta-endorphin levels in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1988, 27(4), 430-3.
- Weizman R, Weizman A, Tyano S, Szekely G, Weissman BA, Sarne Y. Humoral-endorphin blood levels in autistic, schizophrenic and healthy subjects. *Psychopharmacology (Berl)*, 1984, 82(4), 368-70.
- Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(8), 599-609.
- Wheeler TC, Chin LS, Li Y, Roudabush FL, Li L. Regulation of synaptophysin degradation by mammalian homologues of seven in absentia. *J Biol Chem*, 2002, 277(12), 10273-82.

- Whitaker-Azmitia PM. Serotonin and Brain Development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull*, 2001, 56(5), 479-85.
- Wilkinson KD. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J*, 1997, 11(14), 1245-56.
- Willemsen-Swinkels SH, Buitelaar JK, Weijnen FG, Thijssen JH, Van Engeland H. Plasma beta-endorphin concentrations in people with learning disability and self-injurious and/or autistic behaviour. *Br J Psychiatry*, 1996, 168(1), 105-9.
- Williams CA, Angelman H, Clayton SJ, Driscoll DJ, Hendrickson JE, Knoll JH, Magenis RE, Schinzel A, Wagstaff J, Whidden EM, Zori RT. Angelman syndrome: consensus for diagnostic criteria. Angelman Syndrome Foundation. *Am J Med Genet*, 1995, 56, 237-238.
- Williams CA, Zori RT, Hendrickson J, Stalker H, Marum T, Whidden E, Driscoll DJ. Angelman syndrome. *Curr Probl Pediatr*, 1995, 257, 216-231.
- Williams G, King J, Cunningham M, Stephan M, Kerr B, Hersh JH. Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Dev Med Child Neurol*, 2001, 43(3), 202-6.
- Williams RS, Hauser SL, Purpura DP, DeLong GR, Swisher CN. Autism and mental retardation: neuropathologic studies performed in four retarded persons with autistic behavior. *Arch Neurol*, 1980, 37(12), 749-53.
- Williamson SL, Christodoulou J. Rett syndrome: new clinical and molecular insights. *Eur J Hum Genet*, 2006, 14(8), 896-903.
- Wilson RC, Hughes RC, Flatt JW, Meehan EJ, Ng JD, Twigg PD. Structure of full-length ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K (huntingtin-interacting protein 2). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2009, 65(Pt 5), 440-4.
- Wilson SM, Bhattacharyya B, Rachel RA, Coppola V, Tessarollo L, Householder DB, Fletcher CF, Miller RJ, Copeland NG, Jenkins NA. Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in Usp14, encoding a ubiquitin-specific protease. *Nat Genet*, 2002, 32(3), 420-5.
- Wing SS, Dumas F, Banville D. A rabbit reticulocyte ubiquitin carrier protein that supports ubiquitin-dependent proteolysis (E214k) is homologous to the yeast DNA repair gene RAD6. *J Biol Chem*, 1992, 267(10), 6495-501.
- Winn PJ, Religa TL, Battey JN, Banerjee A, Wade RC. Determinants of functionality in the ubiquitin conjugating enzyme family. *Structure*, 2004, 12(9), 1563-74.
- Winsberg BG, Sverd J, Castells S, Hurwic M, Perel JM. Estimation of monoamine and cyclic-AMP turnover and amino acid concentrations of spinal fluid in autistic children. *NeuroPediatrics*, 1980, 11(3), 250-5.

- Wolff DJ, Clifton K, Karr C, Charles J. Pilot assessment of the subtelomeric regions of children with autism: detection of a 2q deletion. *Genet Med*, 2002, 4(1), 10-4.
- Wolterink G, Daenen LE, Dubbeldam S, Gerrits MA, van Rijn R, Kruse CG, Van Der Heijden JA, Van Ree JM. Early amygdala damage in the rat as a model for neurodevelopmental psychopathological disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2001, 11, 51-59.
- Woodhouse W, Bailey A, Rutter M, Bolton P, Baird G, Le Couteur A. Head circumference in autism and other pervasive developmental disorders. *J Child Psychol Psychiatry*, 1996, 37(6), 665-71.
- Xin H, Lin W, Sumanasekera W, Zhang Y, Wu X, Wang Z. The human RAD18 gene product interacts with HHR6A and HHR6B. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(14), 2847-54.
- Xirodimas DP, Saville MK, Bourdon JC, Hay RT, Lane DP. Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell*, 2004, 118(1), 83-97.
- Yamada T, Mitsuya K, Kayashima T, Yamasaki K, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Yamada H, Minakami H, Oshimura M, Niikawa N, Kishino T. Imprinting analysis of 10 genes and/or transcripts in a 1.5-Mb MEST-flanking region at human chromosome 7q32. *Genomics*, 2004, 83(3), 402-12.
- Yamamoto M, Okamoto T, Takeda K, Sato S, Sanjo H, Uematsu S, Saitoh T, Yamamoto N, Sakurai H, Ishii KJ, Yamaoka S, Kawai T, Matsuura Y, Takeuchi O, Akira S. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol*, 2006, 7(9), 962-70.
- Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Ogawa M, Wagstaff J, Kishino T. Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of Ube3a. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(8), 837-47.
- Yamashita Y, Fujimoto C, Nakajima E, Isagai T, Matsuishi T. Possible association between congenital cytomegalovirus infection and autistic disorder. *J Autism Dev Disord*, 2003, 4, 455-9.
- Yan J, Oliveira G, Coutinho A, Yang C, Feng J, Katz C, Sram J, Bockholt A, Jones IR, Craddock N, Cook EH Jr, Vicente A, Sommer SS. Analysis of the neuroleptine 3 and 4 genes in autism and other neuropsychiatric patients. *Mol Psychiatry*, 2005, 10(4), 329-32.
- Yan J, Yang XP, Kim YS, Joo JH, Jetten AM. RAP80 interacts with the SUMO-conjugating enzyme UBC9 and is a novel target for sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(1), 132-8.

- Yeargin-Allsopp M, Rice C, Karapurka, T, Doernberg N, Boyle C, Murphy C. Prevalence of autism in a US metropolitan area. *JAMA*, 2003, 289, 49-55.
- Yi JJ, Ehlers MD. Ubiquitin and protein turnover in synapse function. *Neuron*, 2005, 47(5), 629-32.
- Ying M, Zhan Z, Wang W, Chen D. Origin and evolution of ubiquitin-conjugating enzymes from *Guillardia theta* nucleomorph to hominoid. *Gene*, 2009, 447(2), 72-85.
- Yirmiya N, Pilowsky T, Nemanov L, Arbelle S, Feinsilver T, Fried I, Ebstein RP. Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism. *Am J Med Genet*, 2001, 105(4), 381-6.
- Yonan AL, Alarcon M, Cheng R, Magnusson PK, Spence SJ, Palmer AA, Grunn A, Juo SH, Terwilliger JD, Liu J, Cantor RM, Geschwind DH, Gilliam TC. A genomewide screen of 345 families for autism-susceptibility loci. *Am J Hum Genet*, 2003, 73(4), 886-97.
- Young JG, Cohen DJ, Brown SL, Caparulo BK. Decreased urinary free catecholamines in childhood autism. *J Am Acad Child Psychiatry*, 1978, 17(4), 671-8.
- Young JG, Cohen DJ, Kavanagh ME, Landis HD, Shaywitz BA, Maas JW. Cerebrospinal fluid, plasma, and urinary MHPG in children. *Life Sci*, 1981, 28(25), 2837-45.
- Young JG, Kavanagh ME, Anderson GM, Shaywitz BA, Cohen DJ. Clinical neurochemistry of autism and associated disorders. *J Autism Dev Disord*, 1982, 12(2), 147-65.
- Zhang H, Liu X, Zhang C, Mundo E, Macciardi F, Grayson DR, Guidotti AR, Holden JJ. Reelin gene alleles and susceptibility to autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry*, 2002, 7(9), 1012-7.
- Zhao BX, Chen HZ, Lei NZ, Li GD, Zhao WX, Zhan YY, Liu B, Lin SC, Wu Q. p53 mediates the negative regulation of MDM2 by orphan receptor TR3. *EMBO J*, 2006, 25(24), 5703-15.
- Zhao X, Leotta A, Kustanovich V, Lajonchere C, Geschwind DH, Law K, Law P, Qiu S, Lord C, Sebat J, Ye K, Wigler M. A unified genetic theory for sporadic and inherited autism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(31), 12831-6.
- Zhu H, Zhou ZM, Huo R, Huang XY, Lu L, Lin M, Wang LR, Zhou YD, Li JM, Sha JH. Identification and characteristics of a novel E1 like gene nUBE1L in human testis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2004, 36(3), 227-34.
- Ziegler MG, Wood JH, Lake R, Kopin IJ. Norepinephrine and 3-methoxy-4-hydroxyphenyl glycol gradients in human cerebrospinal fluid. *Am J Psychiatry*, 1977, 134(5), 565-8.

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(12), 1988-93.

Zilbovicius M, Garreau B, Samson Y, Remy P, Barthelemy C, Syrota A, Lelord G. Delayed maturation of the frontal cortex in childhood autism. *Am J Psychiatry*, 1995, 152(2), 248-52.

Ziv NE, Garner CC. Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5(5), 385-99.

Zoghbi HY. Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse? *Science*, 2003, 302(5646), 826–830.

Zou W, Papov V, Malakhova O, Kim KI, Dao C, Li J, Zhang DE. ISG15 modification of ubiquitin E2 Ubc13 disrupts its ability to form thioester bond with ubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336(1), 61-8.

Communication dans un congrès

Gilling M, Tümer Z, Bache I, Bak M, Niebuhr E, Bugge M, Cotteril RMJ, Brondum-Nielsen K, Kristoffersson U, Ropers HH, Tommerup N. 2003. FISH-mapping of translocation breakpoints associated with autism. *European Human Genetics Conference 2003, Birmingham, England, 2 mai 2003*. ESHG Poster P787 (<http://www.wjc.ku.dk/library/publications/eshg2003-gilling.pdf>)

Sites web consultés

BioEdit v7.0.9. [référence du 30 septembre 2009], <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

Blastp. [référence du 30 septembre 2009], <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

CodonCode Aligner. [référence du 30 septembre 2009], <http://www.codoncode.com/aligner/>

DOE Joint Genome Institute. [référence du 03 mars 2009], <http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/ToGo?accession=GO:0004840&species=nemve1&model=1&batchId=34>

Ensembl release 56. [référence du 30 septembre 2009], <http://www.ensembl.org/index.html>

FBAT 2.0.3. [référence du 30 septembre 2009], <http://www.biostat.harvard.edu/~fbat/default.html>

Genbank. [référence du 30 septembre 2009], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

Haploview. [référence du 30 septembre 2009], <http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>

Humane Genome Variation Society. [référence du 30 septembre 2009],
<http://www.hgvs.org/mutnomen/refseq.html>

MrBayes 3.1. [référence du 03 mars 2009], <http://mrbayes.csit.fsu.edu/>

Nematode Genome Sequencing Center. [référence du 03 mars 2009],
www.nematode.net/BLAST/

Phylip 3.65. [référence du 03 mars 2009], <http://www.phylip.com/>

PrimerBlast. [référence du 30 septembre 2009], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>

Protein Data Bank (PDB). [référence du 30 septembre 2009],
<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

PubMed. [référence du 30 septembre 2009], www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

PyMol 1.2r1. [référence du 30 septembre 2009], <http://pymol.org/>

Statistical Significance from Shuffles (scores PRSS). [référence du 03 mars 2009],
http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=shuffle

Swiss-Model. [référence du 30 septembre 2009], <http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>

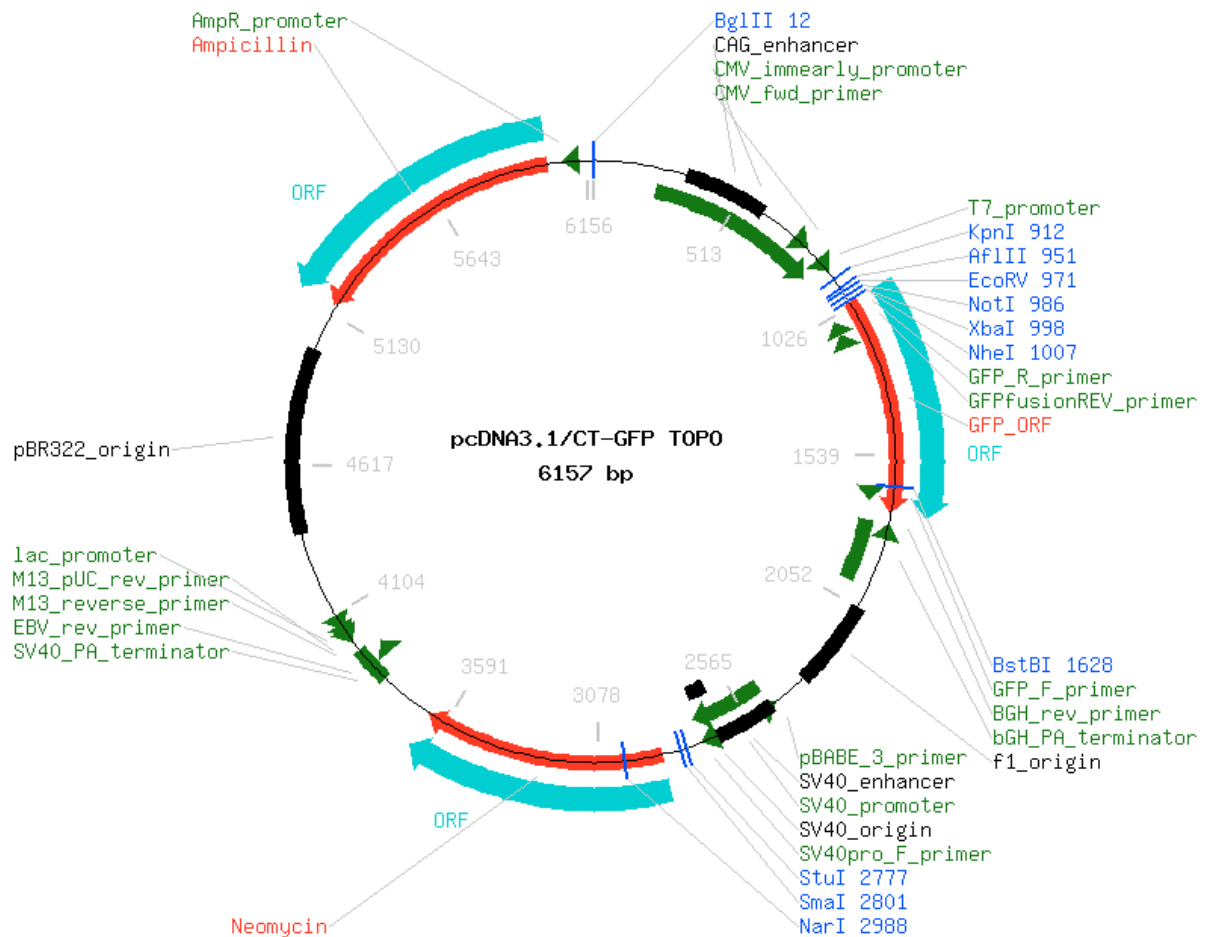
TreeDyn 195.3. [référence du 03 mars 2009], <http://www.treedyn.org/>

TreeView 1.6.6. [référence du 03 mars 2009],
<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>

Ubiquitin and Ubiquitin-like Protein Web Resource. [référence du 03 mars 2009],
www.ubiquitin-resource.org

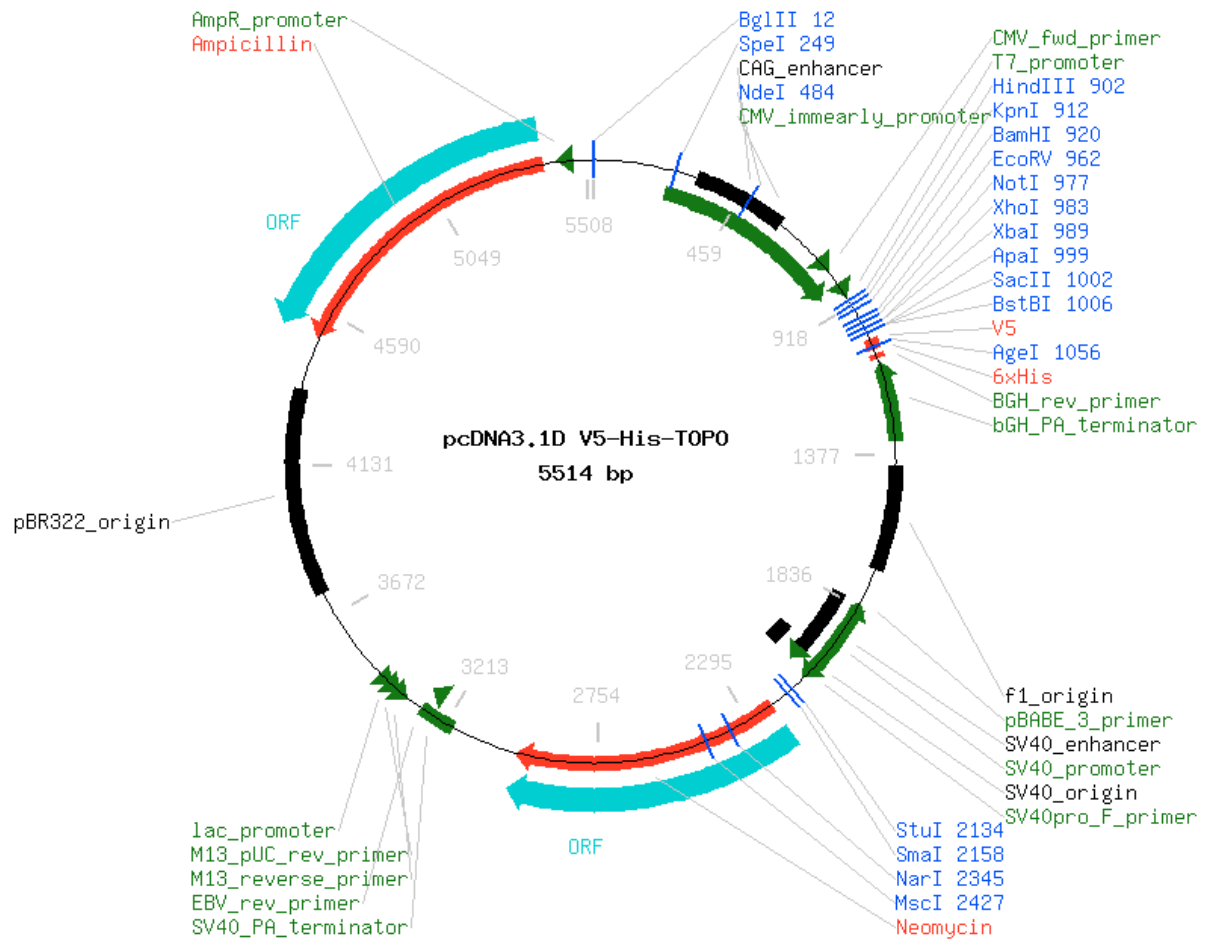
Annexes

Annexe 1 : Plasmide pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen®) utilisés pour la réalisation du clonage d'*UBE2H*



(Issu du Vector Database du site LabLife)

Annexe 2 : Plasmide pcDNA3.1/v5-His-TOPO (Invitrogen®) utilisé pour la réalisation du clonage d'*UBE2A*



(Issu du Vector Database du site LabLife)

Annexe 3 : Conditions de PCR des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine étudiées (amorces et Tm)

Gène	Exon	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')	Taille de l'amplicon	Tm
UBE2K	1	K1F	CAGTGTTCGTGTGCTCAGGT	285 pb	60°C
		K1R	GAGGACCACCCAGGGACTAC		
	2	K2F	GGCGTTTTTCTTGCTGACAT	258 pb	60°C
		K2R	AACCAAATGAAGTTACCCTCCA		
	3	K3F	TTTGAATTGAGCAGCATTCTT	242 pb	60°C
		K3R	CCTGTCCACATCAAGTTTACACA		
	4	K4F	TTCTACACCCCTTCTTTTACC	316 pb	60°C
		K4R	TGTTTTGAGGCAATTACACATTT		
	5	K5F	GCCTGCAGAGCCCTCTTAAT	230 pb	56°C
		K5R	TCATGTGTTAATGTGCAAAACCA		
	6	K6F	TGTAGGCGATTAAGAGCTGAAA	280 pb	60°C
		K6R	TTTTGTCAGCCAAGAATTTGC		
	7	K7F	TTGATTTTAGAAGCTTTCCATGC	365 pb	60°C
		K7R	CAGTCTCCAATGGTGCCTAGA		
UBE2N	1	N1F	CCGAGCAGGGACTACATTTT	228 pb	60°C
		N1R	GACGAGAGCAGAGCGAAGAG		
	2	N2F	TTGGGAGATTGGAGCTGTTC	480 pb	58°C
		N2R	TCCCTCCCACAGACCTCTC		
	3	N3F	AGCAGTTCTGGGCTGTTC	242 pb	60°C
		N3R	TGTAAAAGTGGAAGTGGTGTGAA		
	4	N4F	CAGATTACAGCATGACATTTCCA	199 pb	60°C
		N4R	TGGCAGAACAGGAGAAGTGA		
UBE2A	1	A1F	TCTGCTCTCAGGTTGGTTCA	298 pb	-
		A1R	CTGTGCCCCAGCTCGCAAC		
	2	A2F	GGACCCCTGTCTGTCTTCC	150 pb	60°C
		A2R	CTCGCGTCCCCAGTTTTCT		
	3	A3F	CAGATGAAGCAGGGAGAAGG	158 pb	60°C
		A3R	AGGATGACTGGAACCCCTT		
	4	A4F	TTTTCTTAAATCTTTCTTTCTAACCA	205 pb	52°C
		A4R	GCACCACAAAATACACAGGAAATGTG		
	5	A5F	AAAACCTTAGTGGTCTTGTACGTTT	167 pb	48°C
		A5R	AGTTCGTCACATTAAGGAAAAA		
	6	A6F	TGTTTTGCATTAAGGAAGTGA	202 pb	52°C
		A6R	TGGCCAGCTTCTTTAAACTGT		
UBE2I	1	I1F	CCACTCAGGAAGCCCATC	841 pb	60°C
		I1R	AGGTGTGTGAGGTTCTGTG		
	2	I2F	GACGGCTTGCAAGAAGAGAG	245 pb	60°C
		I2R	AGGAGGGCTTCATTCTGTG		
	3	I3F	GGTTCTTGGTGGTTTTGCTC	243 pb	60°C
		I3R	ATACTCCGCTCAGATCCCTG		
	4	I4F	CCCATCTCACCACGGTTTAT	237 pb	60°C
		I4R	GAGCTGGGAGGGAGTGAGAT		
	5	I5F	CTGCCTCCAAAAAGTGCTTC	236 pb	60°C
		I5R	TGGTCATTCTCTGTGGCTGA		
	6	I6F	AAACTGCTCACACCCGTCTT	216 pb	64°C
		I6R	GAGGACACAGGCTCACCTA		
	7	I7F	GCCCTCTAACACGTCTCTCTC	152 pb	60°C
		I7R	GGATTGGTTTGGCAAGAACT		

Gène	Exon	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5'-3')	Taille de l'amplicon	Tm
UBE2E3	1	E3.1F	CCGACTTTCAATGTTCCACA	328 pb	-
		E3.1R	GCCAAGTGATGCGAGCAG		
	2	E3.2F	TCCTCCTCCCCTGTTCTCTT	284 pb	62°C
		E3.2R	ACCTGACAAAGTGTGCTGGA		
	3	E3.3F	ATGGTGGTAGAGGGCAGTGT	230 pb	64°C
		E3.3R	TGTTGTCTCCTCTGCTGCAC		
	4	E3.4F	AACACTTCCCTGGTTTTAGGA	232 pb	52°C
		E3.4R	GAATGCACTTCAAGCTTCTTACC		
	5	E3.5F	CAGCATTTCATTTTCCTTCTGTTT	244 pb	60°C
		E3.5R	AAAAAGCACTCGTTTTTGTAGTCTT		
	6	E3.6F	TTTTAATGTTCTTTCTGCTTTTCC	683 pb	60°C
		E3.6R	AAAATATTACGACAGGAAACTATGC		
UBE2H	1	H1F	GGGTGTTGCCACCTCCAC	250 pb	63°C
		H1R	AGGGCCCTTGCAGTGGTT		
	2	H2F	TGCCAGATACTGTAAAGCCTGT	247 pb	61°C
		H2R	TCTGCAGTCCAATAAAGCTTGC		
	3	H3F	ATTTGGAGATGTAGTTCTGATG	207 pb	60°C
		H3R	CTGGCATTAAATTACCTCCCC		
	4	H4F	CTGAAATTGTTTCCAGTACTG	179 pb	58°C
		H4R	AGAAACACTAATCATGAGCAG		
	5	H5F	AATTAGTTGCCAGATACATGC	171 pb	58°C
		H5R	AGGCAATGTCTCAACATCTC		
	6	H6F	GAAGTTGCATTTCCCATGTG	237 pb	59°C
		H6R	TAATGACTGAAGCCCAACAG		
	7	H7F	AAGGTAAGTTTGAACCTCCGC	285 pb	59°C
		H7R	AGTCTGCTTCTCATGGTTAGG		

Annexe 4 : Amorces utilisées pour les réactions de PCR quantitatives spécifiques des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine étudiées

Gène	Amorce sens (5' → 3')	Amorce antisens (5' → 3')
GAPDH (référence)	5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'	5'-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'
UBE2H	5'-GGACTCAATGAATTTGTTGTCAA-3'	5'-TGGACCTTCCTGATAAATACCCT-3'
UBE2A	5'-CCAACCTATGATGTGTCTTCCA-3'	5'-CCAACCTATGATGTGTCTTCCA-3'

Annexe 5 : Amorces utilisées pour le clonage des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine étudiées

Gène	Amorce sens (5' → 3')	Amorce antisens (5' → 3')
UBE2H	5'- TGACAGACGGGCCAAGGAGG -3'	5'- ATTAGAGTCTGCTTCTCATGGTTAGG -3'
UBE2A	5'- CCCTACCTCTGACCCTGCTA -3'	5'- CTTATGGCCAGCCTCTTCTG -3'

Annexe 6 : Publications et communications scientifiques

Publications

2009

Martin I, Andres CR, Védrine S, Tabagh R, Michelle C, Jourdan ML, Heuzé-Vourc'h N, Corcia P, Duittoz A, Vourc'h P. Effect of the oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) on the expansion and neuronal differentiation of rat neural stem cells. *Brain Res*, 1284:22-30.

Michelle C, Vourc'h P, Mignon L, Andres CR. What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *J Mol Evol*. 68(6):616-28.

Congrès-colloques

2008

Journée de la Recherche des Facultés de Médecine et CHU de Poitiers et Tours à Tours (37)

Poster : C. Michelle, G. Bouchez, I. Martin, S. Védrine, P. Vourc'h, C. Andres ; Analyse développementale et fonctionnelle du gène UBE2H (7q32) candidat dans l'autisme.

Forum de l'école doctorale SST à Tours (37)

Communication orale : C. Michelle. Les gènes impliqués dans la voie de l'ubiquitine candidats dans l'autisme.

2007

Congrès mondial des neurosciences de l'IBRO (International Brain Research Organization) à Melbourne (Australie)

Poster : C. Michelle, G. Bouchez, I. Martin, S. Védrine, P. Vourc'h, C. Andres ; Study of ubiquitin conjugating enzyme UBE2H, a candidate gene in the 7q32 susceptibility locus for autism, during neuronal differentiation of neural stem cells.

Huitième colloque de la Société des Neurosciences à Montpellier (13)

Poster : C. Michelle, G. Bouchez, I. Martin, S. Védrine, P. Vourc'h, C. Andres ; Developmental and functional analysis of UBE2H, a candidate gene in the 7q32 susceptibility locus for autism

Cinquième colloque « Protéolyse Cellulaire » de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire à Seillac (41)

Communication orale : C. Michelle. La famille des enzymes humaines de conjugaison à l'ubiquitine.

2006

Forum Biotechnocentre (association des acteurs des secteurs public et privé travaillant en région centre dans les domaines des sciences de la vie et de la santé) à Seillac (41)

Poster : C. Michelle, G. Bouchez, I. Martin, S. Védrine, P. Vourc'h, C. Andres ; Analyse développementale et fonctionnelle du gène UBE2H (7q32) candidat dans l'autisme.

Forum des Doctoriales de la région Centre à Seillac (41)

Poster : C. Michelle; Gènes de la voie de l'ubiquitine dans l'autisme.

Forum Européen des Neurosciences à Vienne (Autriche)

Poster : C. Michelle, G. Bouchez, I. Martin, S. Védrine, P. Vourc'h, A. Persico, C. Andres ; Developmental and functional analysis of UBE2H, a candidate gene in the 7q32 susceptibility locus for autism.

Forum des doctorants de l'INSERM U619 à Tours (37)

Présentation orale : C. Michelle. Les gènes impliqués dans la voie de l'ubiquitine candidats dans l'autisme.

Forum de l'école doctorale SST à Tours (37)

Poster : C. Michelle, G. Bouchez, I. Martin, S. Védrine, P. Vourc'h, C. Andres ; Analyse développementale et fonctionnelle d'une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine candidate dans l'autisme.

Les enzymes de conjugaison à l'ubiquitine dans l'autisme

Résumé

L'autisme est une pathologie neurodéveloppementale impliquant des facteurs génétiques. Nous utilisons une stratégie d'étude de gènes candidats choisis pour leur rôle clé dans la voie de l'ubiquitine, impliquée dans des mécanismes de neurogenèse ou de plasticité synaptique mis en cause dans l'autisme.

L'identification des 37 enzymes de conjugaison à l'ubiquitine E2 humaines, groupées en 17 familles, a permis de sélectionner 6 enzymes pour mener une recherche de mutation chez 195 autistes : *UBE2H*, *UBE2A*, *UBE2K*, *UBE2I*, *UBE2N*, *UBE2E3*.

Aucune mutation n'a été détectée dans notre population d'autistes, et aucune preuve génétique n'a pu impliquer les gènes *UBE2K*, *UBE2A* et *UBE2N*. En revanche des associations significatives ont été mises en évidence avec des polymorphismes des gènes *UBE2E3*, *UBE2I* et *UBE2H*.

Des études *in vitro* ont mis en évidence les rôles importants d'enzymes E2 lors de la neurogenèse : *UBE2H* favorise la prolifération des CSN tout en empêchant la différenciation neuronale, tandis qu'*UBE2A* modifie la différenciation des CSN par une augmentation de la taille des neurites.

Les recherches restent donc encouragées par ces premiers résultats très prometteurs.

Mots-clés : autisme, enzymes de conjugaison à l'ubiquitine E2, phylogénèse, *UBE2K*, *UBE2A*, *UBE2I*, *UBE2N*, *UBE2H*, *UBE2E3*, criblage génétique, étude d'association, étude de déséquilibre de transmission, étude haplotypique, cellules souches neurales, profil d'expression, surexpression plasmidique, TNF-alpha

Résumé en anglais

Autism is a neurodevelopmental disorder involving genetic factors. We use a candidate genes strategy selected for their key role in the ubiquitin pathway involved in mechanisms of neurogenesis and synaptic plasticity implicated in autism.

Identification of the 37 human ubiquitin conjugating enzymes E2, grouped into 17 families, helped to select 6 enzymes to conduct a mutation screening in 195 autistic patients: *UBE2H*, *UBE2A*, *UBE2K*, *UBE2I*, *UBE2N*, *UBE2E3*.

No mutation was detected in our autistic population, and no genetic evidence could involve *UBE2K*, *UBE2A* and *UBE2N* genes. However significant associations were identified with polymorphisms from *UBE2E3*, *UBE2I* and *UBE2H* genes.

In vitro studies highlighted the important role of E2 enzymes during neurogenesis: *UBE2H* promotes the proliferation of NSC while preventing neuronal differentiation, while *UBE2A* alters differentiation of NSC by increasing the neurites size.

Researches therefore remain encouraged by these very promising initial results.

Keywords: autism, ubiquitin conjugating enzymes E2, phylogeny, *UBE2K*, *UBE2A*, *UBE2I*, *UBE2N*, *UBE2H*, *UBE2E3*, genetic screening, association study, transmission disequilibrium test, haplotype study, neural stem cells, expression profiling, plasmid overexpression, TNF-alpha