UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

INSERM U1253, Equipe Neurogénomique et Physiopathologie neuronale

THÈSE présentée par :

Judith HALEWA

soutenue le : **16 février 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Etude moléculaire et fonctionnelle du gène *PTCHD1* impliqué dans les troubles neurodéveloppementaux

THÈSE dirigée par :
M. LAUMONNIER Frédéric — CR Inserm, HDR, Université de Tours

PRÉSIDENT :
M. TILLET Yves — DR INRAE, Université de Tours

RAPPORTEURS :
Mme YALCIN Binnaz — CR Inserm, HDR, Université de Bourgogne, Dijon
M. MARTIN Stéphane — DR Inserm, IPMC, Valbonne

JURY :
Mme BÉNÉDETTI Hélène — DR CNRS, Université d'Orléans
M. LAUMONNIER Frédéric — CR Inserm, HDR, Université de Tours
M. MARTIN Stéphane — DR Inserm, IPMC, Valbonne
Mme PITON Amélie — MCU-PH, HDR, IGBMC, Strasbourg
M. TILLET Yves — DR INRAE, Université de Tours
Mme YALCIN Binnaz — CR Inserm, HDR, Université de Bourgogne, Dijon

“One's ideas must be as broad as Nature if they are to interpret Nature”

Sir Arthur Conan Doyle

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier chaque membre de ce jury pour avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie le **Docteur Binnaz Yalcin**, Chercheuse à l'université de Bourgogne, et le **Docteur Stéphane Martin**, Chercheur à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse.

Je remercie les examinateurs de ce jury de thèse :

Le **Docteur Hélène Benedetti**, Directrice de Recherche au Centre de Biophysique Moléculaire.

Le **Docteur Amélie Piton**, Maître de Conférences et Praticien Hospitalier à l'IGBMC.

Le **Professeur Yves Tillet**, Directeur de Recherche à L'INRAE.

Merci au **Professeur Catherine Belzung**, Directrice de l'UMR INSERM U1253 Imagerie et Cerveau, de m'avoir accueillie au sein de l'unité.

Je remercie très particulièrement le **Docteur Frédéric Laumonnier**, responsable de l'équipe Neurogénétique et Physiopathologie neuronale et également le directeur de cette thèse.

Je pense sincèrement avoir passé cette thèse dans les meilleures conditions grâce à toi. Merci d'avoir toujours été présent et disponible, de m'avoir encouragé, d'avoir su ajuster la pression ou de m'avoir rassurée quand j'en avais besoin, notamment à la fin. Merci de m'avoir appris à maitriser les étapes délicates de la culture primaire de neurones, pour tes conseils scientifiques et méthodologiques et de m'avoir communiqué ton enthousiasme pour le projet et pour la recherche en général.

Passer ces années de thèse dans les meilleures conditions, cela n'aurait pas pu être possible sans l'ambiance absolument géniale de ce laboratoire, et cela grâce aux membres de l'équipe 2. Merci à chacun d'entre vous, ça a été un véritable plaisir d'être là et de travailler parmi vous.

Cette belle ambiance, elle est due à plusieurs d'entre vous. A **Sylviane Marouillat** j'ai adoré travailler avec toi, et merci de ta contribution à ma thèse pour la qPCR, les Western-blot et autres, de plus, j'ai

adoré discuter avec toi. Merci d'avoir toujours ramené le TMV pour l'horoscope, et d'avoir toujours répondu à mes questions. A **Rose-Anne Thépault**, c'est tout pareil pour toi. Avec vous deux, on a partagé des pauses café exceptionnelles. Rose-Anne, j'adore ton humour et ton grain de folie, on aurait voulu t'obliger à rester de force, mais je suis contente que tu aies réussi à rejoindre Nantes comme tu le souhaitais. Très belle ville d'ailleurs, j'y repasserai, promis. Merci également pour les constructions plasmidiques, leur séquençage et la préparation de mes petites lamelles qui ont participé à la réussite de cette thèse. A **Sylvaine Renault**, je me suis arrêtée à la porte du bureau de nombreuses fois alors que mon objectif était au-delà, pour parler (longtemps) de divers sujets. On partage pas mal de choses, et j'ai beaucoup aimé connaître ton point de vue d'enseignante. Merci aussi à **Cathy Antar**, et à tes interventions amusantes. Profite bien de la retraite ! Merci également pour vos gâteaux.

A **Jorge Gandía Sanchez**, je te remercie de m'avoir appris ce qu'était réellement une paëlla (pas de crevettes, pas de chorizo, j'ai compris, je ne t'embêterai plus dessus !) et pour les petites vidéos amusantes. **Debora Lanznaster** merci de m'avoir appris la samba avec Oriane sur Youtube, dont la "quebra de l'amour, del amor… (?)" (En fait, c'était "quebradeira move" dans la vidéo mais on n'avait pas très bien compris… c'était très rigolo). Merci à **Blandine**, pour ta gentillesse, ta présence au café et tes (très nombreux) petits cadeaux.

Merci également **Dr Marie-Laure Vuillaume**, toujours souriante et agréable à chacun de tes passages, **Pr Corinne Augé-Gouillou**, **Jérôme Jaillet**, **Murielle Genty**, **Dr Frédéric Minier**, **Pr Annick Toutain**, **David Lever**, le gestionnaire de choc et grand décorateur de Noël, **Dr Jean-Michel Escoffre**, membre non officiel de notre équipe, **Pr Christian Andres**, l'auditeur le plus attentif de nos présentations, qui nous pousse dans nos retranchements pour que nous soyons toujours prêts, **Pr Patrick Vourch'**, toujours bienveillant, ainsi que **Frédéric Montigny** et **Antoine Lefèvre**, avec qui nous partageons l'étage et la salle de café, j'ai toujours été ravie de vous y retrouver.

Merci à la Dream Team des doctorantes ! Mais quel bureau magnifique, recouverts de nos photos, nos blagues, et qui a connu nos délires, nos commérages, nos tentatives de chant et surtout nos grands moments de réconfort. Merci d'avoir participé à ma Murder Party, vous étiez excellentes, j'espère que vous vous êtes amusées autant que moi !

Tout d'abord merci au **Dr Dévina Ung**, ma senpaï, qui n'a pas d'égal en courage et en détermination. A mon arrivée, tu as dû me gérer alors que tu achevais ta thèse, ce qui ne devait pas être facile. Et pourtant, tu étais toujours prête à m'aider, tu m'as mise sur les rails du projet dès le début, ce qui m'a permis de le mener à bien jusqu'au bout. Tu m'as également appris comment avoir une réponse rapide des administrations, à passer des Noëls avec Mariah Carey dans le labo, et nous avons malheureusement appris ensemble que les tâches de Coca sont définitives, mais au moins, mon fauteuil de bureau a un souvenir de toi ! Plein de bonheur pour toi, ton mari et ton adorable bébé.

Un coucou à **Dr Cindy Maurel**, la senpaï de la team SLA, que j'irai voir à Sidney promis ! J'admire la grande aventurière que tu es et tes histoires de fous, et il faut qu'on discute plus amplement de voyages. J'adore ta bonne humeur et ta cool-attitude, tu as mis pas mal l'ambiance au labo. Merci !

Oriane, maintenant Docteur, quelle émotion ! Je me souviens quand on s'est rencontrées, je t'ai appréciée tout de suite, et quelle joie de savoir que ton labo déménageait chez nous. A nos soirées où nous nous sommes racontées nos vies, à nos câlins, à toute la carboglace qu'on a fait fondre dans l'évier, à nos courses à chariot et à nos danses de la victoire. Merci pour tes jolis cadeaux, surtout que le pendentif koala que tu m'as fabriqué, et merci pour les cookies.

Anna, Docteur aussi à présent ! Tu es adorable, ça a été si agréable de voir comment tu tiens à nous et à nous aider, à savoir si on va bien. En effet, empoisonner nos thés aurait été une idée désastreuse (surtout qu'on a découvert après notre amour pour le Palais de Thés, quelle ironie !) parce que les Allemands ne portent pas si bien les sandales avec chaussettes pendant l'hiver que toi, et les Anglais te doivent ta contribution à leur langue. J'espère aussi pouvoir t'entendre chanter *en vrai* un de ces jours.

Amélie, ma co-équipière du confocal, qui vers la fin a rejoint la place à côté de moi pour m'encourager à planter des arbres et retirer mes post-it quand ils ne servaient pas au travail. Je me souviendrai toujours de ta capacité au fou rire incontrôlable, communicatif et interminable. J'ai cru des fois que nous allions mourir d'asphyxie, mais ça va, nous nous en sommes remises.

Shanez, tu chantes mieux que moi, mais avec autant de conviction. J'espère que tu fonderas un karaoké à Tours, car ça manque cruellement. A nos voix cassées, à ton humour piquant, à notre complicité vestimentaire.

Rudolf, oui, tu es une doctorante comme nous toutes (écriture inclusive oblige), ravie que nous partagions le même intérêt pour les bretelles, et que tu aies accepté de les porter le même jour que moi. Merci pour ton mug.

Bon courage à vous tous pour la fin.

Et courage également aux nouvelles, **Florence** et **Sarah**, ainsi que **Yara**, que je n'ai pas pu encore rencontrer. Vous êtes les nouvelles âmes de ce bureau, je compte sur vous pour continuer à le faire vivre.

A mes minions, mes stagiaires à moi, tous brillants, j'ai beaucoup aimé vous apprendre ce que je savais, et en retour vous m'avez grandement aidée. Mais surtout j'ai apprécié la complicité que nous avons développée. **Hélène Demory**, à ton univers de romance fantastique teinté de gothique, tes talents créatifs et tes magnifiques et délicieux gâteaux. **Jean-Eudes Bavay**, à nos soirées Don't Starve, où nous combattions pour notre survie de méchants chiens, à l'instar de la vie réelle, où nous combattions des centrifugeuses tueuses. A **Manon Dixneuf** (M19, comme l'amas globulaire d'étoiles de l'astronome

Messier), qui a enregistré tout ce que je lui ai appris, même la musique kitsch allemande des années 70. Tu es d'une grande écoute, et j'ai beaucoup apprécié cela. A vous trois, vous avez beaucoup de talent, donc ayez confiance en vous !

A **Sana Skouri**, je suis très contente que tu sois venue ici, avec ton sourire et ta bonne humeur. Nous retournerons manger des gâteaux dans les salons de thé si tu passes à Paris. Et à tous les stagiaires qui sont passés dans le laboratoire, les Alix, les Maxime, Oscar, Alexia, Margot, Charlotte, Claire, Léa et tous les autres.

A **Céline David**, anciennement de l'équipe 1, avec qui nous nous sommes rapprochées autour de nos intérêts créatifs, je suis fan de tes créations de couture, et ravie d'avoir passé les trajets de train, les soirées chez moi et la rédaction de la thèse avec toi.

A ma famille, toujours soudée quoi qu'il arrive. A ma **maman**, qui m'a transmis son courage, de nombreuses passions, de lectures, de films et d'écriture, et qui m'a soutenue à faire ce que je souhaitais. A mon **papa**, dont j'ai toujours admiré l'intégrité et les idéaux. A notre tendance à être tous les deux dans la lune. A ma sœur **Edwige**, unique mais préférée malgré tout, mon modèle et fondatrice d'un humour original dont je suis la fidèle disciple. Au petit **Victor**, son bébé et mon magnifique neveu, et à son papa, **Norbert.**

A mon **papi Nicolas**, à sa personnalité exceptionnelle, et à ses grandes histoires de vie que j'adorerais toujours écouter. A ma **mamie Gisèle**, qui a toujours souhaité que j'aille le plus loin possible, et dont j'ai trouvé le réconfort dans les écharpes qu'elle m'a appris à tricoter. A ma **mamie Marcelle**, qui aurait pu faire passer la loi du droit à l'absence pour raison d'anniversaire, et aussi à **papi Samuel**, au profil ultra photogénique. A mes tantes, mes oncles, mes cousines et mes cousins également, qui m'ont tous encouragée.

Un merci très sincère à **Pierre**, à ton soutien, aux très belles choses qu'on a accompli ensemble. Tu as tant de talents et d'idées, tu penses de manière remarquable, et je sais que tu vas trouver ce qu'il te faut. Courage !

A mes amis parisiens, amoureux du Yukata, avec qui je partage les grandes aventures de voyage, entre notre séquestration à l'aéroport de Moscou, l'incendie à Kyoto, la panne d'essence au milieu de *l'Enfer* de l'Islande, à nos réunions, à nos nuits jeux-films-débats-danse-festins et à nos nanars, à nos matinées de brunch, à votre soutien à distance, à nos séances de yoga spécial bikini pour préparer notre *summer body*, aux Jojo's, Kung Fury, The Room et tout ce que nous partageons. **Gaëlle**, parce que nous savons toutes les deux que l'amour, c'est mieux au naturel, avec de longs poils… Cœur Poilu à toi, et je te lance des fleurs pour tout ce que tu m'as apporté. **Leslie**, ma gossip girl, on discute de vraiment tout et tu es ma référence pour la lecture et les tatouages. Puis tu as vu, tu n'as pas eu à écrire ma thèse 48 heures

avant sa fin ! **Ambre**, qui à ma grande joie, tu es passée si rapidement de stagiaire de l'équipe à une de mes meilleures amies, et a rejoint le clan. Merci pour tes appels durant le confinement. **Mathilde**, grande étincelle de bonne humeur, j'ai hâte de diriger Lune Noire avec toi et de découvrir plus de jeux de rôles. **Nicolas**, à la fois grand maître improvisateur et petit poussin câlin, je te dois beaucoup de nos discussions, je te les paierai probablement en lassis à la mangue. **Ophélie**, la petite fée, mon acolyte d'exploration urbaine et la maman des plantes. Je te passe le flambeau de la thésarde du groupe, avec mes encouragements et mon soutien. **Tom**, nous partageons divers avis et pas les plus communs, nous débattrons toujours sur les autres. A toi le Réflexionologue, à Daniel Pennac et ses Malaussène. **Julien**, qui a marqué un grand tournant de ma vie, merci pour ça. Avec toi, nous continuerons à faire vivre la tribu de Dana. **Antonin**, notre streamer officiel d'animés, papa d'un petit phoque japonais, nous gravirons le Mont Fuji dès que nous sommes prêts. **Antoine**, le seul à partager mon année de naissance, et chef de file des soirées nanars. **Adrien**, compagnon de voyage très volontaire, malgré ses pannes de réveil. A nous la Nouvelle-Zélande ! **Marc**, la licorne humaine au cœur pur, président de nos géniaux concours Dixit de nouvelles. **Cassandra**, la magicienne des pancakes. Aux doutes qui nous ont traversées quand nous avons visionné le film Dracula. **Irvin**, dont la légende te poursuit malgré toi, mais tu es bien au-dessus de ça. Car personne ne porte aussi bien les décalcomanies sur le torse que toi. **Marie**, à tes grandes joies expansives, je retourne en Mongolie avec toi dès que tu le décides.

A **Coline** et **Sam**, mes acolytes du lycée et pour toujours, et à **Ariane**, petite sœur cachée et alter ego dans l'imaginaire depuis le collège. A **Anne-Sophie**, ma première grande amie. A **M. Mangin** et à **M. Candelier**, mes deux professeurs géniaux qui ont marqué ma scolarité.

N'oublions pas **Tengri** aussi, pour le réconfort félin malgré ses tentatives de participation à la rédaction.

Et, en raison de cette période étrange, merci à tous les amis et les rencontres via le réseau Discord, pour leur soutien moral, les conseils d'anciens doctorants, les groupes de travail et de déprocrastination, et qui prenaient régulièrement de mes nouvelles. Merci à **Milan** et à **Philippe**.

Résumé

L'étude des troubles neurodéveloppementaux a mis en évidence l'implication de gènes essentiels dans le développement neuronal. Parmi eux, l'identification de microdélétions et de mutations dans le gène *PTCHD1* (situé sur le chromosome X) chez des patients atteints de troubles du spectre autistique et/ou de déficience intellectuelle nous a amené à étudier son implication dans le neurodéveloppement. *PTCHD1* code pour une protéine membranaire localisée dans la densité post-synaptique des neurones, qui interagit avec deux protéines clefs de l'échafaudage post-synaptique, PSD-95 et DLG3, ainsi que RAC1, qui est impliqué dans la dynamique du cytosquelette. Nos résultats ont permis de préciser la localisation précise de la queue C-terminale de PTCHD1 interagissant avec RAC1.

La littérature et l'analyse génétique de nouveaux patients ont mis en évidence 13 mutations faux-sens dont nous avons analysé l'impact physiologique et physiopathologique. La surexpression de ces formes mutées de PTCHD1 dans des lignées cellulaires HEK 293T, les Neuro-2A et dans des cultures primaires neuronales issues de souris a permis la mise en évidence d'un défaut d'expression protéique et de localisation membranaire pour certaines mutations, suggérant un impact délétère, alors que d'autres ne perturbent pas ces paramètres.

Ces éléments permettent de donner des pistes supplémentaires sur la physiopathologie induite par les perturbations de ce gène au sein de la synapse glutamatergique lors du neurodéveloppement.

Mots clefs : PTCHD1 – modèles in vitro neuronaux – troubles neurodéveloppementaux – neurogénétique – synapse – interactions protéiques

Abstract

The study of neurodevelopmental disorders shows the involvement of essential genes in neuronal development. Among them, the identification of microdeletions and mutations in *PTCHD1* gene (located on the X chromosome) in patients with autism spectrum disorders and / or intellectual disability led us to study its implication in neurodevelopment. *PTCHD1* encodes a membrane protein located in the postsynaptic density of neurons, which interacts with two key proteins of the postsynaptic scaffold, PSD-95 and DLG3, as well as RAC1, which is involved in cytoskeletal dynamics. Our results allowed us to specify the precise region of the C-terminal tail interacting with RAC1.

The literature and the genetic analysis of new patients revealed 13 missense mutations, whose we analyzed the physiological and pathophysiological impact. The overexpression of these mutated forms of PTCHD1 in HEK 293T and Neuro-2A cell lines, and in primary neuronal cultures derived from mice demonstrated a defect in protein expression and membrane localization for certain mutations, suggesting an impact deleterious, while others do not disturb these parameters.

These elements provide additional leads on the pathophysiology induced by disturbances of this gene within the glutamatergic synapse during neurodevelopment.

Keywords: PTCHD1 – neuronal in vitro models – neurodevelopmental disorders – neurogenetics – synapse – protein interactions

Table des matières

Remerciements 1

Résumé 1

Abstract 8

Liste des tableaux 12

Liste des figures 13

Liste des abréviations 16

Introduction Revue de la littérature 19

Chapitre 1 : Les troubles neurodéveloppementaux 21

I - Présentation générale des troubles neurodéveloppementaux 21

II - La déficience intellectuelle (DI) 22

III - Les Troubles du Spectre Autistique (TSA) 22

IV - Comorbidités entre TSA et les autres troubles neurodéveloppe-mentaux 28

V - Anomalies cérébrales de la DI et des TSA 34

Chapitre 2 : La génétique dans les TSA et la DI 42

I - Stratégies d'identification des anomalies et des gènes impliqués dans les TSA et la DI 45

II - Anomalies chromosomiques retrouvées dans la DI et les TSA 47

III - Impact des variants génétiques sur les protéines 48

IV - Etudes fonctionnelles des gènes susceptibles d'être impliqués dans les TND 51

Chapitre 3 : La synapse, structure clef de la communication neuronale 54

I - Définition des synapses 60

II - Classification des synapses 60

III - Structure de la synapse 62

IV - L'organisation post-synaptique des synapses inhibitrices 63

V - L'organisation post-synaptique des synapses excitatrices glutamatergiques 67

Chapitre 4 : PTCHD1 68

I - La famille Patched domain containing proteins (PTCHD) 82

II - Description du gène *PTCHD1* et structure de la protéine 82

III - Les rôles physiologiques de PTCHD1 89

IV - Interactome de PTCHD1 90

V - PTCHD1 dans la DI et les TSA 90

VI - Modèles physiopathologiques du gène *PTCHD1* 91

Objectifs de la thèse 96

Travaux de thèse 103

Partie 1 Caractérisation de l'interaction de la queue intracellulaire de PTCHD1 avec la protéine RAC1 105

I - Contexte scientifique 107

II - Matériels et méthodes 107

III - Résultats 111

Détection de l'interaction entre la queue C-terminale de PTCHD1 et RAC1 en GST pull-down 113

IV - Résultats supplémentaires 113

1 - Co-immunoprécipitation entre PTCHD1 et RAC1 116

2 - Production et évaluation d'un anticorps anti–PTCHD1 120

Partie 2 Analyse fonctionnelle de variants génétiques du gène *PTCHD1* associés à la déficience intellectuelle et à l'autisme 129

I - Contexte scientifique 131

II - Résumé des résultats de l'article 131

Article: Novel missense mutations in PTCHD1 altering its plasma membrane subcellular localization and causing intellectual disability and autism spectrum disorder. 132

Discussion générale 179

I - Etude de l'interaction entre PTCHD1 et RAC1 179

II - Analyse fonctionnelle des variants 185

III - Synthèse et conclusion 192

Annexe 179

Article supplémentaire: Missense variants in DPYSL5 cause a neurodevelopmental disorder with corpus callosum agenesis and cerebellar abnormalities, including Ritscher-Schinzel syndrome 195

Bibliographie 241

Liste des tableaux

Tableau 1: Classement de la DI en fonction du comportement adaptatif d'après le DSM-5, le CIM-11 et l'AAIDD.

Tableau 2: Comorbidités entre TSA et syndromes à transmission mendélienne.

Tableau 3 : Famille de Rho GTPases retrouvé chez l'Homme et gènes associés.

Tableau 4 : Résumé des caractéristiques de la famille de protéines PTCHD, PTCH and NPC.

Tableau 5 : Liste des anomalies structurales impliquant *PTCHD1*, *PTCHD1-AS*, *DDX53*.

Tableau 6 : Classification des mutations ponctuelles du transcrit de PTCHD1 référencées dans les bases de données SFARI, ClinVar et gnomAD.

Liste des figures

Figure 1 : Organisation des processus du cerveau impliqués dans la perception, la cognition et le comportement social.

Figure 2 : Les trois phases de croissance cérébrale dans l'autisme, présentant un surdéveloppement précoce du volume cérébral avant un ralentissement.

Figure 3 : Evolution chronologique de la découverte des gènes associés au TSA de 1975 à 2015.

Figure 4 : Modèles génétiques théoriques associés aux TSA.

Figure 5 : Evolution chronologique des outils diagnostiques de détection du génome, de 1956 à 2011, associée à l'évolution décroissante de la taille des anomalies détectables par ces outils.

Figure 6 : Schéma des principales anomalies chromosomiques structurales.

Figure 7 : Positions des différents types de mutations pouvant affecter l'expression d'un gène.

Figure 8 : Description des évènements impliqués dans la transmission d'une synapse chimique.

Figure 9 : Synapse excitatrice glutamatergique du cortex visuel du chat observé au microscope électronique à transmission.

Figure 10 : A. Les protéines du complexe SNARE et protéines SM. B. Les étapes de fusion contrôlées par les protéines du complexe SNARE, les protéines SM et la NSF.

Figure 11 : L'organisation post-synaptique des synapses GABAergiques.

Figure 12 : L'organisation post-synaptique des synapses glutamatergiques, rassemblant récepteurs, protéines d'adhésion et d'échafaudage et protéines de signalisation.

Figure 13 : Les protéines majeures de l'échafaudage post-synaptique des synapses glutamatergiques et leurs domaines.

Figure 14 : Voies de signalisation faisant intervenir les Rho-GTPases dans la régulation de la mobilité du cône de croissance.

Figure 15 : Voies impliquant les protéines OPHN1, ARHGEF6, MEGAP, ARHGEF9 dans la synapse. Les protéines en rouge sont impliquées dans des cas de DI.

Figure 16 : Représentation schématique des voies de signalisation canonique (A) et non canonique de type II (B) de SHH.

Figure 17. Représentations schématiques de PTCH1 et des protéines des familles PTCHD.

Figure 18 : PTCHD1, gène et protéine.

Figure 19 : Représentation du locus Xp22.11 avec la localisation de *PTCHD1*, *PTCHD1-AS* et d'autres gènes, *DDX53*, *PHEX* et *CBLL2*.

Figure 20 : Schéma de l'architecture post-synaptique des synapses glutamatergiques.

Figure 21 : Détection de la protéine RAC1 comme partenaire protéique de PTCHD1.

Figure 22 : Séquence protéique de la queue C-terminale de PTCHD1.

Figure 23 : Constructions de la queue C-terminale intracellulaire de Ptchd1.

Figure 24 : Etapes du protocole de l'immunoprécipitation par GST pull-down.

Figure 25 : Détection des protéines totale sur les gels par la méthode Stain-Free.

Figure 26 : Révélation de la protéine RAC1 dans les éluats et PFT après GST pull-down.

Figure 27 : Le principe de la co-immunoprécipitaition.

Figure 28 : Co-immunoprécipitation entre PTCHD1-GFP et RAC1-Myc.

Figure 29 : Evaluation quantitative de RAC1-Myc.

Figure 30 : Evaluation de l'efficacité des sérums au jour 63 sur des cellules HEK 293T transfectées (T) ou non transfectées (NT).

Figure 31 : Analyse de l'efficacité du sérum 225 au jour 63 sur des lysats protéiques de cellules HEK 293T non transfectées (NT) ou transfectées avec pCAG-GFP, pCAG-Ptchd1-GFP ou pCAG-Ptchd1.

Figure 32 : Validation du protocole de purification avec des anticorps contre des marqueurs de la région présynaptique et post-synaptique.

Figure 33 : Evaluation de l'efficacité des sérums 225 J63, 226 J63 et 223 J77 sur des fractions non-nucléaires (PN), synaptosomale (S), pésynaptique (NP) et post-synaptique (P).

Figure 34 : Images de microscopie confocale représentatives de cellules HEK 293T transfectées avec la *GFP* ou *PTCHD1-GFP* sauvage (WT) ou muté et avec un marquage de la membrane plasmique.

Figure 35: Images de microscopie confocale représentatives de cellules HEK 293T transfectées avec la *GFP* ou *PTCHD1-GFP* sauvage (WT) ou muté et avec un marquage du réticulum endoplasmique.

Figure 36 : Images de microscopie confocale représentatives de cellules HEK 293T transfectées avec la *GFP* ou *PTCHD1-GFP* sauvage (WT) ou muté et avec un marquage du protéasome p20S.

Figure 37 : Images de microscopie confocale représentatives de cellules Neuro-2A transfectées avec la *GFP* ou *PTCHD1-GFP* sauvage (WT) ou muté et avec un marquage de la membrane plasmique.

Figure 38 : Images de microscopie confocale représentatives de cellules Neuro-2A transfectées avec la *GFP* ou *PTCHD1-GFP* sauvage (WT) ou muté et avec un marquage du réticulum endoplasmique.

Figure 39 : Images de microscopie confocale représentatives de cellules Neuro-2A transfectées avec la *GFP* ou *PTCHD1-GFP* sauvage (WT) ou muté et avec un marquage du protéasome p20S.

Figure 40 : Localisation synaptique des variants de PTCHD1 dans les cultures neuronales primaires.

Figure 41 : Domaines de RAC1.

Figure 42 : La ramification dendritique est médiée par la voie Sema3A-Plexin-A4-FARP2-RAC1.

Figure 43 : Répertoire des variants faux-sens de PTCHD1.

Figure 44 : Schéma incluant une voie théorique de PTCHD1.

Liste des abréviations

AAIDD	American Association on Intellectual and Developmental Disabilities	DSM	Manuel diagnostic et Statistique des Troubles Mentaux
ADHD	Attention deficit hyperactivity disorder	FISH	Fluorescent in situ hybridization
AGRE	Autism Genetics Research Exchange	GAP	GTPase activating protein
AMPAR	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor	GK	Guanylate Kinase
APA	American Psychiatric Association	GKAP	GK associated protein
CAM	Protéine d'adhésion cellulaire	GWAS	Genome Wide Association Study
CAMK	CAM Kinase	HTS	High-throughput sequencing
CDC	Center for Disease Control and Prevention	IMAC	immobilized metal affinity chromatography
CEF	Chicken embryonic fibroblast	IRM	Imagerie par résonnance magnétique
CGH	Comparative genomic hybridization array	iPSc	Induced pluripotent stem cells
CIM	Classement International des Maladies	KD	Knock-down
CNP	Copy number polymorphism	KO	Knock-out
CNV	Copy number variants	LB	Luria Broth
CPSE/CPSI	Courant post-synaptique excitateur/inhibiteur	LTD	Long term depression
CVCD	Variant commun – Maladie fréquente	LTP	Long term potentiation
DI	Déficience Intellectuelle	MAP	Protéine associée aux microtubules
DISP	Protéines Dispatched	MAGI	MAGUK with inverted repeat
DLC	Dynein Light Chain	MAGUK	Membrane associated guanylate kinase
DLG	Disc-Large Homolog	MET	Microscope électronique à transmission

mGluR	Récepteurs métabotropiques au glutamate	RRR	Risque relatif de récurrence
NAT	Transcrit antisens naturel	RVCD	Variant rare – Maladie fréquente
NIMH	National Institute of Mental Health	SCZ	Schizophrénie
NRT	Noyau réticulaire thalamique	SFARI	Simons Foundation Autism Research Initiative
OMS	Organisation mondiale de la Santé	SHH	Sonic Hedgehog
PA	Potentiel d'action	SNARE	Soluble NSF attachment receptor
PBR	Polybasic region	SNC	Système nerveux central
PFC	Cortex préfrontal	SNP	Single Nucleotide Polymorphism
PPSE/PPSI	Potentiel post-synaptique excitateur ou inhibiteur	SNV	Single Nucleotide Variant
PSD	Densité post synaptique	SSD	Sensing Sterol Domain, domaine de sensibilité au stérol
PTC/PTCH	Protéines Patched	STS	Sillon temporal supérieur
PTCHD	Patched domain containing proteins	SV	Variation structurale
PTR	Proteins patched-related	TDA/TDAH	Trouble de l'attention avec ou sans hyperactivité
QI	Quotient Intellectuel	TND	Troubles neurodéveloppementaux
RCIU	Retard de croissance intra-utérine	TOC	Troubles Obsessionnels Compulsifs
RCPG	Récepteur couple aux protéines G	TS	Sclérose tubéreuse de Bourneville
RGD	Retard global du développement	TSA	Troubles du spectre autistique
RE, REG, REL	Réticulum endoplasmique, granuleux ou lisse	TSAF	Troubles du spectre de l'alcoolisation fœtale
RGS	Regulator of G-protein signaling	WT	Wild type

Introduction

Revue de la littérature

Chapitre 1 : Les troubles neurodéveloppementaux

I - Présentation générale des troubles neurodéveloppementaux

Les troubles neurodéveloppementaux (TND) sont un ensemble hétérogène de pathologies impactant différentes fonctions neurales (motrice, perceptive, du langage, socio-émotionnelle…). Il en existe six catégories, selon la 5e édition du Manuel Diagnostic et Statistique des Troubles Mentaux (DSM-5, 2013) par l'American Psychiatric Association (APA) (APA, 2015) et la 11e édition du Classement international des Maladies (CIM-11, 2018) de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (OMS, 2018) :

- Les troubles de la communication, incluant les troubles du langage, les troubles de la phonation et le trouble de la fluidité verbale apparaissant durant l'enfance (bégaiement).

- Les troubles déficitaires de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDA et TDAH), où la prévalence du déficit de l'attention ou de l'hyperactivité et son évolution au cours du temps sont étudiées.

- Les troubles moteurs, composés du trouble du développement de la coordination, les mouvements stéréotypés, les tics moteurs et vocaux et le syndrome de Gilles de la Tourette.

- Les troubles spécifiques des apprentissages (appelés aussi troubles DYS), rassemblant les troubles qui impactent l'apprentissage scolaire : déficit de la lecture (dyslexie), déficit de l'expression écrite (ex : dysorthographie) et du calcul (dyscalculie).

- Les troubles du spectre de l'autisme (TSA)

- Les troubles du développement intellectuel (ou handicaps intellectuels)

- Autres troubles neurodéveloppementaux spécifiés et non spécifiés

Il est établi aujourd'hui, contrairement au DSM-IV, que les comorbidités entre ces troubles soient assez fréquentes.

II - La déficience intellectuelle (DI)

1 - Historique

Au cours de l'histoire, les enfants présentant une déficience intellectuelle (DI) ou tout trouble du développement handicapant ont été l'objet d'un rejet. Bien que souvent confondu avec les troubles mentaux, son caractère inné était interprété superstitieusement comme une punition divine. La première distinction est faite au XVIIe par John Locke, dans son « Essai sur l'entendement humain », où il distingue les fous, qui raisonnent sur des idées fausses, et les idiots, qui ne possèdent pas les capacités mentales élémentaires pour exprimer des idées. Cette théorie est reprise par Joseph Daquin (Autin, 2014), puis au début du XIXe siècle, par Philippe Pinel.

Celui-ci décrit dans son *Traité médico-philosophique sur l'aliénation mentale* sous le terme générique d'« idiotisme » (Pinel, 1809) - qu'il explique en reprenant les termes de Locke, « abolition totale des fonctions de l'entendement » - divers cas d'enfants et d'adultes souffrant de troubles qui, à la différence des patients « aliénés » classés dans les catégories « mélancolie », « manies » et « démence », sont des états de naissance jugés incurables. La plupart de ces patients semblent, d'après les descriptions, présenter en effet une DI, mais la disparité des caractéristiques entre les patients montre que beaucoup de pathologies différentes ont été regroupées dans la même catégorie.

Par ailleurs, Pinel réforme complètement l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière afin de transformer l'ancien asile où étaient entassés et enchainés des patients atteints de divers troubles, ainsi que des marginaux. Il met en place des conditions de vie plus dignes pour les patients et développe les premiers essais de thérapies. Jean-Etienne Esquirol lui succède à la tête de la Pitié-Salpêtrière. Dans un de ses ouvrages de descriptions de patients (en suivant les mêmes distinctions que Pinel) il dépeint des patients probablement atteints de trisomie 21 (Esquirol, 1838).

Les premières structures et les thérapies adaptées aux patients atteints de DI apparaissent à cette période. En 1840, le premier service hospitalier pour enfants atteints de DI sera dirigé par le Dr Félix Voisin à l'hôpital Bicêtre, et Edouard Séguin fonde la première école privée dédiée à l'éducation des enfants atteints de DI. Dans son ouvrage *Traitement moral, Hygiène et Éducation des idiots,* il expose les premières pistes sur les besoins et l'éducation de ces enfants.

Aux Etats-Unis, à partir de théories raciales bancales qui associent le faciès des patients déficients avec celui d'une autre ethnie, John Langdon Down fait en 1866 une description très précise d'un type de syndrome associé à la déficience intellectuelle qui sera nommé « mongolisme », puis « syndrome de Down. »

Dans le cadre d'une commission ministérielle visant à déterminer quel établissement scolaire est adapté à chaque enfant, le psychologue Alfred Binet et le psychiatre Théodore Simon créent la première échelle métrique de l'intelligence, dans l'objectif d'évaluer et classer les enfants avec et sans déficience (« normaux » et « anormaux »), ainsi que le niveau de déficience (dans les catégories « idiot », « imbécile » et « débile », de la forme plus sévère à la plus légère) (Binet and Simon, 1907). Associé au concept du Quotient Intellectuel par William Stern (1912), ce test est révisé par Lewis Terman et devient le test Stanford-Binet en 1916.

En 1959, les Dr Marthe Gautier, Dr Jérôme Lejeune et Dr Raymond Turpin découvrent chez les patients atteints du syndrome de Down la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Il s'agit de la première découverte d'une cause génétique liée à la déficience intellectuelle.

2 - Définition et classification de la DI

La définition officielle de la DI fait aujourd'hui plus ou moins l'objet d'un consensus international. Les définitions données par le CIM-11 de l'OMS (2018), le DSM-5 (2013) l'APA (2015) et la 11e édition du manuel de définitions (2010) de l'American Association on Intellectual and Developmental Disabilities (AAIDD) tendent à s'accorder afin de pouvoir donner une définition unique. Cependant, il existe encore quelques différences entre ces descriptions.

La DI est caractérisée par un déficit dans diverses fonctions intellectuelles « telles que le raisonnement, la résolution de problèmes, la planification, la pensée abstraite, le jugement, les apprentissages académiques et l'apprentissage par l'expérience… » comme écrit dans le DSM-5. Ces déficits doivent être confirmés par des tests d'intelligence personnalisés, normalisés et standardisés par rapport à la population générale, ainsi que par des évaluations cliniques. De manière générale, le comportement adaptatif du patient est étudié dans trois types de compétences :

- Les compétences conceptuelles, comprenant le langage, le niveau d'alphabétisation, la compréhension des concepts d'argent, de temps et de nombre et la conception de projets de vie.

- Les compétences sociales, comme la responsabilité sociale, l'estime de soi, la crédulité, la naïveté, la résolution de problèmes sociaux et la capacité de suivre les règles et d'obéir aux lois.

- Les compétences pratiques, rassemblant les activités de la vie quotidienne, les compétences professionnelles, le savoir et l'autonomie pratique, comme la gestion de ses propres soins, l'utilisation d'objets électroniques, la gestion du quotidien. (Schalock *et al.*, 2010)

Le diagnostic aujourd'hui repose donc sur la difficulté d'acquisition de l'autonomie personnelle et sociale chez ces patients durant la période développementale.

Le DSM-IV révisé (2004) (APA, 2004) précisait que les patients atteints de DI devaient présenter un QI inférieur à 70 et être âgés de moins de 18 ans lors du diagnostic. Cette dernière spécification a été retirée du DSM-5 mais est toujours présente dans la définition de l'AAIDD. Le degré de sévérité d'une DI était classé dans des intervalles de score obtenus au test de quotient intellectuel (QI) standardisé et normalisé. Il s'agit d'un test psychométrique d'intelligence sous forme de questionnaire, donnant un score étalonné de sorte que sa répartition dans la population générale suive une loi normale (avec une moyenne à 100, l'écart-type est à 15 selon la loi normale). Les patients atteints de DI devaient se situer au moins deux écarts-types en dessous de la moyenne, et chaque écart type de moins augmentait le niveau de sévérité de la DI des patients.

Or, cette classification par intervalles de score au QI n'était pas représentative des déficits réels des patients et ne permettait donc pas d'estimer leurs besoins. Aujourd'hui, les niveaux de sévérité sont définis sous la base du fonctionnement adaptatif, selon les compétences citées ci-dessus et dans le **Tableau 1**.

Sévérité	Compétences conceptuelles	Compétences sociales	Compétences pratiques	Ancien classement par QI
Léger	Résout les problèmes de manière plus pragmatique	Jugement social immature et limité	Peut occuper un emploi avec peu d'habilités conceptuelles	50/55 – 70 ou 2 σ en dessous de la moyenne
Modéré	Compétences académiques de niveau primaire	Difficulté de communication et d'utilisation des codes sociaux	Comportements mal adaptés pouvant rendre l'autonomie quotidienne difficile	35/40 – 50/55 ou 3 σ en dessous de la moyenne
Grave	Compréhension limitée du langage écrit et des concepts liés au temps, aux nombres, à l'argent.	Le langage étant limité, les compétences sociales sont très simples	Nécessite une aide dans toutes les activités de la vie quotidienne	20/25 – 35/40 ou 4 σ en dessous de la moyenne
Profond	Peut utiliser quelques objets dans un but précis	Ne comprend que les instructions et gestes simples	Dépend d'une aide pour tous les soins physiques quotidiens, la santé et la sécurité	Moins de 20/25 ou 5 σ en dessous de la moyenne

Tableau 1: Classement de la DI en fonction du comportement adaptatif d'après le DSM-5, le CIM-11 et l'AAIDD. σ : écart-type. A noter : le classement par score du QI ne correspond pas forcément au niveau de compétences.

La DI peut être associée à un syndrome, c'est-à-dire à une série de critères biologiques, tels des caractères dysmorphiques spécifiques ou des troubles biologiques (neurologiques, cardiaques…). Il s'agit alors d'une DI syndromique. Lorsque que la DI est le seul diagnostic trouvé chez un patient, sans autre caractéristique particulière, elle est appelée DI non syndromique.

La DI peut être associée à des anomalies cérébrales structurales et non structurales, avec un taux moyen de 38% d'après la base de donnée SysID (Kochinke *et al.*, 2016). Plus elles sont importantes, plus la sévérité de la DI associée le sera également, à l'instar d'autres troubles neurologiques. Cependant, ces anomalies permettent rarement d'établir un diagnostic étiologique (INSERM, 2016).

3 - Prévalence

La prévalence de la DI est estimée de 2 à 3% dans la population générale (Maulik *et al.*, 2011). La DI légère (QI > 50) concernerait 1 à 2% de la population en France (David *et al.*, 2014) et dans la plupart des pays développés (Anderson *et al.*, 2019), alors que la DI sévère (QI < 50) toucherait 0,3 à 0,4% de la population en France et dans le monde entier (Leonard *et al.*, 2003). Le sex ratio montre une prévalence plus importante chez les garçons (ratio de 1,2 à 1,9 en faveur des garçons) (David *et al.*, 2014).

4 - Étiologie environnementale et génétique

Les facteurs induisant une DI sont très hétérogènes. Ils sont d'origine environnementale ou génétique, avec des combinaisons des deux origines possibles. Il est cependant important de savoir que 50% des cas diagnostiqués avec une DI ont une étiologie indéterminée (DI idiopathiques) (Milani *et al.*, 2015; Purugganan, 2018).

A - Causes environnementales

Les facteurs environnementaux pouvant être à l'origine d'une DI ont une influence au moment du développement embryonnaire ou durant les premiers mois après la naissance. Ils représentent 15 à 20% des étiologies de DI. Ces facteurs peuvent avoir un impact à eux seuls, par combinaison ou si une vulnérabilité génétique est déjà présente (INSERM, 2016).

- La consommation d'alcool chez la femme enceinte aurait une probabilité de 10 à 15% d'induire une DI chez le fœtus (Popova *et al.*, 2017). L'ensemble de ces pathologies est rassemblée dans les troubles du spectre de l'alcoolisation fœtale (TSAF) (Chudley *et al.*, 2005).

- Les infections fœtales et néonatales : l'infection de la mère au cytomégalovirus, au virus de l'herpès, à la rubéole et à la toxoplasmose, mais aussi les infections néonatales touchant le système nerveux (méningite, septicémie, tétanos) augmentent amplement le risque d'atteintes neurologiques, pouvant entrainer une DI (Mwaniki *et al.*, 2012).

- La malnutrition, incluant le déficit de certains nutriments, comme l'acide folique (Greenblatt *et al.*, 1994) ou l'iode, durant la grossesse et après la naissance (Groce *et al.*, 2014).

- Les complications prénatales (Langridge *et al.*, 2013), comme la restriction de croissance intra-utérine (RCIU), et périnatales (anoxie cérébrale, hémorragie cérébrale, ictère nucléaire), pouvant entrainer des lésions cérébrales non réversibles (encéphalopathie hypoxique-ischémique) et donc divers troubles neurologiques, dont une DI (Pierrat *et al.*, 2005). Le risque est accru chez les grands prématurés (Wood *et al.*, 2000).

- L'exposition à des neurotoxines (métaux lourds, drogues…) chez la femme enceinte ou l'enfant (Liu *et al.*, 2010), comme l'exposition au plomb, qui provoque le saturnisme chez la mère et engendre des complications neurologiques chez l'enfant (Caito and Aschner, 2017).

B - Causes génétiques

Plusieurs types d'anomalies génétiques sont impliqués dans la DI. Elles représenteraient 25 à 50% des cas de DI (Srour and Shevell, 2014).

- Les anomalies chromosomiques, qui rassemblent les pathologies avec une anomalie du nombre de chromosomes (syndromes liés aux trisomies 8, 13, 18, 21 dans les formes les plus courantes, monosomies, triploïdies) ou de leur structure (délétion, inversion, duplication, translocations réciproques entre deux chromosomes).

- Les microarrangements génomiques déséquilibrés, comme la microdélétion 22q11, donnant le syndrome de Di George (McDonald-McGinn *et al.*, 2015).

- Les anomalies monogéniques, où la mutation invalidante d'un gène provoque la plupart du temps une DI modérée à sévère, et parfois syndromique (*MECP2* pour le syndrome de Rett, *FMR1* pour le syndrome de l'X fragile)

- Les anomalies génétiques non mendéliennes, à faible pénétrance. Environ 1400 gènes y sont impliqués, avec une faible récurrence (moins de 1%) (Ilyas, 2019).

III - Les Troubles du Spectre Autistique (TSA)

1) Historique

Bien que le terme autisme fût inventé au début du XXe siècle, des descriptions d'enfants et d'adolescents probablement autistes ont été retrouvés dans l'histoire de la psychiatrie. Comme dit précédemment, le Dr Pinel a rassemblé dans son *Traité médico-philosophique sur l'aliénation mentale* sous le terme d'idiotisme des patients présentant des caractéristiques très diverses. Si une partie des patients semblent en effet atteints de DI, d'autres diagnostics peuvent aujourd'hui s'appliquer sur certains patients. Par exemple, le cas de Victor, l'enfant sauvage de l'Aveyron, découvert en 1797 dans la forêt du Tarn. Enfant mutique, son comportement était considéré comme la conséquence de sa vie dans la nature. Il est aujourd'hui rétrospectivement supposé être atteint d'autisme, et les troubles déjà présents auraient été la cause de son abandon. Quelques observations par son éducateur principal, le Dr Itard, laissent en effet penser que Victor avait des symptômes autistiques, comme une obsession pour l'ordre et des rangements stéréotypés, des balancements, des difficultés de communication, une indifférence partielle aux stimuli tactiles, des « troubles de l'humeur » et son mutisme (qui pourrait cependant avoir été causé par une blessure au larynx, comme le laissait supposer une large cicatrice). Il présentait peut-être également une DI, ce qui expliquerait ses difficultés d'apprentissage. Il est cependant difficile d'établir un diagnostic moderne sur le cas de Victor, tant les descriptions de son cas sont déformées par les théories de l'époque (Hochmann, 2009).

Le terme autisme est donc évoqué pour la première fois par le psychiatre suisse Eugen Bleuler lors de son traité sur la démence précoce, dénomination qu'il récuse afin de définir la maladie par le prisme de troubles dissociatifs, et invente ainsi les termes de schizophrénie et d'autisme. L'étymologie du mot « autisme », traduction de l'allemand « Autismus », vient du grec ancien αὐτός (soi-même), suivi du suffixe –isme (-ismus) utilisé dans de nombreux néologismes du XIX-XXe siècle pour désigner de nouveaux concepts. Bleuler définit l'autisme comme un symptôme secondaire de la psychose schizophrénique, soit la perte de contact avec le monde extérieur et l'enfermement dans ses pensées, son imagination et ses propres sensations (Bleuler and Bleuler, 1986). C'est une définition plus proche de la psychanalyse que de la psychiatrie, issue de la notion d'auto-érotisme de Freud, stade psycho-sexuel de la conscience du nourrisson – Bleuler a souhaité retirer le radical éros pour se détacher des théories sexuelles de Freud probablement (Freud and Jung, 1907). Ainsi, en utilisant ce terme, Bleuler ne décrit pas du tout le trouble infantile qu'on appelle aujourd'hui autisme.

L'essor de la psychanalyse et de la psychiatrie en ce début de siècle engendre une augmentation des observations plus précises et approfondies de cas pathologiques, et de nombreux troubles ont été décrits, étudiés et classés selon de nouveaux concepts. Des descriptions de cas se rapprochant de la

symptomatologie des troubles autistiques tels que nous les connaissons aujourd'hui émergent. C'est en 1943 que le terme autisme est repris par Leo Kanner, lors de l'observation de onze enfants à l'hôpital de Baltimore, âgés de deux à huit ans (Kanner, 1968). Les enfants de l'étude étaient initialement considérés comme « faibles d'esprit », mais Kanner constate que l'origine de leurs troubles se situe dans deux caractéristiques principales : tout d'abord leur besoin de s'isoler et de se couper du monde extérieur (aloneness), et leur besoin d'un environnement immuable et stable (sameness). Il décrit, pour chaque enfant, leurs comportements répétitifs, leur incapacité à utiliser le langage pour communiquer, leur irritabilité face au bruit et aux objets déplacés dans leur environnement familier, leur ignorance face aux sollicitations extérieures.

L'autisme de Kanner, appelé syndrome de Kanner et aujourd'hui autisme infantile, est donc considéré pour la première fois comme une maladie infantile se détachant de la schizophrénie ; bien que certains symptômes entre les deux maladies étaient considérés comme semblables, Kanner démontre que les symptômes des enfants autistes se développent dès les premières années, contrairement à la schizophrénie qui se déclare entre l'adolescence et l'âge adulte.

Kanner ajoute aussi quelques remarques sur le comportement peu affectif de la famille et en particulier sur la froideur de la mère envers leur enfant. Cette idée sera reprise en psychanalyse, qui émettra comme hypothèse que l'autisme est provoqué par un manque affectif inconscient provoqué par la mère, comme le soutient Bettelheim dans son livre « La forteresse vide » (Bettelheim, 1972). L'enfant s'enfermerait alors dans son propre monde. Cette idée est largement décriée aujourd'hui ; aucune preuve ne soutient cette théorie et d'autres causes scientifiquement démontrées expliquent l'apparition de l'autisme désormais.

Un an plus tard, en Autriche, Hans Asperger publie une étude indépendante sur quatre garçons en décrivant « une psychopathie autistique », qui demeure peu connue dans un premier temps (Asperger, 1944). Les symptômes qu'il décrit possèdent des similitudes avec ceux des patients de Kanner malgré certaines différences. En effet, les enfants étudiés présentent certes un bon niveau de langage, mais avec des altérations dans la communication, en particulier dans la communication non-verbale. Ils ont des difficultés à exprimer des émotions et à comprendre celles de leurs interlocuteurs, ainsi que tout comportement social subtil, ce qui conduit un évitement du contact social. Asperger retrouve chez ses patients des gestes répétés et une aversion pour un changement de l'environnement familier et de leurs habitudes. Leurs compétences intellectuelles sont cependant bonnes voire excellentes, mais uniquement dans un ou quelques domaines. En effet ils présentent un intérêt intense pour un ou deux sujets en particulier, et leurs capacités leur permettent d'exploiter cet intérêt au maximum (mémorisation des connaissances, visuelles, …) Physiquement, ils présentent une posture maladroite, des compétences motrices faibles, des mouvements gauches, stéréotypés et répétés.

La redécouverte des travaux d'Asperger est due à l'étude de Lorna Wing en 1980, qui propose une nouvelle description avec 34 nouveaux cas (Wing, 1981a). En le comparant avec l'autisme infantile de Kanner, elle considère qu'il s'agit de la même pathologie, mais avec des critères étendus, notamment sur les différents degrés de capacités intellectuelles chez les patients. Wing introduit alors pour la première fois la notion de continuum autistique, qui sera renommé ensuite spectre autistique. Elle établit des critères communs à toutes les formes d'autisme rencontrées, soit des troubles de l'interaction sociale et du décodage des règles sociales, de la communication verbale ainsi que des comportements restreints, répétitifs et stéréotypés (Wing, 1981b). Ces critères sont appelés triade de Wing ou triade autistique.

Les premières découvertes indiquant une étiologie génétique datent de la fin du XXe siècle, présentant ainsi cette pathologie sous un angle nouveau. Dès 1977, des études de jumeaux montrent un lien génétique de type multifactoriel (Folstein and Rutter, 1977; Jorde *et al.*, 1991), avec une concordance entre jumeaux monozygotes de 68 à 98% (Bailey *et al.*, 1996).

2) Définition et classification des TSA

Auparavant associé à la schizophrénie infantile, l'autisme est référencé en tant que tel dans la 3e édition du DSM publié en 1980 (Dell'Osso *et al.*, 2016) sous le nom d'autisme infantile, puis trouble autistique dans sa révision.

Le trouble autistique et le syndrome d'Asperger sont présentées comme deux pathologies distinctes et classés dans la catégorie « Troubles envahissants du développement » (TED) dans le DSM-IV (1994) (APA, 2004). Ils sont réunis dans le DSM-5 (2013) parmi les troubles neurodéveloppementaux sous le nom de troubles du spectre autistique (TSA), tout comme dans le CIM-11.

Les TSA sont donc caractérisés par :

- Des altérations des interactions sociales qui se traduisent par une difficulté à interagir avec les autres, à comprendre et suivre les codes sociaux. Les patients expriment peu leurs émotions sauf les émotions violentes (comme la peur ou la colère) et ne comprennent pas celles d'autrui.

- Des troubles de la communication verbale et non verbale. Les troubles de la communication verbale sont plus ou moins importants chez les personnes autistes, pouvant aller d'une absence de langage à seulement une utilisation inhabituelle du langage, de formulations, ou en répétant inlassablement les mêmes phrases. Les patients atteints de TSA peinent également à comprendre et à utiliser les éléments de communication non verbaux comme les gestes, les expressions du visage, le regard ou le ton de la voix.

- Des troubles du comportement correspondant à un répertoire d'intérêts et d'activités restreints, stéréotypés et répétitifs. Ils se traduisent par des mouvements atypiques, des arrangements de l'environnement précis, des comportements répétitifs et une intolérance au changement.

- Des troubles sensoriels. Les patients atteints de TSA présentent des réactions sensorielles exacerbées et inhabituelles, et sont particulièrement sensibles au contact physique, aux odeurs.

Des études récentes démontrent également des différences dans la composition du microbiote intestinal chez les patients autistes par rapport à des personne neurotypiques (Hsiao *et al.*, 2013; Persico and Napolioni, 2013).

Les TSA sont classés par le DSM-5 en fonction de leur association à une pathologie médicale ou génétique connue, à un facteur environnemental, à un autre trouble développemental, mental ou comportemental, en prenant compte de la sévérité des symptômes et du niveau d'aide nécessaire à apporter au quotidien, et si le trouble est associé à une DI ou à un trouble du langage. Dans le CIM-11, la classification se réalise en fonction de leur association avec une DI et/ou des troubles du langage fonctionnel (avec ou sans DI, avec ou sans troubles du langage fonctionnel, ou avec absence de langage fonctionnel). (OMS, 2018)

Le diagnostic est posé durant la période de développement, et les premiers signes apparaissent durant les premières années de vie (Parner *et al.*, 2008). Les études sur l'eye-tracking sont par exemple un outil de détection précoce qui étudie la direction du regard, notamment sur les visages pendant une conversation (Donati *et al.*, 2020). Cependant, une des critiques associée au DSM-5 est que le seuil diagnostique serait plus restrictif que celui du DSM-IV et pourrait ne pas inclure des patients avec certaines formes d'autisme (McPartland *et al.*, 2012).

3) Etiologie

Longtemps considéré comme un trouble d'ordre psychologique ou psychanalytique, l'autisme est désormais perçu comme un trouble neurodéveloppemental d'origine multifactorielle, où sont impliqués des facteurs environnementaux, génétiques et épigénétiques.

a) Causes environnementales

A l'instar des facteurs de la DI et en raison de leur impact sur le neurodéveloppement, les facteurs environnementaux qui augmenteraient le risque de développer des TSA occurrent durant la

période prénatale, périnatale et postnatale. D'ailleurs certains facteurs décrits pour la DI sont communs aux facteurs de risque pour les TSA.

Parmi eux, les risques liés à la maladie chronique ou aux infections de la mère durant la gestation, ou se déclenchant au moment de la grossesse, comme le diabète gestationnel (Xiang *et al.*, 2015), l'hypothyroïdie (Getahun *et al.*, 2018), les maladies auto-immunes, en raison du caractère inflammatoire engendré et de l'augmentation de la concentration en cytokines (Chen *et al.*, 2016). Les infections virales déjà connues pour être à l'origine de malformations congénitales, comme le cytomégalovirus (Maeyama *et al.*, 2018), le virus de la rubéole (Ornoy *et al.*, 2015) et peut-être même le virus Zika (Vianna *et al.*, 2018) sont également considérées comme des facteurs de risque des TSA.

L'exposition à certaines substances au cours de la grossesse augmenterait le risque que le futur enfant développe des TSA, tel que l'alcool (les caractéristiques autistiques pouvant faire partie des TSAF (Stevens *et al.*, 2013)), la cocaïne (Davis *et al.*, 1992) et d'autres drogues (Harris *et al.*, 1995), certains médicaments, comme l'acide valproïque, utilisé comme antiépileptique ou traitement secondaire des troubles bipolaires (Christensen *et al.*, 2013), le thalidomide, utilisé auparavant comme traitement contre la lèpre et les myélomes multiples (Strömland *et al.*, 1994), et également l'exposition à certains polluants : la pollution atmosphérique (Lyall *et al.*, 2014; Rzhetsky *et al.*, 2014), les pesticides organochlorés (Roberts *et al.*, 2007), organophosphorés et des pyréthroïdes (Shelton *et al.*, 2014) ou encore des agent ignifugeants de la classe des polybromodyphénylléthers (PBDE) qui perturberait l'axe thyroïdien (Gascon *et al.*, 2011).

Les accidents prénataux et périnataux comme les troubles respiratoires périnataux (dont le syndrome de détresse respiratoire), la jaunisse (Froehlich-Santino *et al.*, 2014), les grands prématurés (dans une moindre mesure) (Langridge *et al.*, 2013), ainsi que le déficit de certains nutriments essentiels lors de la grossesse, comme l'acide folique (Lyall *et al.*, 2014) ou la vitamine D (Stubbs *et al.*, 2016) sont suspectés d'être d'autres facteurs de risque, mais des études restent à faire pour prouver leur impact.

b) Causes génétiques

L'implication de la génétique dans les TSA est une part importante de son étiologie. L'ensemble des études sur le risque familial soulignerait une héritabilité de la pathologie (soit la proportion d'implication génétique des TSA au sein de la population) de 50% (Bourgeron, 2016). Les études de jumeaux et familiales montrent que les TSA se révèlent être les troubles les plus héritables parmi les troubles du neurodéveloppement (Tick *et al.*, 2016). Il est également à noter que 30% des mutations impliqués dans les TSA surviennent *de novo* (Ronemus *et al.*, 2014).

Les causes génétiques peuvent être dues à une anomalie chromosomique, qui représentent jusqu'à 20% des cas de TSA (Douard *et al.*, 2020), comme la duplication ou la délétion au niveau de la région 15q11-13 du syndrome de Prader Willi, ou à des variations nucléotidiques situées dans les régions codantes ou non codantes du génome. Quand la mutation invalidante d'un gène a un effet majeur, on parle de pénétrance forte, mais celle des gènes impliqués dans les TSA est la plupart du temps incomplète et variable, la présence de variants de ces gènes ne fait alors qu'augmenter le risque de développer des TSA (Schaaf *et al.*, 2020), et notamment si plusieurs gènes impliqués sont mutés au sein d'un même génome (Sandin *et al.*, 2014).

c) Epigénétique : Interaction gènes-environnement

L'expression phénotypique de certains variants à risque de TSA se développerait seulement si l'individu porteur est exposé à un environnement particulier. Les mécanismes sous-jacents de ce phénomène sont épigénétiques. L'environnement influe sur l'expression ou le niveau d'expression de certains gènes en modifiant la méthylation de l'ADN ou la conformation de la chromatine par acétylation ou méthylation des histones. Cette influence de l'environnement pourrait donc faire exprimer des gènes qui n'auraient pas été exprimés dans un autre contexte, et si ces gènes présentent des variations augmentant les facteurs de risque liés aux TSA, la probabilité de développer des TSA serait augmentée.

Ce phénomène est appelé vulnérabilité génétique, et est appuyé par des études de jumeaux monozygotes dont un seul des deux est atteint de TSA. Le génome du patient atteint de TSA présente des différences de méthylation sur les îlots CpG, notamment en amont de gènes impliqués dans les TSA. De manière générale, l'étude souligne une corrélation positive entre symptômes autistiques et augmentation du taux d'îlots CpG méthylés (Wong *et al.*, 2014).

4) Prévalence

Les données épidémiologiques récentes indiquent une prévalence des TSA d'environ 1% des enfants et des adultes (Elsabbagh *et al.*, 2012; Fakhro, 2020). Auparavant considéré comme une pathologie rare avec des taux de prévalence faible (environ 0,04% (Rutter, 2005)), l'augmentation de la prévalence est principalement lié à la hausse du nombre de diagnostics de formes légères d'autisme, et une meilleure connaissance de ces troubles a permis de poser plus de diagnostics, à un âge plus précoce (Parner *et al.*, 2008), mais aussi chez des adultes.

Le sex ratio des TSA est aujourd'hui de 3 garçons pour 1 fille (Loomes *et al.*, 2017). Auparavant, il était estimé à 4 garçons pour 1 fille, notamment à cause de biais dans le diagnostic, sous-estimé chez

les filles pour des raisons sociales (Russell *et al.*, 2011), à cause d'un phénotype particulier chez les patientes (Frazier *et al.*, 2014) ou parce que les patientes de haut-niveau « camoufleraient » les symptômes (Bargiela *et al.*, 2016). Malgré ces biais, la prédominance des TSA en faveur des garçons est indéniable. Cet écart peut être expliqué par la génétique, où des gènes impliqués ou susceptibles d'être impliqués dans des troubles neurodéveloppementaux incluant des troubles autistiques sont situés sur le chromosome X, mais la prévalence des maladies liées à l'X n'est pas suffisante pour expliquer cette différence (Mandel and Chelly, 2004).

Il a été constaté que les femmes diagnostiquées autistes posséderaient des perturbations (CNV et SNV) associées aux TSA plus importantes au sein du génome (Jacquemont *et al.*, 2014) et que pour les mêmes perturbations génétiques présentes chez les frères et sœurs, les femmes seraient moins atteintes de TSA que leurs frères (Robinson *et al.*, 2013), suggérant un effet protecteur aussi sein de l'organisme. Cet effet peut être, entre autres, expliqué par l'équilibre des hormones sexuelles (Werling *et al.*, 2013). En effet, il a été montré que l'expression protéique des récepteurs β aux œstrogènes ainsi que de l'aromatase, l'enzyme convertissant la testostérone en œstrogène, serait diminuée chez les patients atteints de TSA (Crider *et al.*, 2014). Les œstrogènes auraient alors un effet protecteur, bien qu'il ait été aussi montré que la concentration en hormones stéroïdiennes et en œstradiol dans le liquide amniotique de garçons atteints d'autisme était plus élevée que chez des garçons contrôles (Baron-Cohen *et al.*, 2015, 2020).

IV - Comorbidités entre TSA et les autres troubles neurodéveloppementaux

1 - Comorbidités entre TSA et autres pathologies

Il est aujourd'hui de plus en plus mis en évidence que les TND présentent des comorbidités entre elles. C'est d'ailleurs une des évolutions du DSM-5 dans sa description des TND par une approche dimensionnelle, privilégiant les possibilités de comorbidités entre chaque trouble par rapport à la version précédente (APA, 2015), qui était plus encline à catégoriser les différents troubles et à dénoter leur spécificité (APA, 2004). Cette approche permet de représenter de manière plus appropriée la réalité clinique pour chaque patient en intégrant les symptômes comorbides dans le diagnostic afin d'établir une thérapie adaptée. Les TSA en particulier présentent un tableau clinique très hétérogène et qui diffère d'un patient à un autre. De plus, certains symptômes peuvent être aussi bien attribués aux TSA qu'à d'autres TND, rendant le diagnostic plus compliqué. Chaque TND peut en effet se développer en plus des TSA, comme les troubles de la coordination (dyspraxie) (McPartland and Klin, 2006), les TDA et

TDAH (Reiersen and Todd, 2008), les troubles moteurs (60 à 80%), la DI (Geschwind, 2009). Quant aux troubles sensoriels, présentés auparavant comme une comorbidité courante (Geschwind, 2009), font désormais partie du diagnostic des TSA (APA, 2015).

Il est très fréquent que les patients atteints de TSA présentent des comorbidités avec des troubles psychiatriques. En effet, 70% d'entre eux présenteraient au moins un trouble psychiatrique, et 40% d'entre eux pourraient en avoir deux ou plus (DeFilippis, 2018), mais ce taux reste très difficile à évaluer. Selon les dernières méta-analyses (Hossain *et al.*, 2020), parmi les personnes atteintes de TSA, la prévalence de troubles anxieux est de 1,47 à 54% (van Steensel *et al.*, 2011; Hollocks *et al.*, 2019), voire de 11 à 84% chez les enfants (White *et al.*, 2009), les troubles dépressifs de 2,5 à 47,1% avec une moyenne de 12% (Hudson, Hall and Harkness, 2019; Lai *et al.*, 2019), les TDAH autour de 27% (Lai *et al.*, 2019; Lugo-Marín *et al.*, 2019), les troubles bipolaires de 5% à 21,4% (Vannucchi *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2019), la schizophrénie de 4 à 67%, les troubles du sommeil de 13 (Lai et al. 2019) à 55% (Geschwind, 2009), les TOC entre 9 et 22% (van Steensel *et al.*, 2011; Hollocks *et al.*, 2019; Lai *et al.*, 2019) et les troubles des conduites entre 12 et 48% (Richa *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2019).

Les autres troubles pathologiques présentant une comorbidité avec les TSA sont, entre autres, l'épilepsie, très présente avec un taux de comorbidité de 12,1 à 25% (Canitano, 2007; Lukmanji *et al.*, 2019), les troubles gastro-intestinaux, estimés à 45% (Erickson *et al.*, 2005; Geschwind, 2009) et les maladies mitochondriales, dont les neuropathies périphériques, évaluées à 7,2% (Frye and Rossignol, 2011).

La comorbidité entre ces troubles et les TSA peut s'expliquer par des mécanismes génétiquement communs. En effet, des gènes impliqués dans l'étiologie des TSA sont également suspectés de causer d'autres maladies neuropsychiatriques. Il s'agit de gènes dont l'expressivité est variable. On peut citer *SLC6A4*, un transporteur sérotoninergique impliqué dans les TSA (Li *et al.*, 2012) mais également dans les TDAH (Hawi *et al.*, 2015), les troubles obsessionnels compulsifs (TOC) (Hu *et al.*, 2006) et la dépression (Assary *et al.*, 2018), ou encore *CNTNAP2* qui est associé à la fois aux TSA et à la schizophrénie (Burbach and van der Zwaag, 2009) ainsi qu'aux TDAH et à l'épilepsie (Poot, 2015). Ainsi la perturbation de gènes identiques peut conduire à différents troubles, suggérant qu'ils partagent des mécanismes communs.

2 - Comorbidités entre TSA et DI

Il est très difficile d'estimer l'intelligence de certains patients atteints de TSA si la communication est altérée. Ces derniers peuvent en effet présenter des troubles de l'apprentissage sans être atteints de DI. C'est pourquoi l'estimation de la prévalence de la DI chez les enfants atteints de TSA

varie de 25% (Dawson *et al.*, 2008) à 70% (Chakrabarti and Fombonne, 2001). D'ailleurs, il s'avère récemment que la prévalence de la DI chez les patients atteints de TSA a été surestimée (Edelson, 2016), probablement parce qu'il est plus facile de se rendre compte de la présence de troubles quand un patient présente des TSA et une DI (Skuse, 2007).

De nombreux gènes sont impliqués dans les TSA et la DI, à commencer par les gènes responsables de TSA syndromiques (**Tableau 2**). Parmi ces syndromes, on peut citer la sclérose tubéreuse de Bourneville (TS), induite par des mutations dans les gènes *TSC1* et *TSC2*, le syndrome de l'X-fragile, la neurofibromatose de type 1 (mutation du gène *NF1*), le Syndrome d'Angelman (mutation du gène *UBE3A*) , le syndrome de Prader Willi, le syndrome de Rett et d'autres encore (Zafeiriou *et al.*, 2007).

Syndrome	**Prévalence d'avoir des TSA chez un patient atteint du syndrome**	**Prévalence d'être atteint du syndrome chez un patient avec des TSA**
Sclérose tubéreuse de Bourneville	16 à 65%	0 à 4%
Syndrome de l'X-fragile	25 à 33%	0 à 2,1%
Trisomie 21	1 à 10 %	0 à 10%
Neurofibromatose de type 1	nd	0 à 1,4%
Syndrome d'Angelman	42%	0 à 1%
Syndrome de Prader Willi	25,3%	nd

Tableau 2: Comorbidités entre TSA et syndromes à transmission mendélienne. D'après la revue de Zafeiriou et al., 2007

Plus récemment, l'augmentation des études de génome chez des patients a permis de mettre en évidence des gènes pouvant être à l'origine de TSA ou de DI, comme *NLGN3* ou *NLGN4X* (Jamain *et al.*, 2003; Laumonnier *et al.*, 2004). En effet, les gènes impliqués dans les TSA, la DI et également la

schizophrénie seraient impliqués dans les mêmes voies physiologiques, mais à des périodes de développement différentes et dans des régions cérébrales différentes (Shohat *et al.*, 2017).

V - Anomalies cérébrales de la DI et des TSA

1 - Anomalies cérébrales structurales et fonctionnelles dans la DI

Les malformations cérébrales et autres anomalies de structure sont assez fréquentes chez les patients atteints de DI, dans 30 % des cas (INSERM, 2016). Ces anomalies sont la conséquence d'une altération du développement cérébral pendant la gestation. Plus les altérations arrivent précocement, plus les malformations seront importantes et visibles à l'IRM, et entraineront des conséquences pathologiques, comme une DI, mais également de l'épilepsie ou un retard de développement. Il s'agit plus précisément de malformations du développement cortical, qui se déroule en trois étapes principales, d'abord une étape de prolifération neuronale (7 à 16 semaines de gestation), ensuite la migration neuronale (entre 12 et 22 semaines) pendant laquelle les neurones se répartissent entre les différentes couches corticales, et enfin l'organisation post-migrationnelle (22e semaine embryonnaire à 2 ans postnatal), qui réunit toutes les étapes de neuritogenèse et synaptogenèse permettant les connexions entre les neurones (Bystron *et al.*, 2008).

Les malformations corrélées à des cas de la DI sont entre autres les anomalies du volume cérébral, comme la micro-encéphalie, où le volume est plus petit que la moyenne, et plus rarement, la macro-encéphalie. Il s'agit généralement de la conséquence d'un défaut lors de la prolifération neuronale, donnant un nombre de neurones plus petit ou plus grand. Les causes génétiques responsables de ce type de malformation ont donc un impact sur les voies de prolifération ou de l'apoptose, tel la voie mTOR ou Sonic Hedgehog (SHH), ou sinon sur l'organisation des microtubules (tubulinopathies) (Yeung *et al.*, 2017; Juric-Sekhar *et al.*, 2019).

La lissencéphalie est une autre malformation induisant une diminution du nombre des circonvolutions de l'encéphale. A l'inverse, la polymicrogyrie est une augmentation anormale de petites circonvolutions dans certaines régions corticales. Ces deux phénomènes, appelées dysplasies corticales, peuvent être entre autres la conséquence d'altérations lors de phase de migration neuronale, et sont aussi associés à une altération des gènes de la tubuline ou des protéines associés à la tubuline.

Enfin, les anomalies qui occurrent durant la phase post-migrationnelle sont associées à des défauts d'élongation des neurites (axones et dendrites) (Juric-Sekhar *et al.*, 2019), comme les anomalies du corps calleux, comprenant l'agénésie complète à partielle ainsi que les dysgénésies, qui représentent

2 à 3% des DI (Heide *et al.*, 2017), parfois en étant associés à d'autres malformations sévères, comme l'holoprosencéphalie, un défaut de séparation entre les hémisphères.

Les malformations du développement cortical sont soient génétiques, induites souvent par des mutations *de novo* de gènes comme *MCPH1*, *CDK5RAP2*, *CENPJ* (Thornton and Woods, 2009) *WDR62* (Yu *et al.*, 2010) impliqués dans les étapes de la mitose, *LIS1, DCX*, donnant des protéines associés aux microtubules (Microtubule-associated proteins, MAP) (Di Donato *et al.*, 2017). Les mutations de *FOXG1* sont quant à elles responsables de microcéphalies post-migrationnelles. Les loci associés aux anomalies du corps calleux sont 6qter, 18q21 (comprenant *TCF4*), 1q43q44, 17p13.3, 14q12, 3q13, 3p26, 3q26 (comprenant *SOX2*), 8q21.1, 19p13.1, 10p12 (incluant *ZEB1*) et 7q36 (comprenant *SHH*) (Heide *et al.*, 2017). Par ailleurs, le retard de croissance intra-utérine (RCIU), engendré la plupart du temps par une insuffisance placentaire (Ghidini, 1996) est un cause non génétique de malformations corticales.

Pour les anomalies de structure dans la DI, les régions qui sont impactées ont un rôle important dans la cognition. Beaucoup d'entre elles affectent l'hippocampe (Li *et al.*, 2019) en particulier dans les DI syndromiques. Il est observé entre autres une diminution de la taille de l'hippocampe dans la trisomie 21 (Geuze *et al.*, 2005), le syndrome de Rett (Carter *et al.*, 2008), de l'X-fragile, mais aussi dans les TSAF (Norman *et al.*, 2009).

2 - Anomalies cérébrales dans les TSA

Le cerveau social est représenté par les régions incluses dans la cognition sociale, comme le lobe frontal, le cortex temporal supérieur, le cortex pariétal et l'amygdale (**Figure 1**) (Adolphs, 2001). Le gyrus fusiforme et le sillon temporal supérieur (STS) sont impliqués dans la perception sociale des informations sensorielles qu'ils reçoivent, comme le traitement de la reconnaissance visuelle des visages de l'expression et du regard (Haxby *et al.*, 2000) et le traitement du langage. Les aires du comportement social comprennent le cortex moteur, le gyrus frontal inférieur contenant l'aire de Broca, liée au cortex moteur supplémentaire, impliqué dans l'expression du langage (Redcay, 2008). Les études d'anomalies se sont donc penchées sur les structures de ces régions.

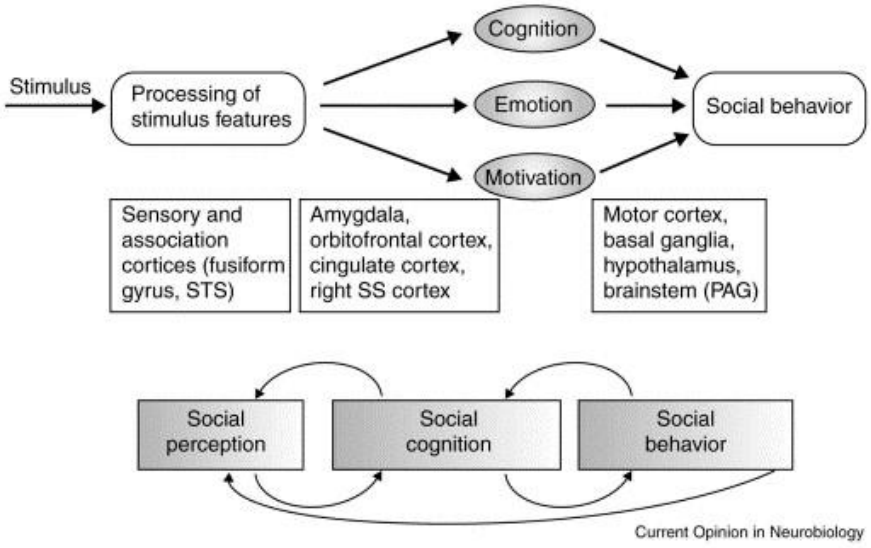


Figure 1 : Organisation des processus du cerveau impliqués dans la perception, la cognition et le comportement social. La perception est médiée par le gyrus fusiforme et le sulcus temporal supérieur (STS) en association avec l'amygdale, le cortex orbitofrontal, les cortex cingulaires antérieur et postérieur et le cortex somatosensoriel (SS) droit. Ces processus agissent à leur tour sur les systèmes effecteurs, tels les cortex moteurs et prémoteurs et les noyaux gris centraux, ainsi que les systèmes en lien avec le manifestations émotionnelles, tels que l'hypothalamus et la substance grise périaqueducale (PAG) (Adolphs, 2001).

Au niveau neuro-anatomique, les premières études sur des patients atteints de TSA se sont penchées sur la circonférence de la tête chez les enfants et adolescents (Walker, 1977; Bailey *et al.*, 1995). La plupart des études rapportent une augmentation du périmètre crânien fronto-occipital par rapport à la moyenne, mais pas pour tous. Une méta-analyse met en évidence que le périmètre crânien serait plus petit à la naissance, augmenterait durant la première année de vie jusqu'à être 10% plus grand que la normale, puis cet écart diminuerait avec l'âge (2% plus grand à l'adolescence, 1% plus grand à l'âge adulte) (Redcay and Courchesne, 2005). Les études s'appuyant sur les mesures du volume cérébral total présentent en moyenne des données qui sont confirment les conclusions de la mesure du périmètre crânien ; le volume cérébral est légèrement plus petit à la naissance, puis augmente beaucoup dans les premières années de la vie, suggérant une croissance cérébrale importante et rapide, mais que cette croissance ralentit fortement, voire déclinerait, ainsi le cerveau des patients adultes atteints de TSA rejoindrait un volume normal par rapport à la population (**Figure 2**) (Courchesne *et al.*, 2011; Jumah *et al.*, 2016).

Cette méga-encéphalie de l'enfance s'expliquerait par un épaississement puis un amincissement de la couche corticale, comme le montrent les études d'IRM et de dissections post-mortem qui ont détecté diverses anomalies de l'épaisseur de la matière grise (Zielinski *et al.*, 2014). L'augmentation de substance grise entraine des anomalies de la gyrification, c'est-à-dire d'anomalies de circonvolutions

corticales. Elles sont également retrouvées majoritairement chez les jeunes enfants, puis décroissent avec l'âge (Hardan *et al.*, 2004). Des macrogyries sont retrouvées dans les lobes frontaux et pariétaux (Piven *et al.*, 1990).

Ces anomalies ne sont cependant pas un outil de diagnostic, car leur caractérisation est encore controversé et non spécifique à l'autisme, mais aussi à d'autres troubles neurologiques (TDAH, trouble du langage…) (Gillberg and Souza, 2002; Herbert *et al.*, 2004)

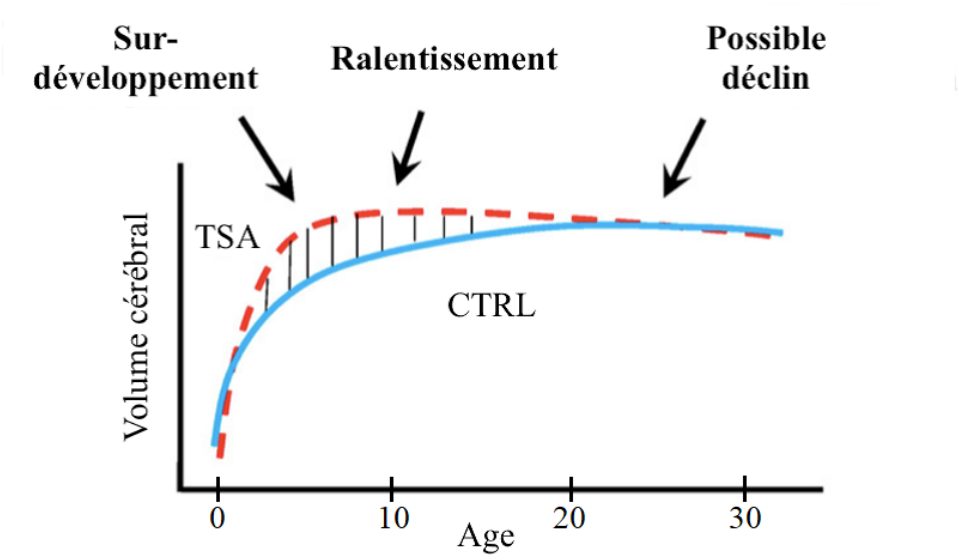


Figure 2 : Les trois phases de croissance cérébrale dans l'autisme, présentant un surdéveloppement précoce du volume cérébral avant un ralentissement. La ligne rouge représente le développement cérébral de personnes atteintes de TSA, alors que la ligne bleue représente celui d'individus contrôles. Dans quelques cas et selon les régions cérébrales, une légère dégénérescence est observée. (D'après Courchesne *et al.*, 2011)

Le cervelet est une région qui semble assez affectée par l'autisme. Son volume, chez les enfants autistes, est augmenté, comme d'autres régions, mais particulièrement au niveau de la matière blanche. La substance grise est au contraire amincie, et une hypoplasie des couches cérébelleuses VI et VII est mise en évidence (Courchesne *et al.*, 1988). Le volume du vermis cérébelleux est retrouvé plus petit ou plus grand (Piven *et al.*, 1997), et les études de cerveau post-mortem démontrent une diminution importante du nombre de cellules de Purkinje et des cellules granuleuses (Bauman and Kemper, 2005). Au niveau du système limbique, impliqué dans la mémoire (hippocampe) et la cognition des émotions (amygdale), des conclusions différentes sont retrouvées : pas de diminution de la taille de volume de l'hippocampe, sauf si on la compare au volume du cerveau total (Geuze *et al.*, 2005), ou une diminution du volume de l'amygdale (Aylward *et al.*, 1999) alors qu'une autre étude pointe au contraire une augmentation du volume de l'hippocampe et de l'amygdale (Sparks *et al.*, 2002).

Ces anomalies, parfois situées dans des régions liées à la perception, la cognition et le comportement social, ne permettent pas, cependant, de faire émerger une cohérence pathologique dans la neuro-anatomie des personnes atteintes de TSA ; les résultats de ces études sont trop divergents, en raison de l'hétérogénéité des symptômes et de la présence de comorbidités, notamment avec d'autres troubles neurologiques pouvant avoir une base structurale anormale (DI, retard de développement, épilepsie…). L'idéal serait de mener une étude chez des patients présentant des symptômes très similaires et aucune comorbidité, afin de pouvoir mettre en évidence des spécificités neuro-anatomiques aux TSA.

La connectivité chez les patients atteints de TSA est perturbée entre les régions, comme le montrent les études structurales de la substance blanche, composé des prolongements axonaux myélinisés. Le corps calleux, qui réunit les prolongements de longue distance permettant la communication interhémisphérique et entre les différents lobes, est retrouvé altéré et aminci entre la plupart des régions (Herbert *et al.*, 2005; Frazier *et al.*, 2012), en particulier dans la région du langage chez des enfants autistes présentant des troubles du langage (Jung *et al.*, 2019). La substance blanche est quant à elle fortement augmentée au sein-même du cortex frontal, temporal, tempo-pariétal et cingulaire (Schumann *et al.*, 2010). Ces hyperplasies sont observées durant l'enfance et se réduisent à l'adolescence et à l'âge adulte (Courchesne *et al.*, 2004; Herbert *et al.*, 2004).

Chapitre 2 : La génétique dans les TSA et la DI

Malgré une étiologie diverse, il est tout à fait établi que la génétique est une part importante dans la DI et les TSA, et de nombreux gènes candidats ont été mis en évidence au cours de ces dernières décennies (**Figure 3**). En effet, 25% des cas de TSA seraient d'origine génétique et ce taux serait de 25 à 50% pour la DI (INSERM, 2016). Aujourd'hui, 960 gènes seraient associés à des cas de TSA à partir de la base de données de la Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI gene database : https://gene.sfari.org) et 1412 gènes à diverses formes de DI d'après SysID (https://www.sysid.dbmr.unibe.ch/) (Kochinke *et al.*, 2016).

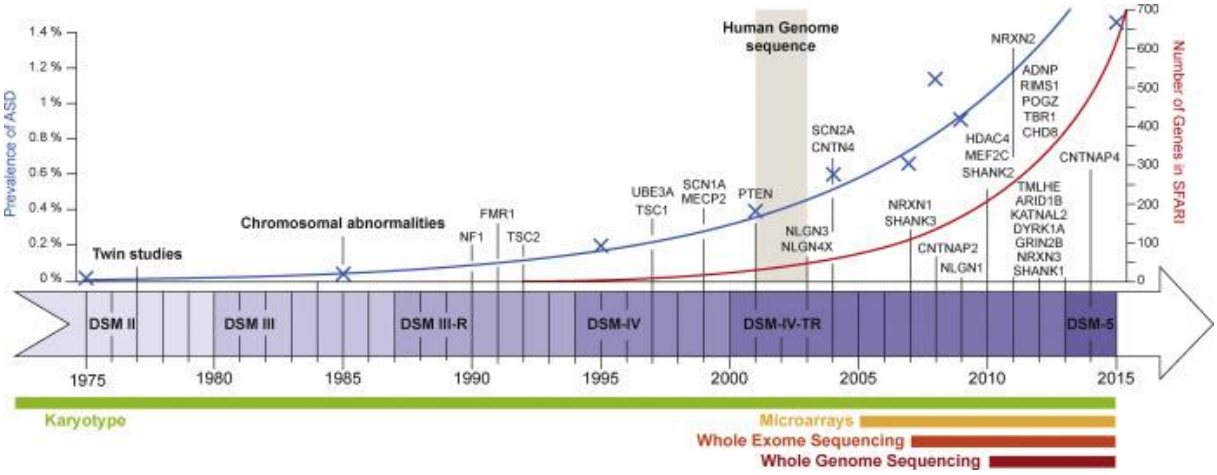


Figure 3 : Evolution chronologique de la découverte des gènes associés au TSA de 1975 à 2015. La courbe rouge représente les gènes référencées dans la base de données SFARI, la courbe bleue est l'estimation de la prévalence des cas de TSA dans la population d'après le Centre pour le contrôle et la prévention des maladies aux Etats-Unis (Center for Disease Control and Prevention, CDC). La frise chronologique présente également les différentes versions du DSM et l'apparition de quelques outils de détection du génome (Bourgeron, 2016).

L'héritabilité est une mesure qui prend en compte la part génétique d'un trait phénotypique au sein d'une population. Dans le cadre de la recherche sur les TSA, les études se sont concentrées à connaître l'héritabilité de ces pathologies, c'est-à-dire l'implication de la génétique dans l'émergence de ces maladies. L'héritabilité est l'étape préalable de la recherche génétique d'une maladie. En effet, il s'agit de savoir si la maladie est génétique et héréditaire avant de chercher les gènes impliqués.

Les premières études d'héritabilité des TSA remontent à la fin des années 70, sur une cohorte de 21 jumeaux monozygotes et dizygotes où l'un des frères présentait les caractéristiques d'un autisme infantile, et le taux de concordance (nombre de paires où les deux jumeaux sont atteints sur le nombre total de paires de jumeaux) était calculé. Il était de 36% chez les paires de jumeaux monozygotes et 0% chez les paires de jumeaux dizygotes pour ce petit échantillon (Folstein and Rutter, 1977). Aujourd'hui,

les études de cohortes de jumeaux se sont multipliées et étendues à toute la famille, et les comparaisons reposent à présent sur une comparaison génétique. Une étude de 2014 a calculé le risque relatif de récurrence (RRR), soit le rapport du risque que l'apparenté d'un patient atteint de TSA le soit également sur le risque que l'apparenté d'une personne non malade soit atteinte de TSA. Le RRR de développer des TSA est donc de 153 pour le jumeau monozygote d'un patient, de 8 et de 10 pour un jumeau dizygote, un frère ou une sœur, de 3 pour un demi-frère ou une demi-sœur et de 2 pour un cousin (Sandin *et al.*, 2014). Sachant que le RRR qu'un frère ait une maladie suivant les lois de Mendel se situe entre 100 et 500 et entre 10 à 50 pour une maladie complexe (Feingold *et al.*, 1998) les TSA se situent alors dans le cas des maladies génétiques complexes. Dans le cas de la DI, l'héritabilité est aujourd'hui confirmée grâce à l'étude des syndromes associés à une DI et suspectée pour d'autres gènes dont la transmission est complexe.

En effet, au-delà de l'héritabilité, la transmission des gènes pathologiques a un impact variable sur la descendance en fonction des modes de transmission (**Figure 4**). Différents modèles d'architecture génétique sont mis en évidence. D'une part, le modèle mendélien propose un mode de transmission monogénique et monofactoriel, c'est-à-dire ne concernant qu'un seul gène présentant un variant rare (présent dans moins de 1% de la population) (**Figure 4A**). L'expression de l'allèle pathologique dépend de deux paramètres : sa dominance ou sa récessivité par rapport à l'allèle sain, ou sa position sur des chromosomes autosomiques ou sexuels.

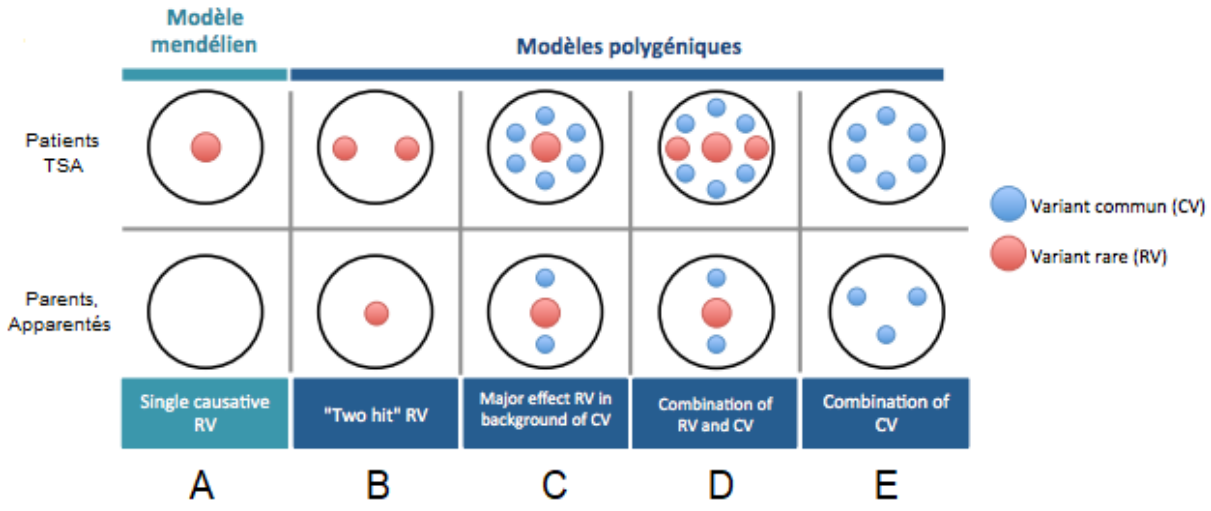


Figure 4 : Modèles génétiques théoriques associés aux TSA, d'après Berg and Geschwind, 2012.

D'autre part, lorsque la transmission d'une maladie héréditaire n'est pas expliquée par la présence d'un seul variant rare et délétère et ne suit donc pas le modèle mendélien, on recherche une étiologie génétique multigénique ou multifactorielle. Cela signifie que la maladie s'exprime si plusieurs

gènes possèdent des variants rares et/ou communs avec un impact variable, qui n'exprimerait la maladie que conjointement, et parfois qu'en présence de certains facteurs environnementaux. Plusieurs modèles théoriques sont proposées :

- Le modèle Variant commun – Maladie fréquente (Common Variant-Common Disease, CVCD) où l'association simultanée de plusieurs variants génétiques retrouvées fréquemment dans la population (plus de 1%) provoquerait l'expression de la maladie (**Figure 4E**). C'est une hypothèse considérée comme peu probable dans le cas des DI et TSA (Devlin *et al.,* 2011).
- Le modèle Variant rare – Maladie fréquente (Rare Variant-Common Disease, RVCD). L'association d'au moins deux variants rares à effet fort au sein du même organisme provoquerait l'apparition de la maladie (**Figure 4B**). Différentes possibilités provoquerait cette association : chaque parent transmettrait un ou plusieurs variants rares à effet fort, les variants seraient de mutations *de novo*, ou une combinaison des deux (transmission parentale et mutation *de novo*). C'est un type de transmission dit oligogénétique.
- Le modèle « associé» : CVCD + RVCD. Ce modèle rassemble les deux précédents en exposant que l'expression d'une maladie serait due à une combinaison de variants communs transmis et de quelques variants rares, transmis ou *de novo* (**Figure 4C et D**). C'est l'hypothèse qui est privilégiée dans le cas des TSA. (Berg and Geschwind, 2012)

D'autres paramètres entrent également en jeu et varie l'expression d'une maladie génétique. Tout d'abord la pénétrance, qui est le degré d'expression phénotypique d'une maladie par rapport à un génotype malade. Elle peut être variable entre les individus et influencée par des facteurs environnementaux. Ensuite l'expressivité variable, qui induit des phénotypes différents (différents symptômes, différentes caractéristiques) pour un même génotype, ainsi que l'empreinte parentale, où l'expression de la maladie dépend du parent qui transmet le variant impliqué dans le génotype de la maladie.

Les progrès en biologie moléculaire et génétique ont permis de mettre en évidence les anomalies du génome et les gènes impliqués dans les TSA et la DI, ainsi qu'à faire la part entre gènes hérités et mutations *de novo*. Dans le cas des TSA, la part de mutations *de novo* est estimée aujourd'hui à 30% (Ronemus *et al.*, 2014).

I - Stratégies d'identification des anomalies et des gènes impliqués dans les TSA et la DI

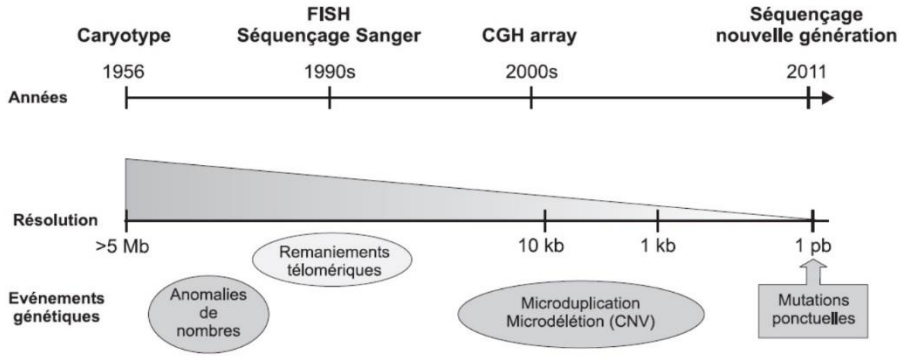


Figure 5 : Evolution chronologique des outils diagnostiques de détection du génome, de 1956 à 2011, associée à l'évolution décroissante de la taille des anomalies détectables par ces outils. D'après la revue de l'Inserm sur les Déficiences intellectuelles (2016).

L'objectif de ces dernières années a été de mettre en évidence les gènes impliqués dans les TSA et la DI, puis d'analyser leur impact. Dans un premier temps, les anomalies du génome ont pu être détectées grâce à l'élaboration de nouveaux outils, qui ont été améliorés au fil du temps afin de découvrir des anomalies de plus petite taille (**Figure 5**).

Les études de remaniements chromosomiques ont débuté avec l'étude des caryotypes. Il s'agit de la première technique de cytogénétique, mise au point par le Dr Marthe Gautier de l'équipe du Dr Turpin en 1959 (Lejeune, Turpin and Gautier, 1959).

L'étude de caryotypes a permis de mettre en évidence les anomalies de nombre de chromosomes ou aneuploïdie (trisomie, monosomie, triploïdie) mais également les anomalies de structures du chromosome (inversions, délétions, duplication, translocations) de plus de 5 Mb, simplement par comparaison au microscope de la longueur des bras de chromosomes et l'alternance des bandes sombres et claires. Au début des années 2000, les puces d'hybridation génomique comparative CGH (comparative genomic hybridization array) ont été élaborées avec le principe d'établir le rapport de la présence d'une séquence pathogène par rapport à une séquence de référence. Dans le cas des anomalies chromosomiques, cette technique met en évidence que les anomalies chromosomique déséquilibrées (duplications, délétions) appelés aussi CNV (Copy number variation) (du Manoir *et al.*, 1993). Les inversions et les translocations équilibrées ne sont pas détectées.

Les puces de génotypage à très haut débit, inventées également au début des années 2000, permettent quant à elles de détecter des variations de l'ordre du nucléotide, nommées SNP (Single Nucleotide polymorphism) (Ranade *et al.*, 2001) par rapport à des séquences de référence.

1 - Séquençage de l'ADN

Le séquençage avec la méthode Sanger (1976) est la première méthode de séquençage de petites sections de génome (pas plus de 200 à 300 nucléotides) (Sanger *et al.*, 1977) avec l'utilisation de l'ADN polymérase et de nucléotides inhibiteurs. Les méthodes se sont améliorées grâce à une automatisation de la technique et des génomes entiers de plus en plus grands ont pu être séquencés avec la méthode globale (Whole genome sequencing, WGS) ou Shotgun (Staden, 1979), qui consiste au séquençage aléatoire de sections du génome, puis à une reconstitution des fragments. Depuis 2005, le HTS (high-throughput sequencing) rassemble des méthodes permettant de séquencer l'entièreté d'un génome en une fois par « séquençage de synthèse », soit la détection du nucléotide incorporé par l'ADN polymérase (Van Vliet, 2010).

Par extension, le séquençage haut débit de l'exome a été développé en 2008. Il s'agit d'une technique séquençant uniquement l'ensemble des exons de l'ADN codant (ce qui sera traduit en protéines), afin de mettre en évidence les variations spécifiquement au sein des gènes (Criqui and Baulande, 2010).

2 - Etudes d'association

Les études d'association cherchent à mettre en évidence des polymorphismes nucléotidiques (SNP) ou les variations du nombre de copies (CNV) susceptibles d'être impliqués dans une maladie en calculant la prévalence de cet allèle chez les sujets atteints de cette maladie par rapport à sa prévalence chez de sujets sains. C'est un type d'étude prenant en compte l'hétérogénéité des variations alléliques au sein de la population. Elles utilisent donc des marqueurs de SNP ou CNV bi-alléliques pour détecter leur présence ou leur absence, ou multi-alléliques pour détecter le nombre de copies dans le cas de CNV. Si la fréquence allélique est supérieure chez les personnes malades que chez les témoins, l'allèle est considérée comme susceptible d'être un facteur de la maladie. Quand les études d'association sont fondées sur l'ensemble du génome dans une population, il s'agit d'une étude GWAS (Genome Wide Association Study), et les études réalisées sont référencées dans une base de données (http://www.ebi.ac.uk/gwas).

Les études GWAS permettent de mettre en évidence de nouveaux candidats possibles afin de donner de nouvelles pistes de recherche, il ne s'agit pas un d'un outil de détection à part entière. Dans le cas des TSA, les études GWAS ont montré des limites, soit en mettant en valeur un gène dont la pathogénicité n'a pas été prouvée par la suite (Torrico *et al.*, 2017), comme les gènes *SEMA5A* (Weiss *et al.*, 2009), *MACROD2* (Anney *et al.*, 2010), *TITH3*, *AS3MT*, *MIR137*, *NT5C2,* ou en ne retrouvant

pas de gènes suspectés d'avoir un impact, comme une étude qui concluait que les gènes *CNTNAP2, RELN, SHANK3* ne seraient pas associés aux TSA (Jonsson *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019). Les gènes toujours susceptibles d'être associés aux TSA mis en évidence par une étude GWAS sont entre autres *CHD9* et *CHD10* (Wang *et al.*, 2009), *RIT2* (Hamedani *et al.*, 2017) ou l'ARN antisens *MSNP1AS* (Kerin *et al.*, 2012; Prandini *et al.*, 2012) avec une significativité mitigée (Wang *et al.*, 2019). Une des dernières études (Yuen *et al.*, 2017) a mis en évidence 18 nouveaux gènes jamais référencés et publiés auparavant.

3 - Etudes de liaison

La liaison génétique est fondée sur le principe de la distance génétique entre deux marqueurs génétiques sur un chromosome. Cela permet d'établir les cartographies génétiques et de pouvoir situer un gène sur un locus. Les études de liaison sont privilégiés au sein de familles multiplex, c'est-à-dire d'une famille qui présente plusieurs membres atteints de la même maladie, et dont la maladie repose sur une transmission mendélienne (Ott, 2001). Le LOD score (z) est un indicateur statistique servant à estimer la probabilité de liaison entre le gène de la maladie de position inconnue et un marqueur génétique, comme des microsatellites, d'emplacement connu au sein de petits effectifs (comme une famille). Il calcule le rapport de vraisemblance que les marqueurs soient liés sur celui qu'ils ne le soient pas. Plus le LOD score est élevé, plus la probabilité de liaison est grande. On peut ainsi estimer la position du gène sur les loci (Rice *et al.*, 2001). Etant donnée l'étiologie complexe des TSA et de la DI, les études de liaison paramétriques n'ont pu s'appliquer qu'à un petit nombre de maladies, comme des DI syndromiques ou des syndromes associant DI et TSA, présents chez plusieurs membres d'une même famille.

Néanmoins, il existe des analyses de liaison non paramétriques ont été menées chez des patients atteints de TSA et de DI, réalisées avec une hypothèse de maladie complexe et multifactorielle, au sein de plusieurs familles, afin de mettre en évidence des régions du génome susceptibles d'être associé aux TSA, qui ont identifié beaucoup de loci, mais avec peu de redondance. Cependant, ces études, menées sur les autosomes, dont certaines par l'International Molecular Genetic Study of Autism Consortium dans des cas de TSA idiopathiques, se concordent sur une vulnérabilité possible sur le locus 7q31-33 (International Molecular Genetic Study of Autism Consortium, 1998; Schellenberg *et al.*, 2006), mais également sur le chromosome 13 (CLSA, 2001), ou encore la région 21q dans des cas d'autisme avec régression des aptitudes socio-communicatives (Molloy *et al.*, 2005). Pour la DI, les études de liaisons génétiques ont été menées souvent au niveau du chromosome X dans des cas où les garçons d'une famille étaient principalement touchés. Il s'agit fréquemment de DI non syndromiques, nommées MRX (Lubs *et al.*, 1996), qui ont été cartographiés au sein du chromosome X.

La plupart des gènes liées à la DI et aux TSA a au final été mise en évidence par association de toutes ces techniques, comme pour la mise en évidence d'un syndrome de DI lié à l'X dans le gène *RLIM*, qui a rassemblé études de séquençage de l'exome et calcul du LOD score dans une famille (Tønne *et al.*, 2015).

II - Anomalies chromosomiques retrouvées dans la DI et les TSA

L'ensemble des anomalies chromosomiques impliquent 16% des DI sévères et 5% des DI légères (Raymond and Tarpey, 2006; Ellison *et al.*, 2013)

1 - Anomalie de nombres de chromosomes

Les anomalies de nombre de chromosomes (aneuploïdie) sont retrouvées dans des syndromes associés à la DI. Le syndrome le plus fréquent est la trisomie 21 ou syndrome de Down, qui affecte 23 naissance sur 10 000 en France (Rousseau *et al.*, 2010). Elle représente 7 à 11% des DI et les sujets atteints présentent un QI variant entre 20 et 70 (Committee on Genetics, 2001).

Il existe aussi d'autres trisomies associées à des syndromes avec DI, comme la trisomie 13 (syndrome de Patau), 18 (syndrome d'Edwards), plus rares et beaucoup plus sévères sur le plan des malformations. Si ces anomalies sont retrouvées sous la forme d'un mosaïcisme, c'est-à-dire deux populations de cellules n'ayant pas le même génotype au sein d'un même organisme, sa présence partielle peut donner un phénotype pathologique variable chez un individu. La trisomie 8 en mosaïque (et n'existant que sous cette forme), ou syndrome de Warkarny, présente aussi une DI variable parmi ses symptômes.

Les TSA peuvent faire partie de ces syndromes à fréquence variable. Pour la trisomie 21, il est estimé que 18,2% à 19% des sujets atteints ont également des traits autistiques (DiGuiseppi *et al.*, 2010; Moss *et al.*, 2012). Il n'existe pas d'aneuploïdie associé exclusivement à des TSA.

2 - Anomalies de structure

Les anomalies de structure (Structural variations, SV) sont des variations présentes sur une partie plus ou moins grande d'un chromosome. Elles sont le résultat d'une cassure du chromosome suivie d'une reconstruction dans une combinaison anormale, souvent à la suite d'un enjambement

inégal. Elles peuvent être équilibrées et conserver l'entièreté du génome ou conduire à une perte de matériel génétique.

Les anomalies n'impliquant qu'un seul chromosome sont les délétions (perte d'une section chromosomique), les inversions (la section chromosomique détachée a été réintégrée dans le sens inverse) et les duplications (répétition d'une section chromosomique) (**Figure 6**). Les translocations et les insertions impliquent deux chromosomes. La translocation réciproque est l'échange d'un segment d'ADN entre deux chromosomes, la translocation robertsonienne, (qui a une incidence de 1/1000 dans la population (Therman *et al.*, 1989)) est la perte des bras courts des chromosomes acrocentriques (comportant un centromère très distal donc des bras courts très réduits, comme les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22) et la fusion des bras longs entre eux.

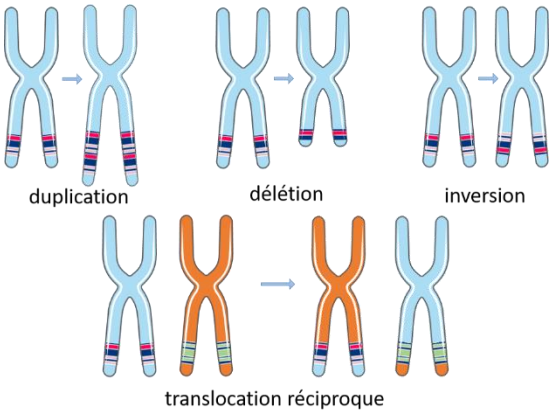


Figure 6 : Schéma des principales anomalies chromosomiques structurales. Les duplications, les délétions et les inversions impliquent un seul chromosome, les translocations impliquent deux chromosomes. Les translocations et les inversions sont équilibrées car elles conservent l'entièreté du génome, alors que les duplications et les délétions sont dites déséquilibrées.

Les Copy Number Variations (CNV) sont une forme de polymorphisme chromosomique au sein de la population. Il s'agit de variations structurales déséquilibrées de type duplication et délétion concernant des sections d'ADN. Les CNV recouvrent 4,8 à 9,7% du génome humain, particulièrement dans les régions péricentromériques et subtélomériques (Zarrei *et al.*, 2015). Les CNV retrouvés chez plus de 1% de la population sont nommés CNP (Copy Number Polymorphisms).

Les anomalies de structure ont d'abord été mises en évidence grâce aux études de remaniements chromosomiques. Elles sont, avec les anomalies numériques, retrouvées dans 3 à 15% des DI syndromiques, et il s'agit souvent de réarrangements déséquilibrés (Schluth-Bolard *et al.*, 2009). Des CNV et des microdélétions plus petites (inférieures à 5 Mb) induisant une DI ou des TSA ont été ensuite mises en évidence grâce aux puces CGH, au sein de loci chromosomiques spécifiques.

Dans la DI, les loci affectés par les SV sont le locus 22q11.2, donnant le syndrome de Di George, ou 7q11.23 (syndrome de Williams Beurren). Une délétion au niveau du locus 15q11-q13 aura des conséquences différentes en fonction de la provenance du chromosome impacté. S'il vient de la mère,

l'enfant sera atteint du syndrome d'Angelman, s'il vient du père, il aura le syndrome de Prader-Willy, deux syndromes cliniquement différents mais présentant tous les deux une DI. Cette région est donc soumise à l'empreinte parentale. Un disomie parentale du chromosome 15 (les deux chromosomes de la paire de l'enfant viennent du même parent) peut aussi donner l'une des maladies, et plus précisément, l'atteinte du gène *UBE3A* maternelle est suffisante pour donner le syndrome d'Angelman.

Parmi les anomalies situées sur le chromosome X, la région Xq28 englobant le gène *MECP2*, responsable du syndrome de Rett, a été mise en évidence, la région Xq22.2, dont la délétion ou duplication perturbe le gène *PLP1* et donne le syndrome de Pelizaeus-Merzbacher.

Pour les TSA, les études d'association et les anomalies chromosomiques mettent en évidence principalement l'implication des régions situées en 7q, 2q et 16p (Folstein and Rosen-Sheidley, 2001). D'autres régions ont été suspectées, mais ces résultats ont été peu confirmés à travers d'autres études.

3 - Variants génétiques simples et gènes impliqués

Les variants nucléotidiques simples (Single Nucleotide Variant, SNV) sont des mutations ponctuelles ne concernant qu'un nucléotide à plusieurs nucléotides, inférieurs à 1kb. Quand ils sont retrouvés chez plus de 1% de la population, ils sont appelés Single Nucleotide Polymorphism (SNP). Il existe plusieurs types de modifications :

- Les substitutions, où un nucléotide est remplacé par un autre, sans perte de matériel génétique.
- Les délétions, soit la suppression d'un ou plusieurs nucléotides.
- Les insertions, où un ou plusieurs nucléotides sont intégrés dans la séquence.
- Les indels, où il n'a pu être déterminé si la différence de longueur par rapport à la séquence de référence est due à une insertion et/ou une délétion.

Depuis la fin des années 1990, les SNP bi-alléliques ont été référencés dans des bases de données (dbSNP) du NCBI et 8 945 252 SNP de tous types sont aujourd'hui mis en évidence, dont 71,8% sont des délétions, 26,2% des insertions dont des duplications et 0,75% des indels (Holmes *et al.*, 2020). Les SNP associées aux TSA répertoriées à ce jour se trouvent dans des bases de données, comme la collection de l'Autism Genetics Research Exchange (AGRE, www.agre.org), qui répertorie plus de 550 000 SNP (Georgi *et al.*, 2014), ou du National Institute of Mental Health (NIMH, www.nimh.nih.gov). L'ensemble de ces variations a ainsi permis de mettre en évidence différents gènes

ou régions non codantes susceptibles d'être impliqués dans la DI et les TSA afin d'être investigués pour connaître leurs fonctions au sein de l'organisme.

III - Impact des variants génétiques sur les protéines

1 - Impacts des anomalies chromosomiques et des SNV au sein des régions codantes

Les anomalies chromosomiques de nombre et de structure, telles les trisomies, les CNV et duplications segmentaires induisent la perte de fonction ou la surexpression de plusieurs gènes, c'est pourquoi ils entrainent fréquemment l'apparition de maladies syndromiques importantes. La présence de SNV au sein du génome entraine plus ou moins de modifications au sein des protéines. Les variations en amont, notamment dans la région promotrice, peuvent perturber sa lecture par le complexe d'initiation de la transcription, induisant la plupart du temps une diminution, voire une disparition totale de la transcription. Quelques fois, les modifications des régions en amont peuvent au contraire augmenter anormalement la transcription, notamment si elles se situent sur une zone d'interaction entre une séquence « enhancer » et une protéine inhibitrice (Hanna *et al.*, 2005).

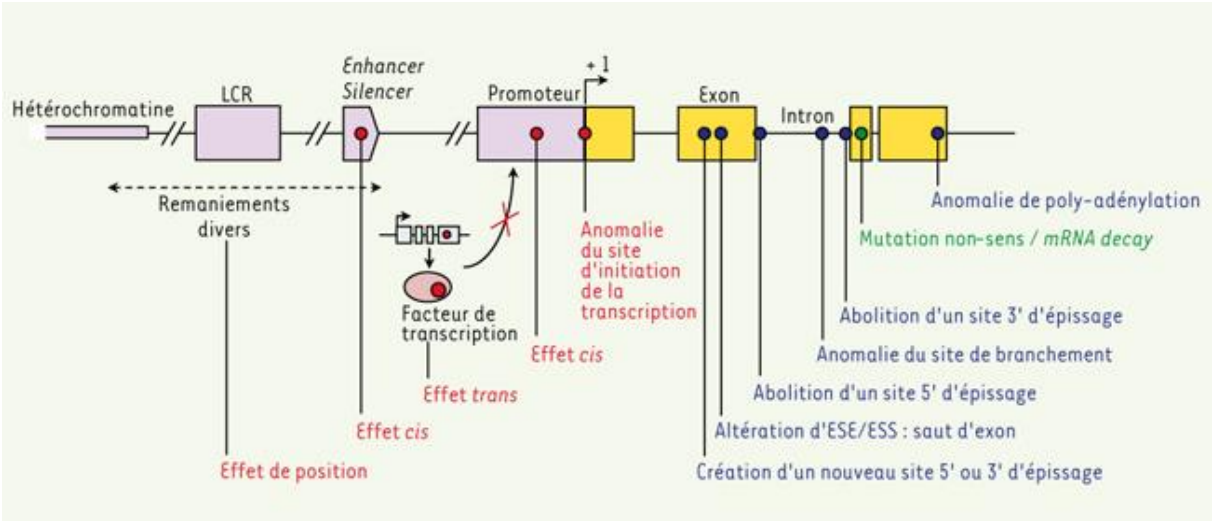


Figure 7 : Positions des différents types de mutations pouvant affecter l'expression d'un gène. Les rectangles jaunes représentent les exons, les lignes entre les exons représentent les introns. En mauve, il s'agit des séquences impliquées dans la régulation de l'expression du gène. Les points rouges situent les positions où les mutations peuvent impacter l'expression du

gène, en bleu, sa maturation, et en vert, sa stabilité. LCR: locus control region; ESE: exonic splicing enhancers; ESS: exonic splicing silencers. (Hanna et al. 2005)

Les SNV dans la partie codante du génome peuvent engendrer plusieurs types de mutations avec un impact extrêmement variable sur la conformation et la fonction de la protéine codée par le gène. Elles peuvent aussi affecter le signal d'adressage, ses domaines fonctionnels et ses interactions avec d'autres protéines, empêcher l'acquisition d'une modification post-traductionnelle ou au contraire induire un site propice à une modification imprévue (**Figure 7**).

Au niveau des introns, les SNV ont normalement peu d'impact sauf si elles se situent sur les sites donneurs et accepteurs d'épissage, des points de branchement en 5', ou sur les séquences signal régulatrices (exon/intron splicing enhancer/silencer), empêchant ainsi une maturation correcte. Une modification importante de la longueur de l'intron peut aussi perturber l'épissage (Hanna *et al.*, 2005).

Dans la littérature les SNV au sein de protéines ont permis de mettre en évidence l'impact fort de la perturbation de certains gènes dans l'étiologie des TSA et de la DI. Il s'agit majoritairement de mutations *de novo*, mis en évidence par le séquençage du génome de patients. Parmi ces gènes, *SYNGAP1*, associé à une DI non syndromique, retrouvé avec une prévalence de 3% dans une cohorte 94 patients (Hamdan *et al.*, 2009), *PTCHD1* (DI et TSA) (Noor *et al.*, 2010), *NLGN3*, *NLGN4X* (Jamain *et al.*, 2003), *SHANK3* (Durand *et al.*, 2007), *RAC1* (Tian *et al.*, 2018) et *CADM1* (Zhiling *et al.*, 2008) (associés aux TSA).

On retrouve des mutations ponctuelles dans certaines protéines qui perturbent sa fonction sans l'invalider complètement, notamment pour des gènes où la perte de fonction totale ne rendrait pas l'organisme viable.

2 - Impact des perturbations génétiques au sein du génome non codant

Les variations au sein de sections d'ADN non codantes ont également une influence dans la physiopathologie génétique. Les transcrits antisens naturels (NATs) sont une catégorie de longs ARN (plus de 200 nucléotides) non codants (lncARN), transcrits à partir du brin ADN complémentaire d'une séquence d'ADN codant pour un gène. Ils participent à la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle positive ou négative de l'ARN sens correspondant, notamment en raison de sa complémentarité avec l'ARN sens (Faghihi and Wahlestedt, 2009). Outre les impacts répertoriés au sein des gènes impliqués dans l'étiologie de la DI et des TSA, les perturbations de leur ARN non codant antisens peuvent tout aussi avoir une importance dans l'étiologie de la maladie. Deux études GWAS ont en effet mis en évidence la présence significative de SNP au sein de l'ARN antisens de *MSNP1* (moesin

pseudogene 1), *MSNP1-AS* (Kerin *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2019), et une autre étude estime que 71 lncARN pourraient contribuer à la physiopathologie des TSA (Velmeshev *et al.*, 2013). Ces NATs auraient une expression spécifiquement cérébrale, mais avec une expression différente en fonction des régions.

Il semble que le ratio entre le niveau de transcription d'un gène et celui de son antisens joue un rôle dans l'expression de la maladie, ce qui a notamment été démontré pour le gène *IFNG* et son antisens *IFNG-AS1*, le gène étant surexprimé par rapport à son ARN antisens dans une cohorte d'enfants atteints de TSA (Fallah *et al.*, 2020), ce qui a été également observé pour *SYNGAP1-AS*, sur ou sous-exprimé dans le tissu cérébral de patients atteints de TSA en fonction des régions par rapport à des individus contrôles (Velmeshev *et al.*, 2013), ou l'expression de *SHANK2-AS*, négativement corrélé avec celle de *SHANK2* (Luo *et al.*, 2019). Ces observations sont cohérentes avec la fonction régulatrice des NATs sur leur gène. Par ce système de régulation, des pistes thérapeutiques sont envisagées envers les lncARN, comme pour *FMR4*, *FMR5*, and *FMR6*, antisens à *FMR1* et impliqués dans des syndromes associés à l'X-fragile (Huang *et al.*, 2019).

3 - Prédiction de pathogénicité

Les variations observées sur les gènes impliqués dans la DI et le TSA peuvent être l'objet d'une prédiction de pathogénicité *in silico*, qui mesure le degré d'incidence d'une mutation sur la protéine associée. Les prédictions du caractère pathogène de mutations faux-sens sont fondées sur la comparaison des acides aminées entre la séquence de référence du gène et celle contenant la variation. Ces outils présentent leur résultat sous un score de pathogénicité brut ou normalisé de 0 (probablement bénin) à 1 (probablement pathogène).

Parmi les outils libres d'accès, SIFT (Kumar *et al.*, 2009) (https://sift.bii.a-star.edu.sg/) fonde ses comparaisons sur les propriétés physico-chimiques des acides aminés et l'homologie de séquence entre espèces, tout comme Polyphen-2 (Adzhubei *et al.*, 2010) (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) qui ajoute les informations structurales (les domaines transmembranaires par exemple) dans ses prédictions. CADD (Kircher *et al.*, 2014) (https://cadd.gs.washington.edu/) prédit la pathogénicité des mutations faux-sens mais aussi des insertions et délétions. Les scores de prédiction sont bruts, mais s'ils sont au-dessus de 30, la mutation est probablement délétère. Plus récemment, UMD-Predictor (Salgado *et al.*, 2016) (http://umd-predictor.eu/) est un outil développé par l'INSERM qui prend en compte les mêmes paramètres précédemment décrits sur les acides aminés, mais décrits également l'impact des mutations sur l'ARNm, donnant ainsi de meilleures prédictions.

L'incidence pathogène de mutations au sein des introns pouvant altérer les signaux d'épissage peut être simulé dans le Human Splicing Finder (Desmet *et al.*, 2009) (https://www.genomnis.com/the-

system-1) qui intègre l'ensemble des algorithmes et matrices de prédiction et permet ainsi de disposer d'un large éventail de prédictions, exomiques ou introniques. Les scores de prédiction de 37 outils de prédictions dont SIFT et Polyphen-2 sont rassemblés dans la base de données dbNSFP (Liu *et al.*, 2016).

Si la protéine ou l'un de ses orthologues a été cristallographiée et qu'une modélisation de sa conformation 3D existe, la prédiction pourra estimer plus précisément l'impact des variations sur la structure en observant les repliements et les éventuelles interactions intra-protéiques entre acides aminées, avec son substrat et avec son environnement. L'ensemble des protéines dont la structure 3D a été modélisée se trouvent sur le site de RCBS Protein Data Bank (Berman *et al.*, 2000) (rcsb.org). Les outils bio-informatiques automatiques peuvent estimer la stabilité de la protéine, comme Cupsat (Parthiban *et al.*, 2006), qui en plus d'analyser les propriétés physico-chimiques des acides aminés, prend en compte leur accessibilité aux solvants et leur fonction au sein de structures secondaires, ou FoldX (Delgado *et al.*, 2019) (http://foldxsuite.crg.eu/), qui se fonde sur les propriétés atomiques et d'énergie de la séquence protéique. Aggrescan (Conchillo-Solé *et al.*, 2007) (http://bioinf.uab.es/aggrescan/) peut estimer la création de liens chimiques anormaux et dénaturants pouvant entrainer une agrégation de la protéine.

Ce système donne donc une estimation de l'impact d'une mutation sur la protéine. Pour caractériser l'incidence d'une protéine sur l'organisme au sein d'une voie cellulaire, des études fonctionnelles sont mises en place.

IV - Etudes fonctionnelles des gènes susceptibles d'être impliqués dans les TND

1 - Modèles physiopathologiques utilisées dans la DI et les TSA

La création de modèles génétiques permet de mettre en évidence l'impact phénotypique, morphologique et fonctionnel d'un gène au sein d'un organisme et de l'intégrer au sein d'une voie biologique.

A - Modèles cellulaires

Les modèles cellulaires sont une première approche, *in vitro*, efficace pour aborder un modèle physiopathologique génétique, notamment grâce à sa facilité de manipulation et d'entretien. Des lignées immortalisées aux cultures primaires issues de prélèvements animaux, puis plus récemment des cellules

de patients induites en cellules souches (induced pluripotent stem cells, iPSc) ont permis de mettre en évidence des éléments physiopathologiques liés au perturbations génétiques.

Les lignées immortalisées sont des modèles assez éloignés des conditions physiologiques, entre autres à cause de la modification de mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération. Mais c'est un modèle qui permet de mettre en évidence de nombreux paramètres, comme le taux d'expression génique et protéique d'un gène, la localisation ou le défaut de présence subcellulaire de la protéine, et son interaction avec d'autres partenaires protéiques. Ces modèles ont pu mettre en évidence des mécanismes impliqués dans la plasticité synaptique impliquant des gènes associés au risque de TSA, comme l'interaction *in vivo* de SynGAP avec MUPP1 dans des HEK 293T et régulant la voie des MAP kinase p38 (Krapivinsky *et al.*, 2004), ou que la phosphorylation de la Stargazine déstabilise sa liaison avec PSD-95 au sein de lignées COS-7 (Chetkovich *et al.*, 2002). Une équipe a mis au point une lignée de fibroblastes murins *FMRP* WT ou muté démontrant l'action de la protéine sur le cytosquelette d'actine via la voie RAC1 (Castets *et al.*, 2005).

Les cultures primaires de neurones mettent en lumière les propriétés d'une protéine et les impacts morphologiques cellulaires dans différentes conditions, tels que la longueur des neurites, le niveau d'arborisation des dendrites et bien la taille et la forme de dendrites. Les courants post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs miniatures (mCPSE ou mCPSI) peuvent être mesurés également par patch-clamp, donnant ainsi une estimation de l'impact des perturbations génétiques sur la transmission synaptique. Dans les cultures de neurones à partir de souris nouveau-nées, le knock-down de *Cntnap2* par shARN a mis en évidence une diminution du développement de l'arborisation dendritique et des épines dendritiques dans les neurones pyramidaux, ainsi qu'une baisse de la transmission synaptique (Anderson *et al.*, 2012). A l'inverse, la culture de neurones issues de souris KO du gène *SynGAP* montre une synaptogenèse accélérée, des épines dendritiques plus larges et une augmentation de l'activité synaptique par rapports à neurones de souris WT (Vazquez *et al.*, 2004).

D'autres modèles ont été générés à partir des cellules souches induites (iPS) de cellules de patients, afin d'être à nouveaux différenciés en progéniteurs neuraux, neurones et autres types cellulaires, avec la méthode de Takahashi et Yamanaka (2006). Des lignées iPS *CHD8*$^{+/-}$ont été créées à partir de cellules de patients présentant une délétions en 22q11.2 atteints de TSA, SCZ ou troubles bipolaires (BP) pour modéliser des organoïdes cérébraux en 3D présentant une structure semblable au télencéphale embryonnaire et ont permis de montrer des perturbations de la voie WNT/β caténine (Wang *et al.*, 2017).

B - Modèles murins et autres animaux

Trois critères répertoriés dans la revue de Silverman et ses collègues (Silverman *et al.*, 2010), permettent d'évaluer la pertinence d'un modèle animal : la validité de la construction, où le modèle doit présenter une perturbation génétique ou anatomique identique ou similaire à celle de la pathologie humaine, puis la validité apparente du modèle (isomorphie des symptômes), où les traits phénotypiques et endophénotypiques doivent ressembler à ceux de la pathologie humaine, et enfin la validité prédictive : la réponse aux traitements efficaces contre les traits phénotypique de la pathologie humaine doivent être tout aussi efficaces contre ceux du modèle animal.

De nombreux modèles génétiques de souris ont été élaborés à partir du Knock-Out (KO) de gènes impliqués dans la DI, les TSA et d'autres troubles neuropsychiatriques, et ont effectivement mis en évidence des endophénotypes associés à ces maladies. Parmi les modèles les plus courants, on retrouve *Fmr1-KO*, (homologue murin de *FMR1* associé au syndrome de l'X fragile), *Oxt-KO*, *Avpr1b-KO* ou encore des modèles associés à la duplication 15q11-13 humaine (par duplication d'un segment de 6,3 Mb sur le chromosome 7 de la souris, homologue à la région humaine (Nakatani *et al.*, 2009)). Il existe également un modèle de souris ayant été exposées au valproate durant la période prénatale, la molécule antiépileptique incriminée pour induire des troubles autistiques chez les enfants exposés durant le stade fœtale, qui montre effectivement des comportements pseudo-autistiques, comme une diminution du contact social et une augmentation des comportements stéréotypés (Bossu and Roux, 2019).

La souris est l'espèce la plus utilisée dans l'élaboration de modèles associés au TSA et à la DI, en raison d'un comportement social plus complexe que celui de modèles comme la drosophile ou le poisson-zèbre, tout en gardant une manipulation du génome facile, et un grand nombre de gènes homologues par leur séquence et leur fonction à ceux de l'humain (Berg and Geschwind, 2012). Toutefois, les deux modèles cités précédemment ont été utilisés pour l'observation d'anomalies neuronales *in vivo* associés à des TND.

Chez la drosophile, le Knock-out de *Nrx-1*, gène homologue *NRXN1*, codant pour la neurexine-1 chez l'humain, induit chez la drosophile une diminution du nombre d'épines synaptiques. Celles-ci présentent une forme anormalement longue, des détachements entre les éléments pré et post-synaptiques et une transmission synaptique altérée (Li *et al.*, 2007). Le niveau d'expression protéique de Nrx1 influe sur le nombre de boutons synaptiques et la densité des zones actives, tout comme *Nrx-IV*, qui est l'homologue de *CNTNAP2*, gène retrouvé muté chez des patients atteints de divers troubles neurodéveloppementaux (Zweier *et al.*, 2009). Le gène *KCTD13* chez le poisson-zèbre induit une différence de taille de cerveau inversement proportionnelle au niveau d'expression de la protéine, le mettant en évidence comme le seul gène induisant une perturbation parmi les 29 impliqués dans les troubles cognitifs associés aux CNV du locus 16p11.2 chez l'humain (Golzio *et al.*, 2012) (qui est

associé à des TSA, DI, épilepsie et une légère macrocéphalie si la région est supprimée, TSA, DI et SCZ si elle est dupliquée (McCarthy *et al.*, 2009; Weiss *et al.*, 2009).

Tout comme la drosophile et le poisson-zèbre, les anomalies cérébrales et cellulaires de l'encéphale chez la souris ont été étudiées, mettant en évidence des anomalies anatomiques tels des défauts de migration neuronale (*Cntnap2*$^{-/-}$ (Xing *et al.*, 2019)), de connectivité inter-neuronale (*En2*$^{-/-}$ (Chelini *et al.*, 2019), *Ctnnb1*$^{Bfc/+}$ (Tucci *et al.*, 2014)), des macrocéphalies et microcéphalies (*Dyrk1a*$^{+/-}$) ou une hypoplasie cérébelleuse (*Gabrb3*$^{-/-}$, *Nono*^{gt}, *Foxp2*$^{-/-}$, *Ophn1*$^{-/y}$, *En2*$^{-/-}$) (Mircsof *et al.*, 2015). Au niveau physiologique, de très nombreux modèles présentent des perturbations de la transmission synaptique glutamatergique (*Cntnap2*$^{-/-}$, *Tsc1*$^{+/-}$, *Tsc2*$^{+/-}$, *conditionnal Mecp2* (*c-Mecp2)*, *Nf1*$^{+/-}$, *Syngap1*$^{+/-}$, *Shank3A*$^{-/-}$, *Ptchd1*$^{-/y}$) (Ung *et al.*, 2018), d'autres des synapses GABAergiques (comme *NlgnX-/Y*, *Nono*^{gt}), du cytosquelette d'actine (*LIMK-1* KO (Meng *et al.*, 2002)), de la drendritogenèse (*Chd8*$^{+/-}$, *Cntnap2*$^{-/-}$) (Anderson *et al.*, 2012) et la synaptogenèse (*Il1rapl1* KO, *Ophn1–/y*), de la potentialisation à long terme (LTP) ou de la dépression à long terme (LTD) (*Nlng3*$^{-/-}$, *Np1* KO, *3X Ube3A*, *LIMK-1* KO).

Au niveau des comportements, les modèles de souris associés à la DI présentent principalement des atteintes cognitives, comme des troubles de l'apprentissage (*Arx*$^{432\text{-}455dup/y}$, *LIMK-1* KO), de la mémoire (*Ophn1–/y*, *Nono*^{gt}, *Atp6ap2*$^{/0}$). Chez les modèles associés au TSA et à la DI sont également observés des troubles des fonctions motrices (*Foxp2*$^{-/-}$), des augmentations (*Ehmt1*$^{+/-}$) ou de diminutions (*Ophn1*$^{-/y}$, *Gabrb3*$^{-/-}$) de l'activité motrice.

Les comportements observés chez la souris associés à des comportements pseudo-autistiques sont : les perturbations du contact social, observées avec des tests de sociabilité, montrant une diminution du contact avec un nouveau congénère (*En2*$^{-/-}$, *3X Ube3A*, *c-Mecp2* (Silverman *et al.*, 2010), *Cntnap2*$^{-/-}$, *Nlgn3*$^{-/-}$, *Nlgn4X*$^{-/-}$), les comportements répétitifs et stéréotypiques, représentés par des comportements classiques du comportement de la souris mais dont la fréquence et la durée sont anormalement élevées : toilettage, grooming (lavage du museau anormalement récurrent) (*Shank3B*$^{-/-}$ (Peça *et al.*, 2011)), enfouissements (grattage de la sciure de la litière) ou des ébrouements. D'autres comportements fréquemment observés sont l'augmentation de l'anxiété (*Ehmt1*$^{+/-}$, *Nono*^{gt}, *Ctnnb1*$^{Bfc/+}$, le KO conditionnel *Ctnnb1* des neurones parvalbumines (PV cKO *Ctnnb1*) et *Cadm1*$^{-/-}$ (Takayanagi *et al.*, 2010)) (Dong *et al.*, 2016) ou l'hyperactivité (*Ptchd1*$^{-/y}$), ou encore des défauts de vocalisation (*Ctnnb1*$^{Bfc/+}$, *Cadm1*$^{-/-}$ (Fujita *et al.*, 2012)) qui seraient possiblement associés aux troubles de la communication verbale retrouvés dans les symptômes de TSA, sans qu'il n'existe une preuve réelle du lien entre ce comportement typiquement murin et les troubles humains.

Ces modèles mettent donc bien en évidence l'impact des gènes retrouvés chez l'humain dans les TND, et dont la plupart sont impliqués dans les voies de synaptogenèse et du fonctionnement des synapses glutamatergiques et GABAergiques.

2 - Les voies fonctionnelles des TSA et de la DI convergent essentiellement vers les anomalies de la synapse

Les modèles cellulaires et animaux permettent d'observer expérimentalement les endophénotypes associés à une mutation, permettant ainsi de savoir les fonctions générales dans lequel le gène est impliqué et pouvant orienter sur sa place au sein d'une voie fonctionnelle. Les modèles souris *Tsc1*$^{+/-}$, *Tsc2*$^{+/-}$, *Pten*$^{-/-}$ ont mis en évidence l'implication de ces gènes dans la voie mTOR (confirmé par le sauvetage pharmacologique des perturbations par la rapamycine) (Silverman *et al.*, 2010), *OPHN* (*Ophn1*$^{-/y}$) dans la voie PKA, *CHD8*$^{+/-}$ (Wang *et al.*, 2017) et CTNNB1 (*Ctnnb1*$^{Bfc/+}$, PV cKO *Ctnnb1*) dans la voie WNT, et *ARX* dans la voie Sonic Hedgehog (Shh) (Cho *et al.*, 2014). Les recherches d'interactome *in vitro* et *in vivo* ont pu mettre en évidence une connectivité importante entre SHANK3 et TSC1, les plaçant dans des voies de signalisation similaires, par le biais de nombreuses protéines comme ACTN1, SHANK1 et HOMER (Sakai *et al.*, 2011).

Des méthodes informatiques ont tenté une approche différente en cherchant à inclure les gènes impliqués dans les TSA à partir des bases de données de gènes SFARI dans des voies de signalisation en se fondant sur la littérature, les interactions protéines-protéines, les homologies de séquence, afin de créer des réseaux d'interaction fonctionnelle. Afin de ne pas se perdre dans le grand nombre de gènes répertoriés, des critères de sélection ont été établis afin de ne sélectionner que les gènes les plus susceptibles d'avoir un impact dans l'étiologie de ces troubles. Une étude a réalisé une analyse sur les gènes présentant des CNV et SNV rares et *de novo* chez des individus atteints de TSA en recherchant la probabilité de partager le mêmes phénotypes génétiques (mêmes partenaires d'interaction, même modèle de coévolution, mêmes processus biologiques, mêmes fonctions moléculaires) à partir de bases de données (Gilman *et al.*, 2011), une autre étude a créé un système de prédiction de risques au sein du génome afin de classer les gènes en fonction du niveau de preuves qu'ils soient associés aux TSA et a identifié leur appartenance à des voies biologiques spécifiques au cerveau (65 gènes) (Krishnan *et al.*, 2016), et l'étude la plus récente, utilisant la même méthode que la précédente avec des gènes qui possèdent une perte de fonction identifiée *de novo* ou transmise (275 gènes) (Duda *et al.*, 2018).

Toutes ces études ont mis en évidence des voies de signalisation importantes du fonctionnement cérébrale ainsi que d'étapes du développement. Les voies de signalisation soulignées au sein de ces études de réseaux d'interaction fonctionnelle sont des voies essentielles au développement de l'organisme telles que la voie des MAP Kinases, des IGF/PI3K, la voie canonique de Wnt (Duda et al. 2018), de Sonic Hedgehog et des Rho GTPases (Krishnan *et al.*, 2016). D'autres processus biologiques

fondamentaux interviennent également, comme la régulation du cycle cellulaire, le métabolisme des acides aminés, le métabolisme du glucose, la dynamique et la réorganisation du réseau du cytosquelette d'actine, le remodelage de la chromatine (par la modification des histones) et la régulation transcriptionnelle. Quelques gènes sont inclus dans les voies du rythme circadien et dans les perceptions sensorielles, qui sont en effet retrouvé perturbées chez de nombreux patients atteints de TSA, ou encore dans la transmission et réponse aux voies hormonales.

Une autre catégorie de gènes est impliquée dans le développement embryonnaire, de l'engagement des cellules souches vers la voie de spécification neuronale et du développement du système nerveux, et enfin, un grand nombre de gènes fait partie des voies de neuritogenèse, dont la motilité neuronale et le guidage de l'axone, et de la synaptogenèse, ce qui avait été déjà mis en évidence en 2011 dans l'étude de Gilman *et al.* (2011), ainsi que la transmission neuronale et à la plasticité synaptique, par une majorité de gènes spécifiques aux synapses, codants pour des récepteurs, canaux ioniques, protéines associées au cytosquelette, des protéines du transport vésiculaire, des molécules d'adhésion cellulaire, des protéines d'échafaudage et autres molécules de signalisation intracellulaire.

Ces données mises en parallèle avec l'expression spatio-temporelle des gènes à partir de bases de données mettent en évidence qu'une majorité des voies sont exprimées durant la période prénatale, durant le développement neural précoce, au niveau du cortex préfrontal, temporal et cérébelleux (Krishnan *et al.*, 2016).

Ainsi une grande partie des gènes mis en évidence comme facteurs de risque dans la DI et les TSA sont des gènes codant des protéines ayant un rôle synaptique. Les perturbations modélisées au sein de modèles cellulaires ou animaux montrent effectivement des impacts de morphologies des neurones, en particulier des dendrites et des épines dendritiques. Le rôle de ces protéines au sein des synapses est principalement impliqué dans la plasticité synaptique, la morphogenèse et la structure des synapses et les voies de signalisation pré et post-synaptiques.

Chapitre 3 : La synapse, structure clef de la communication neuronale

I - Définition des synapses

La synapse est une jonction de contact et de communication entre deux neurones ou entre un neurone et un autre type cellulaire. Elle a pour rôle la transmission de l'information électrique du neurone vers la cellule réceptrice du message.

1 - La synapse électrique

Il s'agit d'un type de synapse rare dans le système nerveux de vertébrés, représentant approximativement 1% des neurones. La transmission de l'influx nerveux se réalise via des canaux intracellulaires appariés entre deux cellules appelés jonctions communicantes. Le signal est bidirectionnel et sans temps de latence, ni de période réfractaire. Cette catégorie de synapses est impliquée dans la synchronisation de l'activité neuronale et l'induction de rythmes au niveau du cortex, du striatum, de l'olive inférieure et de la rétine des mammifères, en association avec des neurones GABAergiques (Pfeuty, 2004).

2 - La synapse chimique

Les synapses chimiques composent la grande majorité du système nerveux central (SNC) des mammifères. Elles permettent un transfert d'un signal nerveux unidirectionnel d'un neurone à l'autre. La synapse se compose d'un compartiment présynaptique, appartenant au neurone qui envoie l'influx électrique, et d'un compartiment post-synaptique d'un autre neurone, réceptionnant le message, de part et d'autre un interstice de 10 à 40 nm appelé fente synaptique (**Figure 8**).

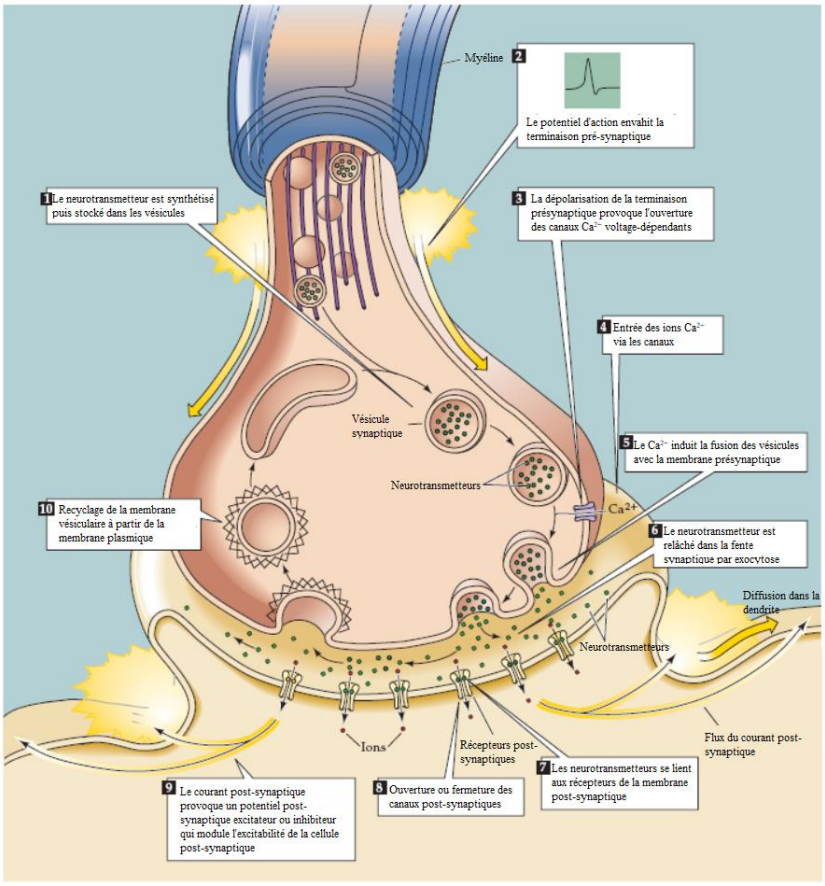


Figure 8 : Description des évènements impliqués dans la transmission d'une synapse chimique. (D'après Purves et al., 2004)

Le transfert du message nerveux se déroule de plusieurs étapes. La membrane des neurones est polarisée, et ce potentiel est généralement de -65 mV, régulé par des canaux ioniques voltage-dépendant. Lorsqu'une dépolarisation suffisamment importante se réalise au point d'atteindre le seuil d'ouverture des canaux sodiques, cela induit un pic de dépolarisation bref mais très important, le potentiel d'action (PA). Il se propage le long de l'axone jusqu'au niveau de terminaisons présynaptiques où se situent des canaux calciques voltage-dépendants et un stock de vésicules chargés en neurotransmetteurs. La dépolarisation de ces canaux entraîne un pic de concentration en ions Ca^{2+} au niveau de l'élément présynaptique, induisant l'exocytose des vésicules, et ainsi le relargage des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ils se fixent à des récepteurs spécifiques de chaque type de neurotransmetteur, présents à la surface de la membrane post-synaptique, induisant différentes actions au sein de l'élément post-synaptique. Le temps de transmission entre l'arrivée du PA aux synapses et la liaison du neurotransmetteur à son récepteur varie entre 0,3 et 0,5 millisecondes (Purves *et al.*, 2004).

La transmission synaptique, tout comme le message nerveux, se doit d'être transitoire et doit revenir rapidement à son équilibre de repos. Des transporteurs et des canaux ioniques hyperpolarisants (comme les canaux K^+) sont activés dans un second temps, souvent induit par la perturbation provoquée

par le message (activé par la hausse de potentiel de membrane ou la présence élevée d'ions dépolarisants), permettant ainsi de revenir à un état basal.

II - Classification des synapses

Les synapses chimiques sont catégorisées en fonction du neurotransmetteur impliqué dans la transmission. Dans le cerveau, chaque neurone possède une fonction, une forme ou une localisation spécifique permettant de les classer, et il libère généralement un type de neurotransmetteur dans les régions présynaptiques, associés à un ou plusieurs neuropeptides.

De la même manière, les synapses sont classées en fonction de leur neurotransmetteur. Plus de 100 agents ont été référencés (Purves *et al.*, 2004) comme neurotransmetteurs et ils sont classées en fonction de leur précurseur. Il existe :

- Les neurotransmetteurs dérivés de petites molécules, comme :
    - Les acides aminés : le glutamate, l'aspartate, le GABA (γ-aminobutyric acid) et la glycine.
    - Les autres amines (monoamines) : les catécholamines (la dopamine, la noradrénaline, l'adrénaline), les indolamines (la sérotonine) et les imidazolamines (l'histamine).
    - Les purines (bases azotées), comme l'ATP.
- Les neuropeptides : une séquence peptidique de 3 à 30 acides aminés (peptides opioïdes, ocytocine…).

Les synapses se distinguent également par leur action sur le neurone récepteur. Ils peuvent induire soit l'ouverture de canaux dépolarisants, comme les canaux sodiques (Na^+) ou calciques (Ca^{2+}), soit polarisants, comme les canaux potassiques (K^+) et chlorures (Cl^-). La dépolarisation augmentera la possibilité que la membrane atteigne le potentiel d'ouverture des canaux sodiques et provoquer un PA, et les synapses induisant cette action sont dites excitatrices. A l'inverse, la polarisation diminue la possibilité de déclencher un PA, les synapses impliquées sont donc inhibitrices.

Les principales synapses excitatrices présentes dans le cerveau sont les synapses dont le neurotransmetteur est le glutamate. Elles sont appelées synapses glutamatergiques. Elles représentent au moins 30% des synapses (Herzog, 2004). Les synapses inhibitrices principales ont pour neurotransmetteur le γ-aminobutyric acid (GABA) et sont dites synapses GABAergiques, ainsi que des

synapses dont le neurotransmetteur principal est la glycine (synapses glycinergiques), et parfois des synapses mixtes (Danglot *et al.*, 2004).

Les synapses répondant aux autres neurotransmetteurs ont des fonctions diverses. Les monoamines et purines activent généralement des récepteurs métabotropiques, sauf la sérotonine qui possède un récepteur ionotropique, le 5-HT3, qui provoque une activité excitatrice, parmi de nombreux récepteurs métabotropiques, tout comme l'ATP. Leur action au sein du système nerveux est modulatrice. L'acétylcholine est retrouvée dans le système nerveux et au sein de la jonction neuromusculaire. Il s'agit de récepteurs ionotropiques (nicotiniques) excitateurs au niveau des muscles squelettiques qui provoquent leur contraction. Les récepteurs métabotropiques (muscariniques) peuvent être inhibiteurs ou excitateurs. Au niveau des muscles cardiaques, ils sont inhibiteurs.

III - Structure de la synapse

La synapse est une zone d'interaction entre deux neurones. Elle se décompose en trois parties : l'élément présynaptique, la fente synaptique et l'élément post-synaptique. La différence de morphologie entre synapse excitatrice et inhibitrice est distinguable par observation au microscope électronique à transmission (MET). Les éléments présynaptiques se situent au bout des prolongements axonaux et sont en forme de bouton. La région post-synaptique d'une synapse excitatrice est une protubérance en bouton le long de la dendrite (appelé épines dendritiques). Elle contient une zone de densité aux électrons sous l'interface membranaire (zone active) d'une épaisseur beaucoup plus importante que dans la partie présynaptique (**Figure 9**). Cette zone, nommée densité post-synaptique (Postsynaptic density, PSD) représente un rassemblement de protéines nécessaires aux actions suivant la réception du message synaptique. La zone active des éléments pré et post-synaptiques s'étend radialement sur 1 à 2 mm^2. Dans la région présynaptique d'une synapse glutamatergique, les vésicules contenant les neurotransmetteurs ont une forme ronde, alors qu'elles sont plutôt ovales dans les synapses GABAergiques (Peters *et al.*, 1982). La région post-synaptique de ces dernières a une forme moins saillante sur la dendrite.



Figure 9 : Synapse excitatrice glutamatergique du cortex visuel du chat observé au microscope électronique à transmission. L'élément présynaptique contient les vésicules de glutamate, les flèches noires désignent la zone active. L'élément post-synaptique présente une zone dense aux électrons plus importante au niveau de la zone active. Grossissement × 32 500 (D'après Colonnier, 1968)

1 - La région présynaptique

Dans ce compartiment sont stockées les vésicules contenant les neurotransmetteurs. Les précurseurs sont acheminés du soma vers la synapse par voie vésiculaire, du réticulum endoplasmique granuleux (REG) aux endosomes, transportés par les kinésines. Dans les synapses glutamatergiques, le remplissage des vésicules par le glutamate se réalise dans la synapse grâce aux transporteurs vésiculaires VGLUT1 et VGLUT2 (Herzog, 2004). L'arrivée du PA au niveau de l'élément présynaptique induit l'ouverture des canaux calciques, qui induit une concentration massive d'ions Ca^{2+} dans le cytosol. Le calcium présent active diverses protéines mais principalement la Synaptotagmine 1, une protéine ancrée dans la membrane des vésicules qui induit alors la formation du complexe SNARE (soluble NSF attachment receptor), faisant interagir un ensemble des protéines cytoplasmiques ancrées dans la membrane vésiculaire comme la Synaptotagmine, Rab3/27 et VAMP2, avec des protéines intracellulaires en partie insérées dans la membrane plasmique (SNAP-25, Syntaxine-1) accompagnés par des protéines cytoplasmiques, les RIM, Munc13 et Munc18 (**Figure 10**). La liaison de RIM à des protéines cibles spécifiques coordonne les trois fonctions de la zone active : avec les protéines Rab3 et Rab27, elle induit l'amarrage des vésicules. Avec Munc13, RIM active l'amorçage des vésicules. Sa liaison au canal calcique, à la fois directement et indirectement via RIM-BP, recrute les canaux calciques à moins de 100 nm des vésicules ancrées pour un couplage excitation-sécrétion rapide (Südhof, 2013).

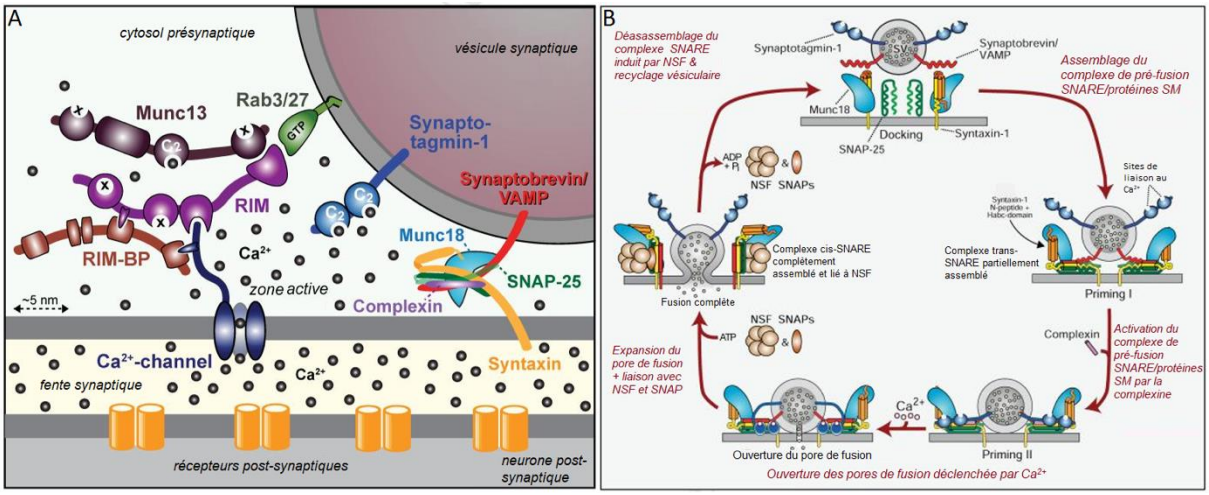


Figure 10 : A. Les protéines du complexe SNARE (comprenant la synaptobrévine / VAMP, syntaxine-1 et SNAP-25 et la protéine Munc18) et protéines SM (Sec1/Munc18-like proteins). **B. Les étapes de fusion contrôlées par les protéines du complexe SNARE, les protéines SM et la NSF** (ATP-ase provoquant le désassemblage du complexe SNARE.). (D'après Südhof 2013)

2 - La fente synaptique

La formation et le maintien de la fente synaptique s'opère grâce à la mise en place de protéines d'adhésion cellulaires synaptiques (CAMs) qui lient l'élément présynaptique avec l'élément post-synaptique. Les CAMs sont en majorité des protéines transmembranaires possédant une région extracellulaire qui permet de créer des connexions. Deux types de CAMs sont retrouvées au niveau de la fente synaptique : celles formant des connexions homophiliques entre elles (deux protéines identiques, l'une ancrée dans la membrane présynaptique et l'autre dans la membrane post-synaptique, se lient au niveau de la région extracellulaire) et celles formant des connexions hétérophiliques (la protéine présynaptique et la protéine post-synaptique qui interagissent ensemble ne sont pas les mêmes) (Thalhammer and Cingolani, 2014), mêmes si certaines protéines peuvent former les deux types de liaisons (Dityatev *et al.*, 2008). Il existe également des CAMs qui relient les éléments de la synapse avec les astrocytes, comme EphA4/ephrin-A3 (Filosa *et al.*, 2009) ou à la matrice extracellulaire, ou d'autres encore, qui sont intracellulaires. Les CAMs possèdent parfois une région intracellulaire qui interagit avec des protéines de la synapse et participent ainsi à la transduction du signal.

Parmi ces protéines, on peut citer la famille des cadhérines, des intégrines, caténines, les neurexines et les neuroligines. Les cadhérines sont des protéines homophiliques, se liant l'une avec l'autre via leur domaine extracellulaire. Elles sont impliquées dans toutes les étapes de la neurogenèse, mais plus particulièrement dans la formation des synapses et souvent associés au caténines, des protéines intracellulaires qui les relient à d'autres protéines impliquées dans une voie de signalisation. Le degré

d'interaction entre ces protéines dépend de la concentration en Ca^{2+} extracellulaire (Hirano and Takeichi, 2012). La N-cadhérine est la cadhérine majoritaire au niveau des synapses matures. Elle forme un complexe avec la β-caténine et les récepteurs AMPA (AMPA-R) qui participe à la plasticité synaptique (Nuriya and Huganir, 2006).

Les SynCAMs (CAMs exprimées spécifiquement au niveau de synapses) forment également des interactions homophiliques entre elles, et sa région intracellulaire interagit avec CASK et la protéine 4.1. Récemment, son implication dans la formation des circuits neuronaux et dans le guidage axonal serait une cause possible de l'induction de troubles liés à des TND (TSA, DI), en plus de perturbations de la plasticité synaptique (Frei and Stoeckli, 2017).

Les protéines à interaction hétérophiliques participent lors de la synaptogenèse à la mise en place de l'interaction entre un axone et une dendrite, et non entre deux dendrites ou entre deux axones. Parmi ces protéines : la nectine-1 présynaptique se lie avec la nectine-3 post-synaptique (Mizoguchi et al. 2002), les neurexines (pré) interagissent avec les neuroligines (post). Les neuroligines possèdent un motif de liaison au domaine PDZ, un domaine présent dans de nombreuses protéines de la densité post-synaptique PSD-95 (Meyer *et al.*, 2004).

Des perturbations rares à effet fort au sein des gènes codants pour les CAM synaptiques ont été mises en évidence au sein de la DI, comme *CDH15* (M-cadhérine) et *KIRREL3* (Bhalla *et al.*, 2008), *CTNND2* (δ-caténine, impliquée dans le syndrome du cri du chat) (Medina *et al.*, 2000). Associés à des cas de TSA, des microdélétions ont été retrouvées dans *CDH8* (également associées à des troubles de l'apprentissage) (Pagnamenta *et al.*, 2011), dans *PCDH10* (protocadhérine 10) (Morrow *et al.*, 2008), des SNV rares sont retrouvés dans les gènes codant pour dans les neuroligines *NLGN3* et *NLGN4X* (Jamain *et al.*, 2003; Laumonnier *et al.*, 2004; Quartier *et al.*, 2019) alors que des variants faux-sens rares et communs au sein de *NRXN1* (α-neurexine) (Südhof, 2008; Kasem *et al.*, 2018) ainsi que des SNP au sein de cadhérines comme *CDH9* et *CDH10* (Wang *et al.*, 2009) ont été retrouvées, signifiant un effet faible qui expriment un phénotype pathologique seulement associés à d'autres facteurs. Ces perturbations au sein de protéines d'adhésion mettent en évidence que la déstabilisation de la communication synaptique est au cœur de ces troubles.

3 - La région post-synaptique

La région post-synaptique est impliquée dans la réception du message nerveux et de la transduction du signal qui en résulte. Les nombreuses protéines inclues dans la membrane ou sous sa surface créent une région dense en protéines, nommée densité post-synaptique (PSD). Il s'agit d'un ensemble de récepteurs enchâssés dans un groupe de protéines d'ancrage qui relient des protéines

effectrices induisant des voies de signalisation, des canaux ioniques et autres protéines membranaires, ainsi que des éléments du cytosquelette (Sheng and Kim, 2011).

IV - L'organisation post-synaptique des synapses inhibitrices

La densité aux électrons des régions post-synaptiques inhibitrices observées au MET est moins importante que celle des synapses excitatrices glutamatergiques, et à peu près équivalente à celle de la région présynaptique (Gray, 1959), suggérant une architecture protéique moins complexe que celle des régions post-synaptiques glutamatergiques. Les récepteurs au GABA ($GABA_A$-R) et à la glycine (GlyR) sont ionotropes, c'est-à-dire que ce sont des récepteurs canaux, et l'activation par leur neurotransmetteur spécifique provoque leur ouverture et laisse entrer les ions Cl^-, provoquant une hyperpolarisation de la membrane. Les récepteurs $GABA_B$ sont métabotropiques.

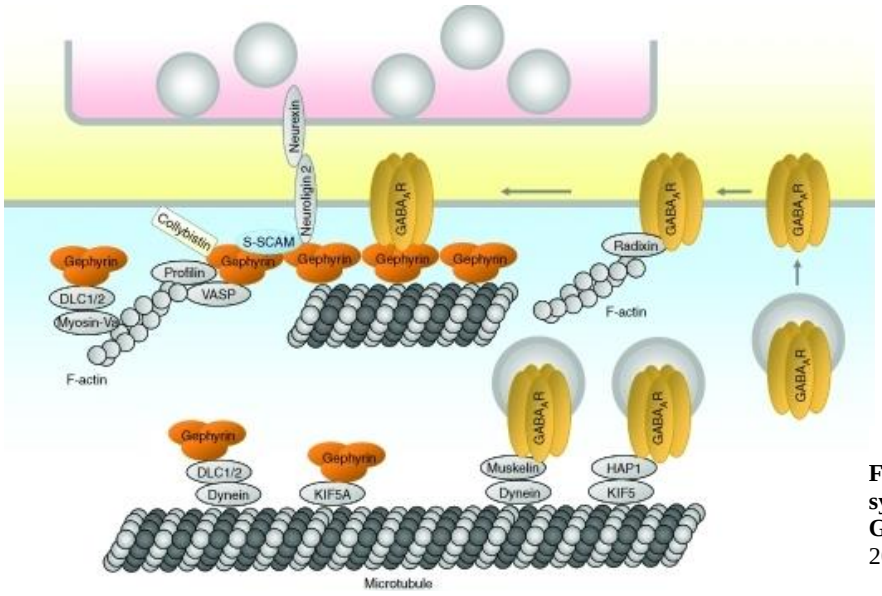


Figure 11 : L'organisation post-synaptique des synapses GABAergiques. (Sheng and Kim, 2011)

$GABA_A$-R et GlyR sont tous deux liés à une protéine d'échafaudage, la géphyrine (**Figure 11**). Cette protéine régule un grand nombre d'activités : elle permet le rassemblement des récepteurs à la synapse, le maintien de l'architecture post-synaptique en se liant aux microtubules et à l'actine, mais aussi à la neuroligine 2, la CAM associée à ce type de synapse, elle intervient dans la régulation du nombre de récepteurs à la membrane en interagissant également avec les kinésines. La géphyrine constitue l'échafaudage post-synaptique par une structure alvéolée due à sa trimérisation (assemblage de trois géphyrines) et elle est régulée par la concentration en Ca^{2+} et la phosphorylation par la kinase GSK3β, influençant la quantité de récepteurs à la surface et donc la réponse inhibitrice (Alvarez, 2017).

Des altérations du gène de la géphyrine *GPHN* ou de son expression ont été mis en évidence dans différentes pathologies neuropsychiatriques, neurodégénératives et neurodéveloppementales (Pizzarelli *et al.*, 2020). La délétion rare des exons 3 à 5 (comprenant le domaine G permettant la trimérisation de la protéine) a été identifié chez 6 sujets atteints de TSA, de schizophrénie ou d'épilepsie (Lionel *et al.*, 2013). *GABRB3*, codant pour la sous-unité β3 du $GABA_A$-R, est un gène susceptible d'être impliqué dans les TSA (Chen *et al.*, 2014), bien que certaines études ne valident pas cette hypothèse (Noroozi *et al.*, 2018).

D'autres protéines participent à la dynamique de la synapse inhibitrice, comme la muskeline, HAP1 et DLC1/2, qui sont impliquées dans le trafic moléculaire, la radixine, qui stabilise les $GABA_A$-R à la synapse en l'associant à l'actine-F, et la S-CAM, qui stabilise le complexe géphyrine-neuroligine 2.

V - L'organisation post-synaptique des synapses excitatrices glutamatergiques

La PSD des synapses glutamatergiques est une zone très dense en protéines, composée principalement de récepteurs, de protéines effectrices inclues dans des voies de signalisation, des composants du cytosquelette et protéines d'échafaudage qui lient ces éléments dans une architecture complexe. (**Figure 12**)

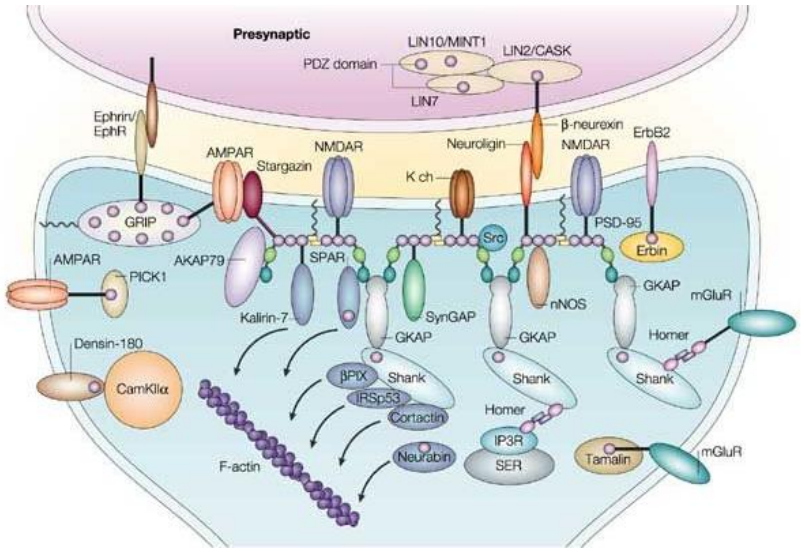


Figure 12 : L'organisation post-synaptique des synapses glutamatergiques, rassemblant récepteurs, protéines d'adhésion et d'échafaudage et protéines de signalisation (Kim and Sheng, 2004)

1 - Les récepteurs

Les récepteurs lient les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique, ce qui induit des actions diverses au sein du neurone post-synaptique, en fonction de ses caractéristiques. En effet, à la surface du même élément post-synaptique des synapses glutamatergiques, il existe plusieurs types de récepteurs aux propriétés diverses, et par conséquent aux fonctions différentes. La première distinction entre ces récepteurs repose sur la conséquence directe de son action : les récepteurs ionotropiques ouvrent leur canal alors que les récepteurs métabotropiques activent des protéines intracellulaires.

A - Les récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGlurR) ne sont pas des canaux. Il s'agit de protéines à sept domaines transmembranaires faisant partie des récepteurs couplés à des protéines intracellulaires hétérotrimériques (composées des sous-unités α, β et γ) dites protéines G (RCPG). Le site de fixation du ligand est situé sur le large domaine N-terminale extracellulaire et les mGluR forment des homodimères à la membrane.

L'activité des protéines G dépend de leur liaison au GTP (forme active) ou au GDP (forme inactive). La réception du glutamate provoque un changement de conformation du récepteur qui induit la libération du GDP lié à la protéine G, permettant à celle-ci de pouvoir lier un GTP qui la rendra active et lui permettra d'agir sur ses effecteurs. Le retour à l'état inactif se réalise quand la GTP est hydrolysée en GDP par la fonction GTPase de la protéine, favorisée par l'activité GAP (GTPase activating protein) des RGS (Regulator of G-protein signaling). Cette activation entraine une cascade de signalisation pouvant mener à diverses fonctions : l'ouverture de canaux, l'internalisation ou l'émergence de nouveaux récepteurs ou l'induction de la transcription de gènes.

Les mGluR sont classés en trois catégories d'après leur homologie de séquence et en fonction de la voie de transduction dans laquelle ils sont impliqués. Le premier groupe inclut mGluR1 et mGluR5 qui activent la phospholipase C via la protéine Gq. Les récepteurs mGluR2 et mGluR3 (groupe 2) ainsi que mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8 (groupe 3) sont couplés négativement à l'adénylate cyclase via une protéine G de type Gi/Go.

B - Les récepteurs ionotropiques

Les récepteurs ionotropiques au glutamate sont des canaux dont l'ouverture induit un effet dépolarisant. Il en existe plusieurs catégories, présentant des propriétés physico-chimiques influençant leur temps d'ouverture et la spécificité des ions qu'ils laissent passer. Bien que tous activés par le glutamate, ils sont classés en fonction d'un agoniste qui leur est exclusivement spécifique. Un agoniste

est un ligand autre que le neurotransmetteur endogène qui se fixe sur le récepteur (parfois sur le même site, parfois sur un autre) et induit son activation (identique ou améliorée par rapport à celle induite par le neurotransmetteur).

a) Les récepteurs au AMPA

Les récepteurs au AMPA (AMPA-R) sont nommés ainsi en raison de leur agoniste synthétique, l'acide α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolépropionique, qui n'activent que ces récepteurs. Leur ouverture permet l'entrée des ions Na^+ et la sortie des ions K^+, tendant à atteindre un potentiel d'équilibre vers 0 mV, et donc un effet dépolarisant. L'ouverture et la fermeture des AMPA-R est très rapide et génère un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) représenté par un pic sur le diagramme du potentiel en fonction du temps (atteinte du pic en 5 ms, puis décroissance exponentielle en 25 ms) (Purves *et al.*, 2004).

b) Les récepteurs delta

La famille des récepteurs au glutamate de type delta est composée de deux membres, GluRδ1 et GluRδ2. Le premier est présent dans l'appareil auditif et dans la région des neurones dopaminergiques du mésencéphale, le second est principalement exprimée par les cellules de Purkinje dans le cervelet (Yuzaki, 2003). Bien que très similaires aux récepteurs au glutamate ionotropiques, ces récepteurs ne lient pas le glutamate mais sont impliqués dans la transmission synaptique glutamatergique.

GluRδ2 est en effet activé par le récepteur métabotropique mGluR1 dans le cervelet et est impliqué dans l'induction d'un courant post-synaptique excitateur (CPSE) long entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje (Ady *et al.*, 2014). GluRδ1 est activé par mGluR1 et mGluR5 au sein du mésencéphale provoquent des bouffées d'activité à haute fréquence dans les neurones dopaminergiques (Benamer *et al.*, 2018).

Des mutations au sein gène *Grid1*, codant Gluδ1, sont associées à des troubles cognitifs comme la schizophrénie et les TSA, et les souris KO dépourvues de Gluδ1 présentent une hyperactivité, un déficit d'interactions sociales et des troubles de l'apprentissage (Yadav *et al.*, 2012).

c) Les récepteurs kaïnate

Les récepteurs sensibles à l'acide kaïnique sont des tétramères formés à partir cinq types de sous-unités, GluR5, GluR6, GluR7, KA1 et KA2. Les sous-unités GluR5-7 peuvent former des homomères (que des GluR6 par exemple) et des hétéromères, alors que KA1 et KA2 ne peuvent former des récepteurs fonctionnels qu'en étant combiné avec l'une des sous-unités GluR5-7 (Dingledine *et al.*, 1999). Ils sont similaires aux récepteurs AMPA-R et d'ailleurs lie l'AMPA, mais avec une affinité plus

faible que les AMPA-R. Les sous-unités GluR6a, GluR5b et GluR5c possèdent dans leurs domaines C-terminaux un motif de liaison aux protéines à domaine PDZ. GluR6a interagit avec PSD-95 et CASK, permettant leur intégration au sein de la zone active de la région post-synaptique (Coussen *et al.*, 2002).

Ils sont retrouvés au niveau des synapses entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de CA3 de l'hippocampe, à la fois dans la région post-synaptique et présynaptique, facilitant la transmission en contribuant à la fois à la génération de PPSE et à la régulation de la libération du glutamate. Le PPSE provoqué par les récepteurs kaïnate est de plus petite amplitude et plus lente que celle des récepteurs de type AMPA-R, ce qui permet leur sommation lors des stimulations répétées des fibres moussues, contribuant ainsi à la plasticité à court terme de ces synapses. Leur présence extrasynaptique est retrouvée également sur les terminaisons GABAergiques des interneurones dans la région CA1, où leur activation augmente la libération de GABA (Jaskolski *et al.*, 2005).

Des SNP du gène *GRIK3* codant pour la sous-unité GluR7 sont associés à la schizophrénie (Begni *et al.*, 2002) ainsi que pour le gène *GRIK2* (GluR6) sont liés aux TSA (Jamain *et al.*, 2002) . La mutation ponctuelle I867M présente dans le domaine C-terminale y a été retrouvée chez 8% des sujets atteints d'autisme et sa transmission semble être principalement maternelle.

d) Les récepteurs NMDA

Les récepteurs au NMDA (NMDA-R) ont pour agoniste spécifique le *N*-methyl-D-aspartate, une molécule de synthèse excitotoxique. Leur ouverture, quand ils sont activés, laisse passer principalement des ions Ca^{2+}, mais aussi des ions Na^{+} et K^{+}. Cependant cette ouverture est bloquée par un ion magnésium (Mg^{2+}) lorsque le potentiel de membrane est en-dessous de -20 mV. Il faut donc une dépolarisation préalable de la membrane pour lever ce blocage et permettre aux ions de passer.

La glycine est également un agoniste des NMDA-R, mais dont le site de liaison est différent que celui du glutamate (Lehmann *et al.*, 1991). Elle est nécessaire à son ouverture, mais pas suffisante.

Le NMDA-R est composé de quatre sous-unités, deux sous-unités NR1, essentiels pour son fonctionnement, et deux sous-unités NR2 de type A, B, C ou D, variables en fonction de la période de développement et de sa localisation dans le cerveau, et donnant au récepteur des propriétés variables influençant l'activité et la plasticité synaptique (Paoletti *et al.*, 2013). La spécificité des NMDA-R par rapport aux autres récepteurs au glutamate est sa perméabilité au calcium. La présence des ions Ca^{2+} au sein de la région post-synaptique active des voies de signalisation spécifiques. Ces ions sont cependant rapidement expulsés, car leur présence prolongée est excitotoxique pour les neurones. Les voies induites par le calcium sont en effet néfastes si elles sont activées longtemps.

2 - Les protéines d'échafaudage post-synaptiques

A - Définition

Les protéines de l'échafaudage post-synaptique sont des éléments essentiels à la régulation de la transduction des signaux post-synaptiques, du transport de protéines et à la morphologie des épines dendritiques. Elles rassemblent plusieurs domaines (SH3, SH2, PH, L27, WW, Hook, CC et PDZ) au sein de leur structure dont la fonction est de se lier entre elles ou à d'autres partenaires de liaison afin de créer un réseau structuré facilitant les interactions entre récepteurs, protéines effectrices ou liés au cytosquelette (**Figure 13**). Elles ne présentent généralement pas d'activité enzymatique. Elles permettent l'ancrage des récepteurs membranaires dans la zone active de la synapse ou lors de son internalisation, et interagissent également avec les protéines d'adhésion cellulaire, permettant une cohérence dans la structure des synapses pour situer la zone active de la région post-synaptique en face de la région présynaptique.

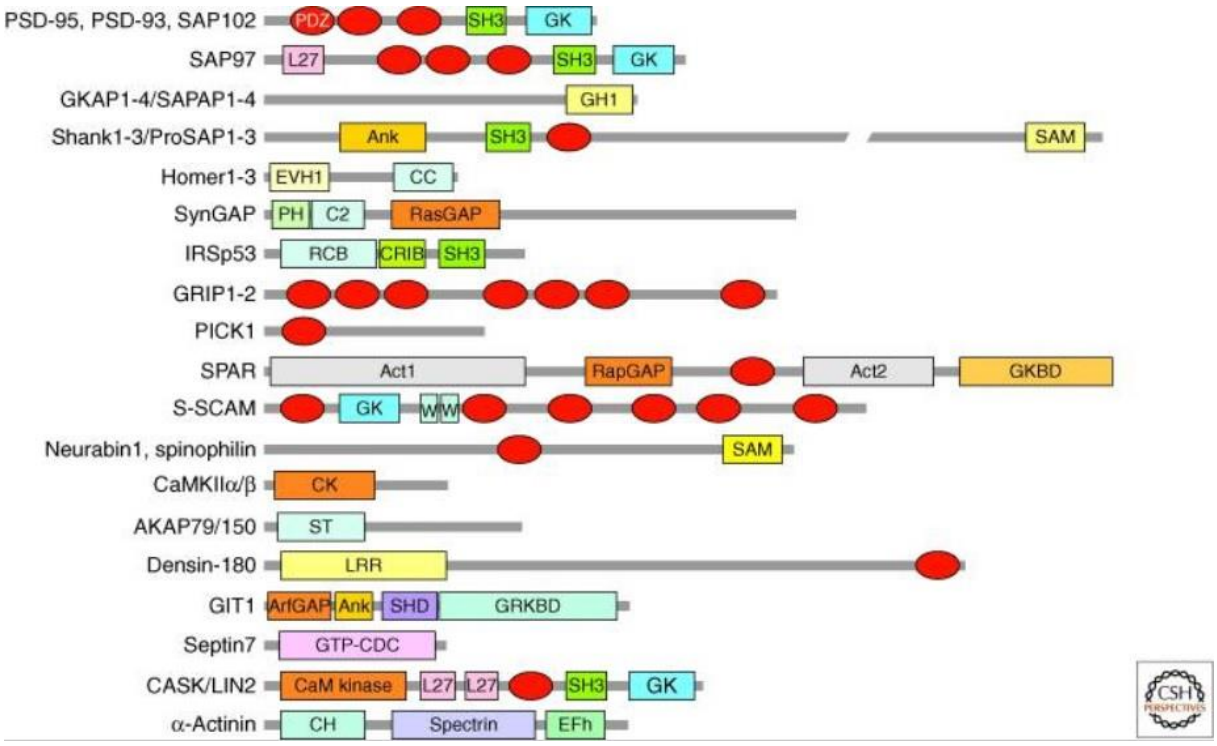


Figure 13 : Les protéines majeures de l'échafaudage post-synaptique des synapses glutamatergiques et leurs domaines. **Act**, actin-binding; **Ank**, ankyrin repeats; **ArfGAP**, GTPase-activating protein pour petites GTPases Arf; **CC**, coiled coil; **CH**, calponin homology; **CK**, CaMK-like domain; **CRIB**, Cdc42/Rac interactive-binding; **EFh**, EF-hand; **EVH1**, Ena/VASP homology 1; **GH1**, GKAP homology 1; **GK**, guanylate kinaselike domain; **GKBD**, GKAP-binding domain; **GRKBD**, GRK2-binding domain; **GTP-CDC**, GTP-cell division protein; **L27**, touvés initialement dans LIN-2 and LIN-7; **LRR**, leucine-rich repeat; **PDZ**, PSD-95/DLG/ZO-1. **PH**, pleckstrin homology; **RapGAP**, GTPase-activating protein for Rap small GTPases; **RasGAP**, GTPase-activating protein for Ras small GTPases; **RCB**, Rac binding; **SAM**, sterile alpha motif; **SH3**, Src homology 3; **SHD**, Spa2 homology domain; **Spectrin**, spectrin repeat; **ST**, subcellular targeting domain; **WW**, domaines comprenant 2 résidus Trp (W). (Sheng and Kim, 2011)

Trois catégories de familles ont été mises en évidence, les MAGUK, le SAPAP et SHANK. Les MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) sont des protéines d'échafaudage généralement situées à proximité de la membrane et interagissant avec les protéines membranaires. Elles rassemblent la famille des DLG (Disc-Large Homolog), CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase), MPP (palmitoylated membrane protein), ZO (zona occludens), CARMA (caspase recruitment domain family), CACNB (Calcium channel β subunit) et MAGI (MAGUK with an inverted repeat)(de Mendoza *et al.*, 2010).

Les membres de cette famille possèdent pour caractéristiques communes le même motif de succession de domaines : plusieurs domaines PDZ puis un domaine SH3 (Src-homology-3) (sauf chez les MAGI) et un domaine GK (Guanylate kinase) inactif, homologue à la GK chez la levure (Funke *et al.*, 2005). Certaines d'entre elles possèdent également un domaine L27 en N-terminale (Oliva *et al.*, 2012). Ce domaine est retrouvé dans les protéines LIN2 (CASK) et LIN7 (VELI) et permet des interactions hétérotypiques entre les L27 de type A et de type B (Petrosky *et al.*, 2005).

La famille Disc-large homolog (DLG) comprend 5 protéines homologues dont PSD-95 (DLG4), qui a été très étudié, SAP 102 (DLG3). Elles sont constituées d'une succession de trois domaines PDZ, suivi d'un domaine SH3 puis du domaine GK. Seul SAP-97 présente un domaine L27 en N-terminal (**Figure 13**).

PSD-95 est retrouvée en quantité importante au niveau de la région post-synaptique des synapses glutamatergiques (Cho *et al.*, 1992; Cheng *et al.*, 2006). Elle influe sur l'activité des protéines de la membrane en contrôlant leur présence et leur stabilité à la surface, le trafic cellulaire, la composition des sous-unités des récepteurs, influençant ainsi leurs propriétés, ce qui lui donne un rôle essentiel dans la plasticité synaptique et la morphogenèse des épines dendritiques. Des perturbations au sein du gène *DLG4* ont été retrouvés chez des patients de TSA, de DI ou de schizophrénie (Coley, 2018).

Les protéines avec qui PSD-95 interagit se lient spécifiquement à différents domaines. Ses domaines PDZ se lient à des protéines membranaires comme les sous-unités NR2A et NR2B des NMDA-R (Kornau *et al.*, 1995, p. 95), indirectement aux AMPA-R via le complexe de protéines Stargazine/TARPs (Chen *et al.*, 2000), aux canaux potassiques, au récepteur tyrosine kinase ErbB4 et également aux neuroligines, permettant la stabilisation de la synapse entière. Ses interactants intracellulaires sont également des effecteurs comme Arc (Activity-regulated cytoskeleton-associated protein), les protéines de la famille Src (tyrosine kinsases non récepteurs), IRSp53 qui régule la voie de Rho GTPases, SynGAP, impliquée dans la formation de l'axone, le développement et la maturation des épines dendritiques, et nNOS (neuronal nitric oxide synthase) qui joue un rôle dans la plasticité synaptique. Les domaines SH3 et GK se lient à d'autres protéines d'échafaudage comme AKAP, ou GKAP. CASK (LIN2) est la seule MAGUK qui possède un domaine CaM kinase (CAMK)

constitutivement actif, en prime de lier différentes protéines via ses domaines d'interactions protéine-protéine. Elle régule l'activité de la CAMK II impliquée dans la voie IP3 au sein de la PSD et stabilise la neurexine 1 au niveau de la région présynaptique (Mukherjee *et al.*, 2008).

GKAP (GK associated protein) est un partenaire de liaison de PSD-95 qui se lie via son domaine GK (Kim *et al.*, 1997). Elle est codée par le gène *DLGAP1*, fait partie des SAPAP (SAP90/PSD-95 associated proteins), une famille de 4 protéines partageant la même propriété de liaison au domaine GK des DLG (Takeuchi *et al.*, 1997). Il est un élément de stabilisation de l'échafaudage post-synaptique plus profond. Son interaction avec PSD-95 d'une part et la protéine SHANK d'autre part permet la stabilisation des mGluR1/5 dans la zone active de la synapse via le complexe GKAP/SHANK/HOMER. GKAP interagit également avec la sous-unité DLC (dynein light chain), retrouvée à la fois dans la myosine-V et la dynéine, deux moteurs moléculaires impliqués dans le transport vésiculaire (Naisbitt *et al.*, 2000) et indirectement avec l'actine via la cortactine, laissant supposer son implication dans le trafic vésiculaire.

SHANK (SH3 and multiple ankyrin repeat domains proteins) est une famille de trois protéines encodées par les gènes *SHANK1*, *SHANK2* et *SHANK3*. Chaque protéine présente divers isoformes qui sont exprimés différemment selon les étapes de développement, les régions cérébrales et le type de cellules. Les domaines d'interaction notables de SHANK sont des répétitions d'ankyrine (un motif répété de deux hélices α (Mosavi *et al.*, 2004)), un domaine SH3, un domaine PDZ, un domaine riche en proline (PRO) et le domaine SAM. Il s'agit de domaines d'interaction protéine-protéine. SHANK lie la queue C-terminale de GKAP via son domaine PDZ. Le domaine PRO interagit indirectement à l'actine via la cortactine et avec les protéines de la famille HOMER.

Chez l'Homme, six protéines HOMER se distinguent, issues des trois gènes distincts présentant une à trois formes issues d'un épissage alternatif : HOMER 1a, b et c, HOMER 2a et b et HOMER 3. Les protéines HOMER présentent toutes un domaine EVH1 en N-terminale et un domaine Coiled-coil (CC) en C-terminale, excepté pour HOMER 1a qui présente une forme tronqué de sa région CC. Le domaine EVH1 se lie à la sous-unité mGluR1/5 (groupe 1) des récepteurs métabotropiques au glutamate, aux récepteurs IP3 (IP3 R), à SHANK bien entendu et à la Dynamine III (impliquée dans la formation des vésicules et l'organisation des microtubules).

Le domaine CC permet la formation d'homomultimères et d'hétéromultimères et interagit également avec les formes activées de la famille Rho GTPases. Par sa forme privée de CC, HOMER 1a jouerait donc le rôle d'inhibiteur en empêchant la multimérisation des HOMER ou la facilitation de l'activation de la voie IP3 et des Rho GTPases.

B - Les domaines PDZ et motif de liaison au domaine PDZ

Au sein de la PSD, les domaines PDZ sont des domaines d'interaction protéine-protéine très présents. Retrouvés entres autres en un à plusieurs exemplaires chez les protéines DLG, SHANK, sortin-nexin 27, les S-CAM, GRIP, PICK1, CASK, SPAR et Neurabin, il s'agit de petits domaines d'environ 80 à 100 acides aminés contenant 5 ou 6 structures de type brins β, une hélice α (αA)et une hélice α longue (αB) (Kim and Sheng, 2004). Parfois ces domaines peuvent former des homodimères, notamment chez SHANK1 et GRIP-1, ou une structure en tamdem (notamment pour PSD-95) (Long *et al.*, 2003). Leur site de liaison se situe sur la boucle entre l'hélice αA et le βB avec le motif consensus R/K-XXX-G-Φ-G-Φ où X est un acide aminé quelconque et Φ est un résidu hydrophobe (Lee and Zheng, 2010).

Les protéines d'échafaudage possédant plusieurs domaines PDZ permettent l'organisation des protéines (comme GRIP1, qui possède 7 domaines PDZ (**Figure 13**)) et à la facilitation des interactions en cascade dans des voies de signalisation spécifiques. Ces domaines reconnaissent et se lient pour la plupart à une courte séquence de quatre à neuf acides aminés au bout de la partie C-terminale libre des protéines avec lesquelles elles interagissent, d'autres ciblent des séquences internes, comme la structure β en épingle à cheveux de nNOS qui se lie à PSD-95 (Hillier *et al.*, 1999). Cette séquence se retrouve dans les protéines de la PSD comme Stargazine, PTCHD1, IRSP53, dans de nombreux récepteurs, dont 20% des RCPG (dont mGluR5, le récepteur β1 adrénergique), AMPA-R, les sous-unités NR2A et NR2B de NMDA-R, les récepteurs kaïnate et des canaux ioniques.

L'interaction des domaines PDZ avec ses partenaires peut être négativement modulée par phosphorylation, et ainsi permettre, au niveau des synapses glutamatergiques, une régulation de la stabilisation des complexes de l'échafaudage post-synaptique, de la présence des récepteurs à la surface et ainsi moduler la plasticité synaptique. En effet, la phosphorylation du domaine PDZ1 de PSD-95 par la CAMKII cause sa dissociation avec la sous-unité NR2A et inhibe la croissance des épines et la plasticité synaptique (Mauceri *et al.*, 2007). Par le mécanisme inverse, c'est la phosphorylation du motif de liaison C-terminale T/SXV de NRB2 par la kinase CK2 qui régule négativement son interaction avec PSD-95 et SAP102 et favorise l'internalisation du NMDA-R. (Chung *et al.*, 2004). De même, la phosphorylation de la Stargazine par la protéine kinase A (PKA) déstabilise le complexe AMPA-R/Stargazine/PSD-95 et ainsi diminue la présence des AMPA-R dans la zone active.

3 - Les voies de signalisation synaptiques impliquées dans les TND

La dernière catégorie de protéines présentes dans la région post-synaptique est celle des protéines effectrices, directement impliquées dans les voies de signalisation post-synaptiques activées par l'activation des neurotransmetteurs. Au sein de la synapse, la perturbation de gènes impliqués dans

ces voies qui sont associés à la DI et au TSA affectent généralement la formation des épines dendritiques, la potentialisation et la dépression à long terme (Long Term Potentiation, LTP et Long Term Depression, LTD), qui sont respectivement les mécanismes de renforcement et d'affaiblissement de l'efficacité de transmission de la synapse.

A - Les voies des MAP Kinase et la voie PI3 kinase/mTor

La voie des MAP kinases (mitogen-activated proteins) l'une des voies ubiquitaires les plus importantes du développement, impliquées dans la mitose, la différenciation cellulaire et l'apoptose. Elle joue également un rôle important durant le développement neural. Différents facteurs initient leur activation par le biais de leurs récepteurs, notamment les RCPG. Chez les mammifères, les voies associées au MAP kinases peuvent être regroupés en trois catégories en fonction de la protéine effectrice finale: les voies ERK (activés par des signaux extracellulaires via les récepteurs tyrosine kinase (RTK), comme des facteurs de croissance), JNK et p38/SAPK (notamment activées par le stress oxydatif). Ces voies sont régulés en amont par les RCPG, les intégrines, et les petites protéines G Ras et Rap(Morrison, 2012).

Parmi les acteurs de cette voie, les perturbations dans le gène *NF1* induisent la neurofibromatose de type 1, présentant à la fois des atteintes cutanées et des troubles neurologiques, et parfois une DI (Ars *et al.*, 2003), celles du gène *RSK2* induisent le syndrome de Coffin-Lowry, impactant la LTP (Zeniou-Meyer *et al.*, 2010) et *CBP* provoque le syndrome de Rubinstein-Taybi, régulateur de l'état de la chromatine (Korzus, 2017), tous associés à des DI syndromiques. SynGAP, dont les perturbations du gène sont associées à la DI (Hamdan *et al.*, 2009) et qui régule la formation des synapses (Vazquez *et al.*, 2004), est une protéine liée à la partie intracellulaire des NMDA-R et un régulateur négatif de Ras (Krapivinsky *et al.*, 2004).

La voie de signalisation PI3K/mTOR (phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin) est un acteur essentiel de l'homéostasie cellulaire et de la croissance, agissant comme un régulateur du cycle cellulaire, de la prolifération et la différenciation des cellules ainsi que l'apoptose (Borrie *et al.*, 2017). C'est également une voie primordiale de la LTD via la régulation de la présence des récepteurs mGluR à la membrane (Bear *et al.*, 2004). Des gènes associés à la DI et/ou aux TSA, tels *TSC1* et *TSC2* (syndrome de la sclérose tubéreuse de Bourneville), *FRM1* (responsable du syndrome de l'X fragile), *PTEN* (Skelton *et al.*, 2019), *SLC9A9* (codant pour un échangeur Na^+/H^+) (Zhang-James *et al.*. 2019), *EIF4E* et *CYFIP1* (impliqués dans la régulation de la transcription) (De Rubeis *et al.*, 2014) font effectivement partie de cette voie.

B - La voie des Rho-GTPases

Les Rho-GTPases font partie de l'une des neuf familles de la super-famille de protéines Ras (Rojas *et al.*, 2012) rassemblant RAS, RHO, RAB, RAP, ARF, RAN, RHEB, RAD et RIT (Wennerberg, Rossman and Der, 2005). Ce sont des petites protéines G, intracellulaires et non couplés aux RCPG. Leur état est régulé par deux protéines ; la protéine GEF (guanine nucleotide exchange factor), qui permet de remplacer le GDP présent sur la protéine par un GTP pour la rendre active. A l'inverse, la protéine GAP (GTPase activating protein) facilite l'action de la GTPase de la protéine G, ramenant cette dernière à un état inactif.

Chez les mammifères, il existe 18 Rho-GTPases, bien que l'appartenance de cinq d'entre elles à cette famille soit encore discutée en raison de l'absence de la mise en évidence d'une activité GTPase intrinsèque (Hall, 2012) (**Tableau 3**).

Gènes (locus)	**Protéines**
RHOA (3p21.31), *RHOB* (2p24.1), *RHOC* (1p13.2)	RHO (A, B et C)
RAC1 (7p22.1), *RAC2* (22q13.1), *RAC3* (17q25.3)	RAC (1, 2 et 3)
CDC42 (1p36.12)	CDC42
RHOQ (2p21)	TC10
RHOG (11p15.4)	RHOG
RHOJ (14q23.2)	TCL/RHOJ
RHOF (12q24.31)	RIF
RHOD (11q13.2)	RHOD
RHOV (15q15.1)	RHOV/Chp
RHOU (1q42.13)	RHOU/Wrch
RND1 (12q13.12), *RND2* (17q21.31), *RND3* (2q23.3)	RND (1, 2 et 3)
RHOH (4p14)	RHOH/TTF

Tableau 3 : Famille de Rho GTPases retrouvé chez l'Homme et gènes associés. En gris, les protéines dont l'appartenance à cette famille est encore discuté. (D'après Hall 2012).

Les Rho GTPases ciblent plus de 100 protéines différentes, dont une trentaine de kinases, des protéines d'échafaudage (Bishop and Hall, 2000) et les formines (protéines favorisant la polymérisation de l'actine) (Kühn and Geyer, 2014). Au sein du neurone, les Rho-GTPases, et principalement RHOA,

RAC1 et CDC42 sont impliquées dans l'établissement de la morphologie des neurites et des synapses via leur action sur la régulation du cytosquelette d'actine.

Bien que certains mécanismes d'action sur le cytosquelette d'actine soient floues, il a été mis en évidence que RHO favorise la polymérisation de l'actine en filaments linéaires en interagissant avec mDia, une protéine contenant un domaine FH (formine homology) (Watanabe *et al.*, 1997). RHO active également ROCK (Rho-associated kinase), ce qui conduit par phosphorylation du MBS (Myosin binding subunit) et à l'inactivation de la MLCP (myosine light chain phosphatase), activant ainsi la myosine II et la formation de filaments d'acto-myosine contractiles (Kimura *et al.*, 1996).

RAC1 participe au maillage de l'actine F en libérant la protéine WAVE d'un complexe inhibiteur, qui permet la formation du complexe Arp2/3 impliqué dans l'initiation de la création de filaments d'actine primaires ou à partir d'un filament existant, créant ainsi des protrusions de type lamellipode, tout comme CDC42 qui active un autre activateur de Arp2/3, N-WASP et induit la création de protrusions plus fines en forme de piques, les filopodes. RAC1 et CDC42 activent également PAK1 et PAK3 qui phosphorylent la LIM Kinase 1 (LIMK1) qui inactive la cofiline, empêchant ainsi la dépolarisation de l'actine (Edwards *et al.*, 1999; Zhao and Manser, 2005).

IRSp53 est une protéine également impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine, fixée sous la membrane et liée à PSD-95. Une fois activée par RAC1 et CDC42, elle sert notamment de plateforme d'interaction avec WAVE et N-WASP (Ahmed *et al.*, 2010). Les isoformes S et L sont exclusivement exprimés dans le cerveau (Scita *et al.*, 2008).

Ces mécanismes se retrouvent au niveau du cône de croissance, la structure amiboïde en mouvement située à l'extrémité de l'axone en développement. Elle permet son élongation et oriente l'axone en direction des zones où il doit établir des contacts. La motilité du cône de croissance alterne entre phases de protrusion, d'adhésion et de contraction. L'orientation de l'axone se réalise grâce à la présence ou à la diffusion de molécules de guidage à proximité du cône de croissance, qui soit induit son élongation dans la direction du point de diffusion (il s'agit de chimio-attraction), soit pousse le neurone à se constituer loin de cette zone (chimio-répulsion). Parmi ces molécules, la famille des nétrines rassemble des protéines diffusibles permettant la chimio-attraction, alors que les protéines de la famille des sémaphorines (non diffusibles, mais présentes dans le milieu extracellulaire, ancrées à la surface des cellules) ont des propriétés chimio-répulsives.

Ces protéines de guidage sont détectées par des récepteurs à la surface du cône, entrainant l'action les protéines activatrices ou inactivatrices de Rho-GTPases (Ménager and Kaibuchi, 2003). La protéine RHOA est activée si des signaux de chimio-répulsion sont détectés. En effet, la protéine induit le collapsus du cône de croissance par les mécanismes de contraction évoqués via mDia et ROCK, ce qui empêchera l'axone de s'accroître dans cette direction. En revanche, les protéines Cdc42 et Rac1 sont

activées en présence de signaux chimio-attractifs, entrainant la formation respectivement de filopodes et de lamellipodes orientés vers le signal (**Figure 14**).

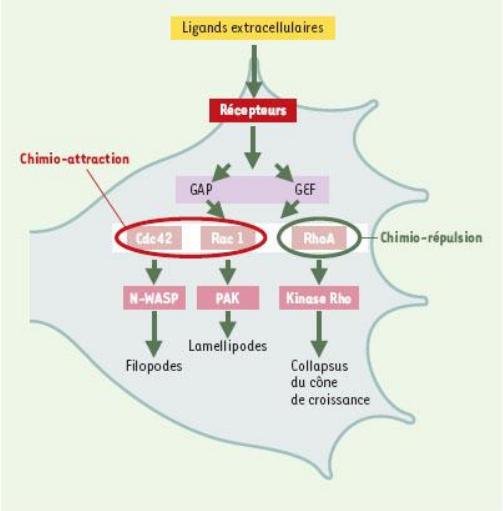


Figure 14 : Voies de signalisation faisant intervenir les Rho-GTPases dans la régulation de la mobilité du cône de croissance. (Ménager and Kaibuchi, 2003)

Bien que les mécanismes soient moins connus, la voie des Rho-GTPases est impliquée dans la formation des synapses et la plasticité synaptique, via l'activation de PAK3 par RAC1 et CDC42. Cela a été mis en évidence notamment par l'inactivation de PAK3 dans des cultures de tranches de cerveau où l'invalidation fonctionnelle de la protéine induit une réduction du nombre de d'épines dendritiques matures et une dérégulation de la transmission du signal des AMPA-R et de la LTP (Boda *et al.*, 2004), confirmé par un modèle de souris transgéniques exprimant uniquement la forme dominant négative de PAK3 (donc lié au GDP et jamais active), et qui présentait des perturbations dans la consolidation de la mémoire (Hayashi *et al.*, 2004). FMRP est également un régulateur de la voie RAC1 et de la cofiline, substrat de PPA2, est un effecteur final, tous deux impliqués dans la maturation des épines dendritiques qui sont les principales structures cellulaires affectées dans le syndrome de l'X fragile (Castets *et al.*, 2005).

Le gène *PAK3* a en effet été mis en évidence dans des cas de retard mental lié à l'X (Allen *et al.*, 1998) et ce n'est pas le seul gène impliqué dans la DI dans la voie de Rho-GTPases : son effecteur *LIMK1*, dont le modèle KO de souris présente les mêmes perturbations (Meng *et al.*, 2002). *OPHN1*, donnant l'oligophrénine-1, est une protéine activatrice de la voie (Billuart *et al.*, 1998) impliqué aussi dans la morphogenèse des épines dendritiques (Govek et al. 2004). *ARHGEF6*, *MEGAP*, *ARHGEF9* (impliqué aussi dans les TSA) ont été également caractérisés par des modèles (Ba *et al.*, 2013) (**Figure 15**). La base SFARI répertorie comme gènes à risque de TSA 20 gènes codant pour les régulateurs et effecteurs des Rho GTPases, dont *TAOK2* (Richter *et al.*, 2019).

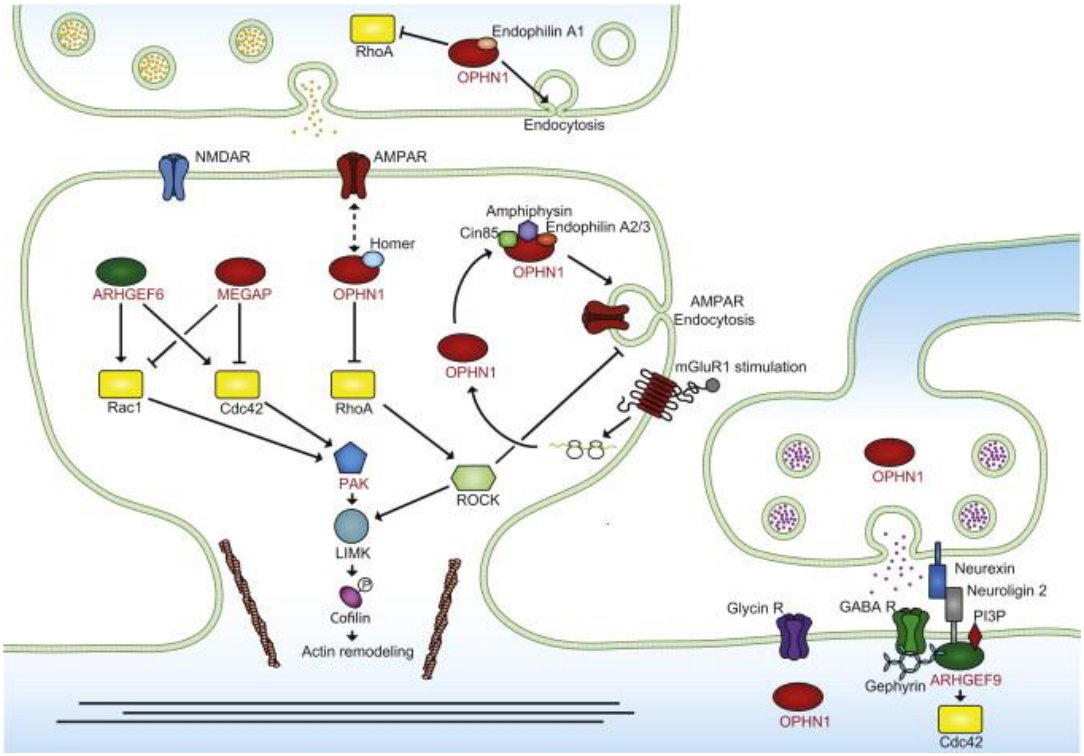


Figure 15 : Voies impliquant les protéines OPHN1, ARHGEF6, MEGAP, ARHGEF9 dans la synapse. Les protéines en rouge sont impliquées dans des cas de DI. (Ba *et al.*, 2013)

C - La voie canonique et non-canonique de Sonic Hedgehog

La voie Sonic Hedgehog (SHH) est une voie de signalisation majeure qui a été mise en évidence chez la drosophile (Ingham *et al.*, 1991), participant au développement embryonnaire par la communication intercellulaire (Carballo *et al.*, 2018). La voie canonique de SHH est initiée lorsque la protéine SHH est libérée via la protéine Dispatched et se lie à son récepteur Patched1 (Ptch1), induisant la suppression de l'inhibition de la protéine membranaire Smoothed (Smo) par Ptch1 (**Figure 16A**). Une fois libérée, Smo induit la transcription des gènes de la famille Gli, des activateurs transcriptionnels de plusieurs gènes impliqués dans les processus de structuration de l'axe corporel, de spécification des voies de différenciation, de prolifération et de migration cellulaire, comme la voie WNT. La voie induit la transcription de Gli1 et Ptch1, afin d'induire un feedback respectivement positif et négatif de la voie (Blotta *et al.*, 2012).

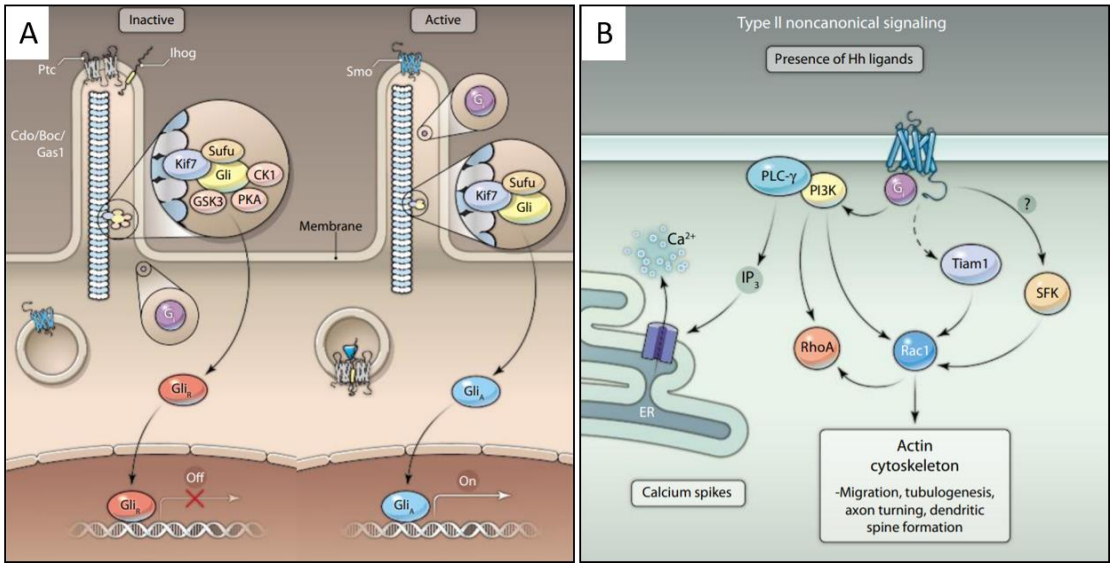


Figure 16 : Représentation schématique des voies de signalisation canonique (A) et non canonique de type II (B) de SHH. (D'après Robbins *et al.*, 2012*)*

Il existe également deux voies connues à ce jour dites non canoniques de Sonic Hedgehog. La voie de type II recourt à l'action de Smo qui induit la libération du Ca^{2+} intraréticulaire dans le cytosol via la voie PI3K (**Figure 16B**), est directement impliquée dans la modulation du cytosquelette lors de la migration cellulaire via RAC1 et RHOA (Polizio *et al.*, 2011), la formation des épines dendritiques en activant RAC1 via TIAM1 (Sasaki *et al.*, 2010), le guidage axonal par les Scr kinases (Robbins *et al.*, 2012). La voie SHH est en effet retrouvée altérée dans les troubles neurodéveloppementaux, psychiatriques et neurodégénératifs, tels les TSA, la dépression, la démence, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la locomotion ainsi que des neuropathies du système nerveux central (Patel *et al.*, 2017).

Chapitre 4 : PTCHD1

I - La famille Patched domain containing proteins (PTCHD)

1 - La protéine Patched

La protéine Patched, codée par le gène *ptc*, est mise en évidence chez *Drosophila melanogaster*, comme l'un des acteurs de l'organisation des segments et des membres antérieurs et postérieurs du corps (Ingham *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1996). Il apparaît que la protéine Patched est une protéine régulatrice de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (SHH), inhibitrice de la protéine Smo, et est elle-même inhibé par SHH. Très conservée parmi les espèces, le gène *ptc* est présent une fois chez *D. melanogaster* et dupliqué chez les vertébrés et *C. elegans*. Chez l'humain, deux gènes analogues à *Patched* sont retrouvés, *PTCH1* et *PTCH2*. Les mutations dans l'une ou l'autre protéine sont une cause de syndromes de carcinome basocellulaire chez l'homme (Johnson *et al.*, 1996; Smyth, 1999). *PTCH1* et *2* sont par conséquent considérés comme des suppresseurs de tumeur.

Patched est donc un récepteur membranaire composé de 12 domaines transmembranaires dont un domaine de détection de stérols (SSD) (un groupe de cinq domaines transmembranaires qui lient les stérols), 2 boucles extracellulaires et une deuxième région qui englobe cinq domaines transmembranaires supplémentaires près de l'extrémité C-terminale. Chez l'homme, la liaison de PTCH1 et PTCH2 avec SHH est confirmée (Carpenter *et al.*, 1998). La présence de PTCH1 est nécessaire et suffisante pour inhiber Smo et SHH supprime cette inhibition. La région de liaison avec SHH est localisée au niveau d'un motif trouvé sur la 2ème boucle extracellulaire de PTCH1 et PTCH2 (resp. LTKQRLVDADGI et LTTRKLVDREGL), conservé parmi les espèces (Bosanac *et al.*, 2009).

2 - Les homologues à Patched

Des protéines partageant la même structure générale de Patched, un nombre identique ou similaire de domaines transmembranaires et des domaines aux fonctions identiques ont été mises en évidence à travers les espèces et l'évolution. Elles sont rassemblées principalement en cinq familles (Zhong *et al.*, 2014) (**Tableau 4**) :

- Les protéines Patched (PTC/PTCH), qui sont les analogues de la protéine Patched à travers les espèces et qui partagent la même fonction.

- Les protéines Patched-related (PTR), une grande famille ou sont regroupées 24 protéines similaires à Patched, retrouvés notamment chez *C. elegans* (ptc-1 et ptc-3 étant les deux

protéines homologues à Patched retrouvés dans cette espèce) et dont la fonction est soit similaire à Patched, soit impliquée dans d'autres voies, parfois spécifiques aux Nématodes (tels la mue) (Kuwabara *et al.*, 2000; Kuwabara and Labouesse, 2002; Zugasti *et al.*, 2005).

- Les protéines Dispatched (DISP), rassemblant toutes les protéines analogues à la protéine Dispached à travers les espèces, et partageant la même fonction.

- Les protéines Niemann-Pick C (NPC1 et NPC1L1). Les mutations invalidantes du gène *NPC1* provoque la maladie de Niemann-Pick de type C, une lipidose lysosomale provoquant un syndrome plus ou moins létal associant principalement une neurodégénérescence et une hépatosplénomégalie (augmentation du volume du foie et de la rate) (Vanier, 2010).

- Les protéines Patched domain-containing (PTCHD), qui sont définies comme structurellement similaires à Patched, retrouvables dans de nombreuses espèces, mais dont la fonction est différente ou méconnue. La famille PTCHD est officiellement composée de quatre membres: PTCHD1, DISP3 (PTCHD2), PTCHD3 et PTCH53 (PTCHD4).

Nom	Locus	Transcrit (bp)	Protéine (aa)	Domaines TM	Exons	Distribution dans les tissus	Localisation subcellulaire	Inclus dans la voie SHH ?	Ligand	Présence d'un motif de liaison aux domaines PDZ	Site de liaison au SHH (Bosanac *et al.*, 2009)
PTCHD1 (Marshall et al. 2008; Ung et al. 2018)	Xp22.11	12883	888 (101 Da)	12	3	Cerveau (Hpc, Cx, Cv, Th)	Membrane plasmique, synapses (PSD)	NON	inconnu	présent	absent (Ung *et al.*, 2018)
DISP3 (PTCHD2) (Katoh and Katoh, 2005)	1p36.22	5265	1392	12	21	Cerveau (Hpc, Cv, rétine), testicules	Réticulum endoplasmique, noyau	inconnu	Probablement cholestérol	absent	absent
PTCHD3 (Fan *et al.*, 2007)	10p12.1	2528	767	8	4	Testicules	Pièce intermédiaire de la queue du spermatozoïde, Réticulum endoplasmique	inconnu	inconnu	absent	absent
PTCH53 (PTCHD4) (Chung *et al.*, 2014; Ivkov and Bunz, 2015)	6p12.3	2850	846	12	3	Cerveau (cellules de Purkinje and couche granulaire externe)	Plasma membrane	OUI (?) (Chung et al. 2014)	inconnu	présent	absent
PTCH1 (Johnson *et al.*, 1996)	9q22.32	8057	1447	12	24	Tout tissu	Membrane plasmique, noyau	OUI	SHH, IHH, DHH	absent	présent
PTCH2 (Smyth, 1999)	1p34.1	4410	1203	12	22	Peau, spermatocytes (souris) (Carpenter et al. 1998)	Membrane plasmique	OUI	SHH, IHH, DHH	absent	présent
DISP1 (Burke *et al.*, 1999)	1q41	4762	1524	12	8	Tout tissu	Membrane plasmique	OUI	Cholestérol (et Cholesterol-modified HH)	absent	absent
DISP2 (Ma et al. 2002)	15q15.1	12612	1401	12	8	Cerveau (Cv, Cx frontal)	Membrane plasmique (prédit)	OUI	Inconnu (Cholestérol ?)	absent	absent
NPC1 (Carstea *et al.*, 1997)	18q11.2	4760	1278	13	25	Many tissues	Lysosome, membrane de l'endosome tardif, membrane plasmique, noyau	NON	Cholestérol	absent	absent
NPC1L1 (Davies *et al.*, 2000)	7p13	5048	1359	13	20	Tout tissu	Membrane plasmique, membrane vésiculaire	NON	Cholestérol	absent	absent

Tableau 4 : Résumé des caractéristiques de la famille de protéines PTCHD, PTCH and NPC, issues de la littérature et de bases de données (Uniprot, Ensembl, OMIM, Human Protein Atlas). Hpc : Hippocampe, Cv : Cervelet, Cx : Cortex, Th : Thalamus, TM : transmembranaire

La famille PTCHD a été récemment mise en évidence en raison de l'implication de ses membres dans les physiopathologies comme les tumeurs, la DI ou les TSA. Des découvertes récentes montrent PTCHD1 comme un membre important des protéines de la densité post-synaptique (PSD) (Wells *et al.*, 2016; Ung *et al.*, 2018) ou PTCHD4 comme effecteur direct du suppresseur de tumeur p53 (Chung *et al.*, 2014), bien que la fonction de ces protéines ne soit pas encore définie.

Comme Patched, les protéines de la famille PTCHD possèdent 12 à 13 domaines transmembranaires (TM), avec cinq de ces domaines constituant un domaine de détection de stérols de 180 acides aminés (Carstea *et al.*, 1997), initialement identifiées chez la drosophile. Ils sont retrouvés dans toutes les espèces et leurs rôles semblent être conservés chez les espèces d'invertébrés et de vertébrés (Zhong *et al.*, 2014) (**Figure 17**).

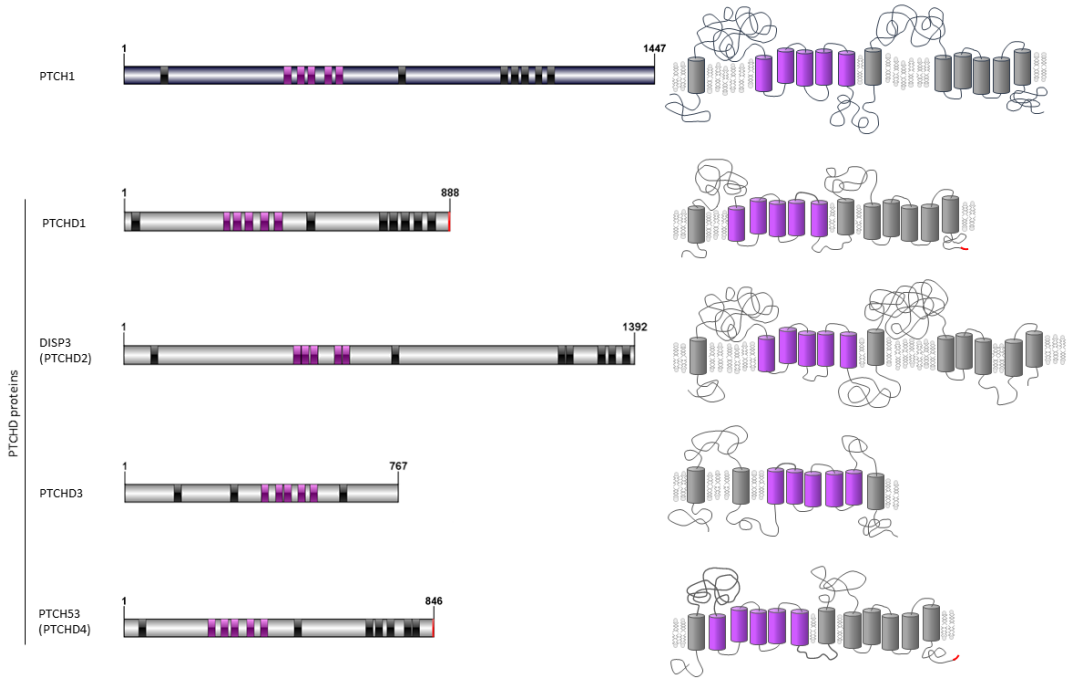


Figure 17. Représentations schématiques de PTCH1 et des protéines des familles PTCHD : PTCHD1, DISP3 (PTCHD2), PTCHD3 et PTCH53 (PTCHD4). Les domaines transmembranaires (TM) sont représentés par des cônes gris, les domaines TM impliqués dans le domaine de détection des stérols (SSD) par des cônes roses et les motifs de domaine de liaison PDZ prédits sont en rouge.

A - DISP3 (PTCHD2)

PTCHD2 est mise en évidence en 2000 sous la désignation KIAA1337 (Nagase *et al.*, 2000), puis caractérisé en 2004 par Katoh et Katoh et renommé Dispatched 3 (DISP3), en raison de deux domaines homologues de type DISP entre PTCHD2 et DISP, DISPH1 (452-637) et DISPH2 (1116-1319) (Katoh and Katoh, 2005). Cette protéine serait finalement plutôt un membre de la famille DISP, analogue à la protéine Dispatched initialement découverte chez *D. melanogaster*, et impliquée dans la libération de la protéine Hedgehog. La région autour des domaines DISPH1 et DISPH2 de la protéine DISP3 correspond à la région homologue à Patched conservée parmi les membres des familles homologues à Patched.

DISP3 est localisé sur le chromosome 1 p36.22 chez l'homme et présente 21 exons. La protéine DISP3 est une protéine contenant 12 domaines transmembranaires. Elle contient les cinq domaines transmembranaires qui définissent le SSD (**Figure 17**). L'ARNm de *DISP3* est exprimé dans les cellules souches embryonnaires humaines, le cerveau et les testicules. Dans le cerveau, DISP3 est exprimée en particulier dans les cellules de Purkinje, les neurones de l'hippocampe et les cellules ganglionnaires et bipolaires rétiniennes (Zikova *et al.*, 2009). Dans ces cellules, DISP3 se trouve sur la membrane du réticulum endoplasmique et du noyau (Zíková *et al.*, 2014).

La fonction DISP3 a été établie comme un modulateur probable de l'homéostasie du cholestérol (Zikova *et al.*, 2009), un facteur de prolifération des progéniteurs neuronaux (Zíková *et al.*, 2014) et un agent de maintien de l'état souche des cellules neurales (Konířová *et al.*, 2017). En effet, DISP3 colocalise avec le cholestérol dans les cellules du rétinoblastome. L'expression ectopique de DISP3 augmente l'absorption du cholestérol non estérifié dans des cultures de fibroblastes embryonnaires de poulet (CEF), qui expriment déjà DISP3 de manière endogène, créent et accumulent des gouttelettes lipidiques à l'intérieur du cytosol de ces cellules. Il existe une version mutante de ces cellules où la région contenant le SSD de DISP3 est manquante où la quantité de cholestérol dans les cellules augmente moins, ce qui suggère que DISP3 est un modulateur de l'homéostasie du cholestérol et que DISP3 se lie probablement au cholestérol via le SSD à l'intérieur des cellules.

La régulation *in vivo* et *in vitro* de DISP3 est contrôlée par l'hormone thyroïdienne T3 (Zikova *et al.*, 2009). La présence de T3 diminue significativement l'expression de DISP3, comme observé dans les cellules rétiniennes du poulet pendant le développement embryonnaire. DISP3 mettrait en évidence un nouveau lien moléculaire entre l'action des hormones thyroïdiennes et le métabolisme du cholestérol dans les tissus neuraux.

Dans les cellules progénitrices neurales, DISP3 favorise également la prolifération cellulaire, l'auto-renouvellement symétrique et altère la différenciation. L'expression de DISP3 est réduite dans les cellules souches neurales différenciées. Les niveaux d’expression de DISP3 sont plus élevés dans les cellules indifférenciées et diminuent considérablement lors de la différenciation (Konířová *et al.*, 2017).

La surexpression ectopique de DISP3 dans les cellules souches neurales favorise la prolifération. Lorsqu'elles sont placées dans des conditions favorisant la différenciation, la surexpression ectopique de DISP3 affecte cette différenciation. Le phénotype cellulaire garde une forme plus proche de celle des cellules souches que de cellules différenciées (neurone, oligodendrocyte, astrocyte) et présente plus de marqueurs de cellules souches et moins de cellules différenciées (Zíková *et al.*, 2014) que les cellules avec une expression endogène de DISP3. Leur taux de prolifération est également plus élevé. La sous-expression de DISP3 montre des effets inverses, c’est-à-dire une diminution de la prolifération et une augmentation du nombre de cellules différenciées par rapport aux cellules témoins.

Ainsi, DISP3 favorise la différenciation cellulaire et le stockage des lipides, et comme la neurogenèse nécessite la synthèse des acides gras dans le cerveau (Yang *et al.*, 2008), il est possible que DISP3 participe à la prolifération en gérant le stockage des lipides.

B - PTCHD3

PTCHD3 est caractérisée en 2007 (Fan *et al.*, 2007) comme étant une protéine spécifique des cellules germinales mâles. Le gène humain *PTCHD3* se trouve sur le chromosome 10p12.1. Les isoformes de PTCHD3 ne sont exprimés que dans les spermatozoïdes, dans la pièce médiane de la queue du spermatozoïde (Fan *et al.*, 2007), sur la membrane du réticulum endoplasmique (Ghahramani Seno *et al.*, 2011).

Dans la protéine PTCHD3 chez la souris, deux isoformes sont mises en évidence; PTCHD3a, la forme courte, composée de seulement 410 acides aminés, et PTCHD3b, la forme longue de 906 acides aminés. La forme courte ne présente que 2 domaines transmembranaires et aucun SSD. On émet l'hypothèse que cette forme peut être un régulateur négatif de la voie où Ptchd3 peut être impliqué. La forme longue possède 10 domaines transmembranaires, dont le SSD représentatif des protéines analogues à Patched.

La protéine PTCHD3 humaine est la protéine PTCHD la plus courte, avec seulement 767 acides aminés et 8 domaines transmembranaires (Uniprot), car le second cluster de 5 domaines transmembranaires habituellement retrouvé chez les autres membres de la famille PTCHD est absent. Cependant, la protéine comprend toujours le SSD.

Chez PTCHD3, la présence du SSD a suggéré, comme toutes les protéines analogues à Patched, qu'une fonction de PTCHD3 est impliquée dans la signalisation SHH, dans ce cas pour réguler le développement ou la fonction des spermatozoïdes, en raison de l'emplacement spécifique de la protéine, dans la partie médiane de la queue des spermatozoïdes, au niveau du réticulum endoplasmique (Fan *et al.*, 2007).

Cependant, il a été mis en évidence plus récemment (Ghahramani Seno *et al.*, 2011) que des CNV homozygotes englobant totalement ou partiellement *PTCHD3* sont retrouvés au sein de la population générale, mais aucun impact particulier sur le phénotype n'est observé, ni concernant le fonctionnement des spermatozoïdes, ni la fertilité. Même si PTCHD3 a une fonction spécifique, d'autres molécules ou voies protéiques semblent compenser cette perte de fonction protéique.

C - PTCH53 (PTCHD4)

Peu de choses ont été écrites sur PTCHD4, mais cette protéine semble être un élément majeur de la stabilité cellulaire. Cette protéine, renommée PTCH53 par Chung et ses collègues (Chung *et al.*, 2014), est décrite comme un analogue de PTCH1 et est directement activée par le suppresseur de tumeur p53. La protéine p53 joue un rôle important dans la stabilité cellulaire en induisant l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose. La transcription de PTCH53 est directement contrôlée par p53. Le motif consensus de liaison à l'ADN AGGCTTGCCC AGGCTTGCCC sur lequel se lie le tétramère p53 (avec la séquence consensus demi-site RRRCWWGYYY) est situé à 42 kb en amont du premier exon de PTCH53, et 22 paires de base après le début de la transcription. Le gène *PTCH53* est situé chez l'homme sur le chromosome 6p12.3.

PTCH53 affiche la même structure prédictive générale de Patched, avec 12 domaines transmembranaires, la présence du SSD, fortement similaire à d'autres protéines associé à Patched. La protéine, d'une longueur de 843 acides aminés, a une structure prédite d'une protéine membranaire, mais elle est détectée par marquage immunofluorescent sur la membrane plasmique mais aussi dans le cytoplasme, probablement sur appareil de Golgi sur réticulum endoplasmique. Il a été constaté que la protéine SHH ne s'y lie pas (Chung *et al.*, 2014).

PTCH53 est localisée dans le cerveau adulte, en particulier à un niveau très élevé dans le cervelet (cellules de Purkinje et couche granulaire externe) chez la souris (Ivkov and Bunz, 2015). Les quatre derniers acides aminés de la région C-terminale de PTCHD4 sont V-T-T-V, ce qui semble être un motif de liaison au domaine PDZ (suivant le modèle général X-T-X-V) (Ung *et al.*, 2018), mais la fonction ou les associés de PTCH53 via ce motif n'ont pas encore été mis en évidence.

PTCH53 est directement inductible par la protéine suppresseur de tumeur p53. Chung et ses collègues ont montré que l'expression de PTCH53 inhibe partiellement la transcription des protéines de la famille Gli. La même conclusion est faite pour PTCHD1, également testé dans cette étude, qui présente le même niveau de répression de l'expression des protéines Gli que PTCH53. Cependant, il a été démontré plus récemment que PTCHD1 n'est pas un répresseur de la voie SHH (Ung *et al.*, 2018). De plus, le knockdown de PTCH53 n'a aucun effet significatif sur l'expression de GLI1 (Chung *et al.*, 2014), et PTCH53 ne se lie pas à la protéine SHH. Ainsi, l'inhibition partielle de la voie SHH par PTCH53 induite par p53 peut être remise en question.

II - Description du gène *PTCHD1* et structure de la protéine

PTCHD1 a été mis en évidence en 2008 par Marshall et ses collègues (Marshall *et al.*, 2008), et ensuite décrit par Noor et al. (2010) comme étant impliquée dans les TSA ou les DI chez les sujets masculins principalement. Le gène *PTCHD1* est situé sur la région p22.11 du chromosome X, la longueur du transcrit est de 62 kb, possède 3 exons et sa traduction conduit à une protéine de 888 acides aminés, pesant 101 kDa (Uniprot, Ensembl). C'est une protéine membranaire, avec 12 domaines transmembranaires, 2 boucles extracellulaires, un SSD, et les queues N-terminale et C-terminale sont intracellulaires (**Figure 18**). Des études récentes (Tora *et al.*, 2017; Ung *et al.*, 2018) ont mis en évidence une fonction dans la queue C-terminale, qui lie les protéines d'échafaudage post-synaptiques PSD95 et DLG3 (SAP102) via un motif de domaine de liaison PDZ au bout de la queue C-terminale. Le motif de liaison du domaine PDZ est constitué de quatre acides aminés en C-terminale avec la séquence consensus X-T-X-V. Les acides aminés de la région C-terminale de PTCHD1 sont I-T-T-V, ce qui correspond au motif consensus.

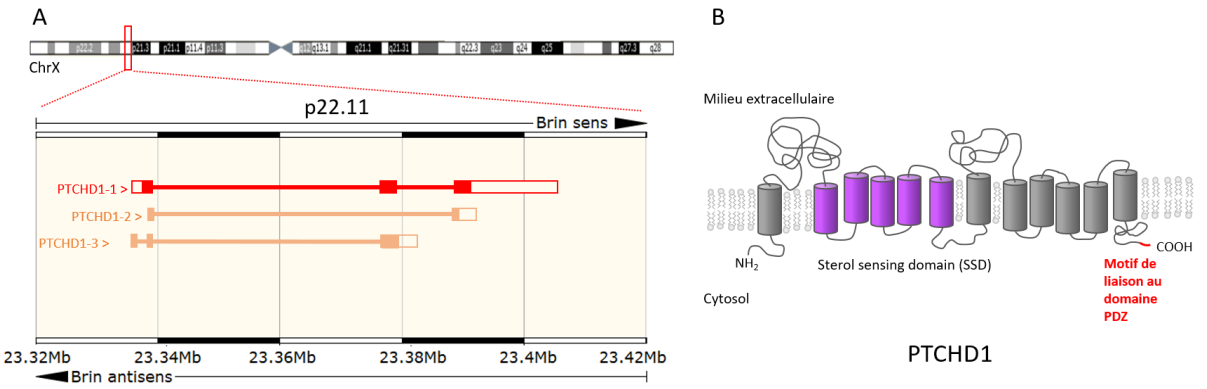


Figure 18 : PTCHD1, gène et protéine. (A). Le gène *PTCHD1* est situé sur le locus p22.11 du chromosome X. Le transcrit (en rouge) présente trois exons et code pour une protéine de 888 acides aminés (B).Représentation schématique de la protéine PTCHD1. Le SSD est représenté par des cônes violets, le motif de liaison au domaine PDZ est surligné en rouge.

PTCHD1 est localisée dans plusieurs régions du cerveau principalement, également dans le foie, le côlon, les reins, les testicules (The Human Protein Atlas (Uhlén *et al.*, 2015), https://www.proteinatlas.org/). Dans le cerveau, au stade périnatal, la protéine est exprimée dans tout le cerveau avec un niveau particulièrement élevé dans la moelle épinière, le cortex, le thalamus et le striatum, puis diminue au cours des jours, sauf dans le cervelet et l'hypothalamus (Ung *et al.*, 2018).

PTCHD1 est présente chez les vertébrés, mais aussi chez les invertébrés, ce qui signifie que la protéine est hautement conservée parmi les espèces. Mais PTCHD1 semble également être relativement plus éloignée évolutivement que les autre protéines PTCH et PTCHD en raison du nombre d'exons beaucoup plus petit qui la compose, sauf de PTCH53 (qui possède 4 exons) (Zhong *et al.*, 2014).

III - Les rôles physiologiques de PTCHD1

La fonction physiologique de PTCHD1 reste encore à élucider, mais plusieurs éléments indiquent qu'elle jouerait un rôle assez important dans la structure des synapses. L'expression principale de PTCHD1 se trouve dans les neurones glutamatergiques (Ung *et al.*, 2018) et les neurones GABAergiques (Wells *et al.*, 2016). Dans les neurones glutamatergiques, la protéine exogène est observée dans la région post-synaptique de la synapse en culture primaire. Son interaction avec deux protéines d'échafaudage post-synaptiques PSD-95 et DLG3 (SAP102) via un motif de domaine de liaison PDZ situé à l'extrémité de la queue intracellulaire C-term (I-T-T-V) a été confirmée expérimentalement (Ung *et al.*, 2018).

Dans le cerveau, PTCHD1 est exprimée au cours des stades embryonnaires et néonataux chez les espèces étudiées (souris (Ung *et al.*, 2018), primates (Bakken *et al.*, 2015)), puis son expression diminue au stade adulte sauf dans les régions cérébelleuses et hypothalamiques, suggérant un rôle important au cours du développement neurologique. Le ligand de ce récepteur prédit est inconnu. Naturellement, Sonic hegdehog (SHH) a été testé, mais PTCHD1 n'inclut pas le site de liaison du ligand SHH qui est présent dans PTCH1 (LTKQRLVDADG, acides aminés 888–898 dans la protéine humaine PTCH1 (NP_032983)) (Bosanac *et al.*, 2009). PTCHD1 n'est pas non plus un répresseur constitutif des protéines de la famille Gli comme PTCH1 (Ung *et al.*, 2018). PTCHD1 pourrait cependant être l'acteur d'une voie SHH non canonique, participant à la synaptogenèse et à la maturation synaptique.

IV - Interactome de PTCHD1

Les études de l'interactome de PTCHD1 se sont penchées sur l'extrémité de la queue cytoplasmique C-terminale de la protéine, en raison de la présence prédite d'un motif de domaine de liaison PDZ à l'extrémité C-terminale de la séquence d'acides aminés, I-T-T-V, correspondant à la séquence consensus du motif de liaison aux domaines PDZ X-T-X-V. Des études fonctionnelles ont en effet mis en évidence l'interaction spécifique avec des protéines contenant un domaine PDZ, comme deux protéines d'échafaudage de densité post-synaptique (PSD), PSD95 et SAP102 (Ung *et al.*, 2018), et une protéine du complexe rétromère, sorting-nexin 27 (SNX27). VPS26B et VPS35, deux autres protéines du complexe rétromère, interagissent avec la queue C-terminale de manière indépendante au motif de liaison aux domaines PDZ. Les protéines ribosomales (RL5, 7, 8, 18A, 27, 31, 32,37, Rpl31) interagissent également avec la queue, mais la spécificité de l'interaction n'est pas prouvée (Tora *et al.*, 2017).

L’interaction de PTCHD1 avec PSD-95 et SAP102 corroborent la localisation subcellulaire de PTCHD1 au sein des épines dendritiques (Ung *et al.*, 2018) validant la présence de PTCHD1 au niveau de la zone active. SNX27, VPS26B et VPS35 sont des protéines du complexe rétromère, impliquées dans la régulation du trafic des protéines dendritiques entre la membrane plasmique et les endosomes, en particulier des récepteurs post-synaptiques au glutamate et des récepteurs β-adrénergiques (Choy *et al.*, 2014), ce qui laissent supposer l’existence d’une régulation dynamique de la présence de PTCHD1 au niveau de la membrane.

L'interaction de PTCHD1 avec ces protéines d'échafaudage et les protéines du complexe rétromère suggère fortement la présence transitoire de PTCHD1 et son recyclage en fonction des différents états fonctionnels de la synapse. Des études restent à mener afin de trouver d'autres interactants impliqués dans une voie de signalisation active, qui serait modulée par le taux de présence de PTCHD1 au niveau de la membrane plasmique de la synapse.

V - PTCHD1 dans la DI et les TSA

Des mutations et des délétions au sein du chromosome Xp22.11 englobant *PTCHD1* et/ou la région en amont de *PTCHD1* ont été signalées chez des patients présentant une DI et des TSA dans plusieurs études (Noor *et al.*, 2010). Les mutations mises en évidence sont héréditaires, essentiellement transmises du coté maternelle, ou *de novo*, et comprennent la délétion d'une partie du gène, une seule substitution nucléotidique ou une perturbation du promoteur du gène (Torrico *et al.*, 2015), conduisant vraisemblablement à une perte de fonction de la protéine. Les troubles induits par les altérations de ce gène s’expriment principalement chez les hommes et pas chez leur mère quand celle-ci est vectrice, laissant supposer un modèle de transmission récessive liée à l’X (Chaudhry *et al.*, 2015).

Les perturbations du gène *PTCHD1* ou de la région en amont sont à l'origine d'un trouble neurodéveloppemental non syndromique lié à l'X. Ce trouble présente des caractéristiques variables de la DI, des TSA ou d’un retard global du développement durant l’enfance (Chaudhry *et al.*, 2015) avec également une hypotonie (en particulier des traits du visage hypotoniques), un manque de coordination motrice, et parfois des caractéristiques dysmorphiques. Certains patients présentent des problèmes comportementaux ou psychiatriques, comme un déficit d'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH), des troubles du sommeil, un comportement agressif ou impulsif. Aucune preuve d'un schéma reconnaissable et significatif d'anomalies congénitales ou de comorbidités médicales graves en association avec des perturbations ou des délétions de ce gène n'a été mise en évidence.

1 - Anomalies structurales retrouvées autour du gène *PTCHD1*

La première délétion au niveau du locus Xp22.11 englobant l'exon 1 de *PTCHD1* a été répertoriée en 2008 (Marshall *et al.*, 2008) lors du criblage génomique d'une de 427 patients atteints de TSA. D'autres CNVs (principalement des délétions) ont été reportées par la suite, et associés à divers TND, principalement les TSA et la DI, également des cas de TDAH et un retard global du développement (RGD), et moins fréquemment, un retard moteur, une apraxie, des troubles de la communication non-verbale (TCNV) et des troubles de l'apprentissage (Noor *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2010, 2010; Filges *et al.*, 2011; Levy *et al.*, 2011; Gambin *et al.*, 2017; Yuen *et al.*, 2017). Il s'agit principalement de perturbations héritées par transmission maternelle, certaines sont apparues *de novo* (**Tableau 5**).

Certains des CNV retrouvés chez des patients atteints de TSA et/ou de DI impliquant la région Xp22.11 ne perturbent pas uniquement le transcrit *PTCHD1*, mais aussi le gène *DDX53*, placé en amont sur le brin sens, ou l'ARN antisens de *PTCHD1*, *PTCHD1-AS*. (**Figure 19**). Parfois, le gène *PTCHD1* n'est d'ailleurs pas du tout impacté (**Tableau 5**).

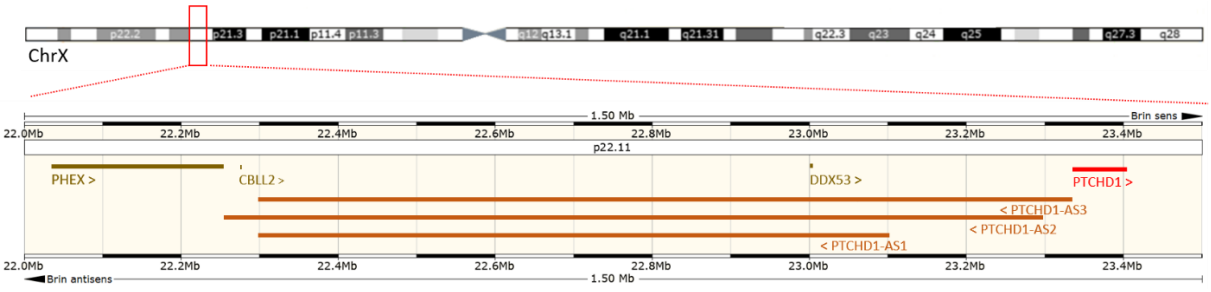


Figure 19 : Représentation du locus Xp22.11 avec la localisation de *PTCHD1*, *PTCHD1-AS* et d'autres gènes, *DDX53*, *PHEX* et *CBLL2*.

Les délétions impliquant *PTCHD1-AS* sans toucher *PTCHD1* ou ses régions promotrices laissent penser que cet ARN antisens aurait également un impact sur l'étiologie des TND, possiblement par une dérégulation de l'expression de PTCHD1 médié par ce transcrit, comme il a été démontré pour l'antisens *IFNG-AS1* du gène *IFNG*, où la perturbation de l'antisens augmente l'expression du gène dans une cohorte d'enfants atteints de TSA (Fallah *et al.*, 2020).

Nom	Localisation (hg 19)	Taille de la délétion	Gènes délétés	Transmission	Pathologies	Références
Perturbations impliquant seulement le transcrit *PTCHD1*						
B1, B2	chrX:23,273,223- 23,470,504	197 kb	PTCHD1	Maternel	RGD, severe DI, TSA	Filges et al., 2011
SK0186	chrX:22,962,800-23,119,000	156,200 kb	PTCHD1	Maternel	TSA	Marshall et al., 2008
D1	chrX:23,237,006- 23,383,352	146 kb	PTCHD1 (exon 1)	Maternel	RGD modérée	Chaudhry et al., 2015
E1	chrX:23,110,934-23,411,163	300 kb	PTCHD1	Maternel	RGD modérée	Chaudhry et al., 2015
G1, G2	chrX:23,204,258 23,371,802	167 kb	PTCHD1 (exon 1)	Maternel	RGD, TSA, TDAH, troubles de l'apprentissage	Chaudhry et al., 2015
I1/DECIPHER-267889	chrX:23,331,184- 23,604,246	273 kb	PTCHD1	Maternel	Retard moteur	Chaudhry et al., 2015
J1	chrX:23,164,422- 23,576,232	412 kb	PTCHD1	*De novo*	RGD, TSA	Chaudhry et al., 2015
N1	chrX:23,364,923-23,411,134	46 kb	PTCHD1 (exons 2 and 3)	Maternel	RGD, DI	Chaudhry et al., 2015
	chrX:23,146,927-23,293,273,	146 kb	PTCHD1 upstream sequence PTCHD1 exon 1	Maternel	DI	Noor et al., 2010
Pt2	chrX:23,395,713-23,487,393	91,680 kb	PTCHD1 (exons 2 et 3)	Inconnu	TND/DI	Gambin et al., 2017
5240_4	chrX:23,116,188-23,280,628	164,441 kb	PTCHD1	Maternel	TSA	Pinto et al., 2010
Perturbations impliquant la séquence *PTCHD1* en amont, pas de perturbations du transcrit						
3253_4	chrX:22,860,224-	47,231 kb	PTCHD1 upstream sequence	Maternel	TSA	Pinto et al., 2010
3424_3	chrX:23,013,250-	102,939 kb	PTCHD1 upstream sequence	Maternel	TSA	Pinto et al., 2010
7-0222-003	chrX:22790722-22816821	26,099 kb	PTCHD1 upstream sequence		TSA	Yuen et al., 2017
2-1244-003	chrX:23211582-23217541	5,959 kb	PTCHD1 upstream sequence		TSA	Yuen et al., 2017
1-0623-003	chrX:23222241-23235001	12,760 kb	PTCHD1 upstream sequence		TSA	Yuen et al., 2017
Perturbations impliquant le transcript de *DDX53* ou *PTCHD1AS* uniquement						
5298_3	(hg18)ChrX:22,892,380-23,013,494	121,114 kb	PTCHD1 upstream sequence, DDX53	*De novo*	TSA, retard moteur	Pinto et al., 2010
13047_563	(hg18)ChrX:22,829,183-23,214,712	385,529 kb	PTCHD1 upstream sequence, DDX53	Maternel	TSA	Pinto et al., 2010
8273	ChrX:22,989,332-23,091,080	101,749 kb	PTCHD1 upstream sequence, DDX53	Maternel	TSA	Noor et al., 2010

	chrX:22,859,294-22,924,136	65,843 kb	PTCHD1AS1	Maternel	TSA	Noor et al., 2010
Perturbations impliquant plusieurs transcrits						
5240	chrX:23,114,179-23,281,723 + 57,512 kb deletion of upstream sequence of IQCA1 gene on 2q37.2	167,543 kb	PTCHD1, PTCHD1AS2/3	Maternel	TSA, TDAH, troubles de l'apprentissage	Noor et al., 2010
Pt1	chrX: 23,269,452-23,364,920	95,468 kb	PTCHD1, PTCHD1AS	Maternel	TSA, DI, TDAH	Gambin et al.,2017
Pt3	chrX: 23,140,737-23,360,470	224,183 kb	PTCHD1, PTCHD1AS	Inconnu	TSA-like, DI, TDAH	Gambin et al., 2017
F1,F2,F3	chrX:23,329,008-23,329,210	90,203 kb	PTCHD1, PTCHD1AS2/3	Maternel	DI, RGD	Noor et al., 2010
5298	chrX:22,890,415-23,015,667	125,253 kb + 113,827 kb deletion on 14q21.3	PTCHD1AS1-3, DDX53	Maternel	TSA, DI, apraxie	Noor et al., 2010
13047	chrX:22,826,477-23,215,032	388,556 kb + 1,160,000 kb deletion involving on 1q44	PTCHD1AS1-3, DDX53 + AHCTF1, TFB2M, LOC149134, SCCPDH, SMYD3, C1orf71	Maternel	TSA	Noor et al., 2010
	(hg18)chrX:22,819,116-22,931,588	112 kb	PTCHD1AS1, DDX53	Maternel	DI	Noor et al., 2010
3387	chrX:22,824,496-23,037,508	213,013 kb	PTCHD1AS1-3, DDX53	Maternel	TSA	Noor et al., 2010
1-27075	chrX: 22,678,814-23,066,819	388,006 kb	PTCHD1AS1-3, DDX53	Maternel	TSA, TDAH, TCNV	Noor et al., 2010
C1,C2	chrX:22,561,238-23,362,476	801 kb	PTCHD1 (exon 1), DDX53	Maternel	RGD, DI modérée, TSA	Chaudhry et al., 2015
H1	chrX:22,960,743- 23,463,337	503 kb	PTCHD1, DDX53	Maternel	RGD	Chaudhry et al., 2015
K1	chrX:22,686,771- 23,354,655	643 kb	PTCHD1 (exon 1), DDX53	Maternel	TSA	Chaudhry et al., 2015
M1	chrX:22,395,639- 23,358,413	963 kb + 654 kb deletion at 1q21.2	PTCHD1 (exon 1), DDX53	Maternel	TSA, retard développemental	Chaudhry et al., 2015
5111	chrX:22,841,534-22,900,490	58,957 kb + 66,250 kb deletion on 18q22.2	PTCHD1AS1	Maternel	TSA, TDAH	Noor et al., 2010
3424	chrX:23,011,719-23,116,212	104,494 kb + 38,889 kb deletion on 5q21.1	DDX53	Maternel	TSA, DI	Noor et al., 2010
5065	chrX:22,859,294-22,924,136	67,843 kb + 60,579 kb deletion on 1p36.13	PTCHD1AS1 PAD2, SDHB et ATP13A2	Maternel	TSA	Noor et al., 2010
3253	chrX:22,853,977-22,908,345	54,367 kb + 129,235 kb deletion on 5p14.3	PTCHD1AS1	Maternel	TSA, DI légère	Noor et al., 2010

L1	chrX:23,196,328- 23,525,343	329 kb + 1,1 Mb duplication at 16p13.11	PTCHD1	Maternel	RGD, DI, TSA	Chaudhry et al., 2015
1-0779-003	chrX:22664319-23830421	1,166,102 kb	PTCHD1 PTCHD1AS DDX53		TSA	Yuen et al., 2017
1-0767-003	chrX:22914695-23073090	158,395 kb	PTCHD1AS DDX53		TSA	Yuen et al., 2017
1-0107-003	chrX:22918867-23075147	156,280 kb	PTCHD1AS DDX53		TSA	Yuen et al., 2017
12561.p1	chrX:22944530-23212135	267,605 kb	PTCHD1 upstream sequence DDX53		TSA	Levy et al., 2011

Tableau 5 : Liste des anomalies structurales impliquant *PTCHD1, PTCHD1-AS, DDX53* retrouvés dans la littérature et et associés à des TND (Troubles du neurodéveloppement). DI : déficience intellectuelle, RGD : Retard global de développement, TCNV : Troubles de la communication non verbale, TDAH : Troubles déficitaires de l'attention avec hyperactivité, TSA : Troubles du spectre autistique.

2 - Les SNV retrouvés au sein de la région transcrite de PTCHD1

Bien que des CNV perturbent des régions englobant plus que le gène *PTCHD1*, les études ont mis en évidence des SNV provoquant des mutations ponctuelles au sein de la région codante de *PTCHD1* qui ont été retrouvés chez des patients atteints de TND, hérités du côté maternel ou *de novo*.

Dans les bases de données, SFARI répertorient les CNV et SNP associés à des TSA issus de la littérature (Noor *et al.*, 2010; DDDS, 2015; Karaca *et al.*, 2015; Torrico *et al.*, 2015; Doan *et al.*, 2016), et ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) (Landrum *et al.*, 2020) répertorie les variants retrouvés dans la littérature, d'études GWAS et WGS, et indique leur niveau de pathogénicité, alors que gnomAD v2.1.1 (https://gnomad.broadinstitute.org/) (Karczewski *et al.*, 2020) répertorie les mutations retrouvées dans toute la population générale, présentant une pathologie ou n'en présentant pas. Les mutations concernant PTCHD1 sont reportées dans le **Tableau 6**.

Le nombre de mutations faux-sens au sein de la région codante susceptibles d'induire un TND (SFARI, ClinVar), ainsi que celui de variations présentes dans la population générale (gnomAD) suggèreraient que le gène PTCHD1 serait relativement intolérant aux changements faux-sens. En effet, 238 mutations faux-sens sont répertoriées au sein de la population générale alors le nombre de mutations faux-sens calculés pour cette protéine est 342, donnant un Z score égal à 2.

Base de données	Mutations faux-sens	Mutations non-sens	Mutations décalantes (insertions /délétions)	Mutations introniques	Mutations dans les régions d'épissage
SFARI (associés au TSA)	10	1	4	1	nd
ClinVar (pathogénicité suggérée)	23	4	7	1	1
gnomAD (population générale)	238	5	1	58	5

Tableau 6 : Classification des mutations ponctuelles du transcrit de PTCHD1 référencées dans les bases de données SFARI, ClinVar et gnomAD.

Contrairement aux mutations non-sens, les insertions et les délétions décalantes, ainsi que les mutations touchant les régions promotrices ou d'épissage, les conséquences des mutations faux-sens sont plus variées. Responsables d'un changement de la séquence protéique, ces mutations peuvent affecter la stabilité, la maturation de la protéine, l'adressage intracellulaire, son assemblage dans une structure multimérique, les sites importants pour l'activité enzymatique ou encore les interactions fonctionnelles avec des ligands et d'autres protéines ou alors être sans conséquences. Il est alors important de distinguer une variation délétère d'un simple polymorphisme dans l'étude de PTCHD1, à l'aide de modèles physiopathologiques.

VI - Modèles physiopathologiques du gène *PTCHD1*

1 - Modèle animal de souris invalidées pour le gène *Ptchd1*

Des lignées de souris dont le gène *Ptchd1* est inactivé chez les mâles (*Ptchd1*$^{-/y}$) ou chez les femelles (*Ptchd1*$^{-/-}$) ont été créées à partir de lignées C57BL/6N, dans l'objectif d'étudier le rôle neurodéveloppemental de la protéine, les impacts structurels et comportementaux de sa suppression (Tora *et al.*, 2017; Ung *et al.*, 2018). Une autre équipe a développé une lignée de souris conditionnelle floxée avec le système Cre-lox inactivant PTCHD1 dans le noyau réticulaire thalamique (NRT), une région composée de neurones à parvalbumine GABAergiques, qui contrôlent la transmission thalamo-corticale, les rythmes du sommeil et de l'attention, dans le but de déterminer quelles anomalies comportementales sont causées par un dysfonctionnement du NRT (Wells *et al.*, 2016).

Dans le cerveau de souris, l'ARNm de *Ptchd1* est exprimé dans les régions dérivées du mésencéphale, de la moelle épinière, du pons, de la moelle, du thalamus et de l'hypothalamus à partir du stade embryonnaire E13, puis atteint les niveaux les plus élevés à E17-E18 et diminuent jusqu'à 7 jours après la naissance (Ung *et al.*, 2018). Dans les 15 premiers jours postnataux, PTCHD1 est principalement exprimé dans le NRT (Wells *et al.*, 2016), puis dans l'hypothalamus, le cervelet et l'hippocampe à l'âge adulte. Le marquage de PTCHD1 par immunocoloration montre également une présence diffuse de la protéine à travers le cortex et le striatum (Wells *et al.*, 2016; Ung *et al.*, 2018).

Le comportement des souris *Ptchd1* KO complet a montré des dysfonctionnements cognitifs, des handicaps moteurs tels que l'hypotonie et l'hyperactivité, une altération de la mémoire à court et long terme (Tora *et al.*, 2017; Ung *et al.*, 2018) et des perturbations du sommeil (Wells *et al.*, 2016). Les souris mâles *Ptchd1*$^{-/y}$ affichent également moins d'anxiété et une augmentation de la consommation alimentaire, contrairement aux femelles *Ptchd1*$^{-/-}$ (Ung *et al.*, 2018). L'inactivation de PTCHD1 dans les neurones à parvalbumine GABAergiques (chez le KO conditionnel du NRT) n'induit que des déficits de l'attention et une hyperactivité, deux symptômes principalement associés à un modèle souris de troubles déficitaires de l'attention avec hyperactivité (TDAH), mais aucune autre altération du phénotype trouvée chez les souris KO complet (Wells *et al.*, 2016).

La perte de *Ptchd1* entraîne un TND provoquant un dysfonctionnement des synapses excitatrices globales et des synapses excitatrices et inhibitrices du gyrus denté. Chez les souris *Ptchd1*$^{-/y}$, au niveau des boutons synaptiques, l'épaisseur de la densité post-synaptique est plus mince et la région présynaptique montre une forte accumulation de vésicules de neurotransmetteurs. L'activité synaptique excitatrice neuronale dans l'hippocampe affiche une diminution significative de la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs miniatures (mCPSE) chez *Ptchd1*$^{-/y}$ par rapport aux souris WT. Dans les cellules granuleuses du gyrus denté, où l'expression de PTCHD1 est la plus élevée au sein de l'hippocampe, le rapport excitation / inhibition est profondément inférieur à l'activité neuronale des souris WT, même si les activités excitatrices et inhibitrices présentent une augmentation de la fréquence des événements spontanés (Tora *et al.*, 2017).

Les enregistrements électrophysiologiques chez les souris KO durant leur sommeil ont également montré une réduction globale du nombre de fuseaux du sommeil générés (déclenchement en rafales d'activité oscillatoire entre 12 et 14 Hz), tout comme les souris KO NRT-conditionnel. La délétion de PTCHD1 atténue l'activité du NRT en réduisant l'activité des courants des canaux SK potassiques calcium-dépendant (Cueni *et al.*, 2008). Le phénotype est sauvé grâce à un modulateur positif allostérique des canaux pharmacologiques SK, le 1-éthyl-benzimidazolinone (1-EBIO), mais ce traitement s'est avéré inefficace sur des souris KO complet (Wells *et al.*, 2016). Suite à cette étude, Nakajima *et al.* s'est concentré sur les perceptions auditives chez les souris KO complètes et a trouvé des perturbations dans deux mécanismes neuronaux distincts, les perceptions auditives automatiques

trouvées dans le TRN auditif, sauvé avec 1-EBIO comme dans les résultats de l'équipe Wells, et le circuit exécutif, qui dépend du cortex préfrontal (PFC), lui-même dépendant de l'inhibition thalamique médiodorsale, et qui est sauvé par le modafinil, un stimulant déjà utilisé dans les troubles liés aux PFC (Nakajima *et al.*, 2019).

De plus, la prolifération dépendante de la voie SHH, le maintien des précurseurs neuronaux dans le cervelet en développement ou le gyrus denté postnatal n'est pas affecté par le manque de *Ptchd1* chez les souris KO, alors que ces mécanismes sont affectés par l'absence de *Patched1* (Tora et al. 2017).

2 - Modèles cellulaires

Des modèles cellulaires pour l'étude PTCHD1 ont été produits à partir de modèles de souris, d'embryons de souris *Ptchd1* KO et des souris sauvages de la même portée. Le gène *Ptchd1* a été également surexprimé ectopiquement dans les neurones hippocampiques de souris ou dans des lignées cellulaires immortalisées. Ces modèles sont utilisés pour les études de localisation subcellulaire et d'interactome. Afin de détecter PTCHD1, en l'absence d'un anticorps efficace (bien que récemment Tora *et al.* aient proposé le leur (Tora *et al.*, 2017)), les transcrits *Ptchd1* sont intégrés dans des plasmides contenant de la GFP. Les cultures primaires de neurones hippocampiques dérivés de souris *Ptchd1* KO ont mis en évidence des altérations structurelles des neurones, comme une diminution de la longueur et du branchement dendritique (Ung *et al.*, 2018). L'expression ectopique de PTCHD1 dans des lignées cellulaires (COS7, SK-N-SH, HEK) qui n'ont pas d'expression endogène de PTCHD1, montre que la protéine est principalement adressée à la membrane plasmique. Dans les neurones, la protéine fusionnée à la GFP se trouve principalement dans les synapses au niveau de la PSD (Noor *et al.*, 2010; Ung *et al.*, 2018).

La construction de protéines de fusion a également été réalisée afin d'étudier des régions spécifiques de la protéine, comme la queue C-terminale. Comme PTCHD1 est une protéine principalement exprimée dans la région post-synaptique et la queue C-terminale intracellulaire contient un motif de liaison aux domaines PDZ (Ung *et al.*, 2018), il serait tout à fait probable que des interactions avec d'autres protéines s'y réalisent, et ces interactions pourraient suggérer la fonction de la protéine dans la synapse et l'inclure dans une voie de signalisation. Jusqu'à présent, deux équipes ont découvert indépendamment l'interaction entre PTCHD1 et deux protéines d'échafaudage de la densité post-synaptique, PSD-95 et SAP102 via leurs domaines PDZ, qui a été confirmée *in situ* par immunofluorescence (Tora *et al.*, 2017; Ung *et al.*, 2018), ainsi que l'interaction entre PTCHD1 et 3 protéines du complexe rétromère, SNX27, VPS26B et VPS35 (Tora *et al.*, 2017). L'ensemble de ces interactions permettent de suggérer la présence transitoire de PTCHD1 au niveau de la zone active, à l'instar des autres récepteurs de la région post-synaptique (**Figure 20**).

De nombreuses microdélétions du locus *PTCHD1* associées aux TSA ont été détectées dans la région en amont, ce qui conduit à examiner l'impact de l'ARN non-codant *PTCHD1-AS* (situé sur le brin antisens à *PTCHD1*) dans ces modèles. Des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) dérivées de patients atteints de TSA associés à des perturbations de *PTCHD1-AS* ont été récemment réalisées (Ross *et al.*, 2020). Les patients dont les cellules ont été reprogrammées présentent des perturbations affectant *PTCHD1-AS / PTCHD1*, *PTCHD1-AS / DDX53* ou *PTCHD1-AS* seul. Les neurones dérivés de ces iPSC présentent une fréquence réduite de mCPSE et des altérations de la fonction des récepteurs au NDMA. L'inactivation ciblée de l'exon 3 de *PTCHD1-AS* par édition du génome induit des neurones présentant les mêmes symptômes sans affecter la transcription du gène codant *PTCHD1*. Cette étude met en évidence l'importance des ARN antisens sur la fonction neuronale et dans l'étiologie des TSA et la DI, comme l'ont montré les études autour des ARN antisens de *SHANK2* et *SYNGAP1*, où l'expression du gène et de leur antisens était retrouvée déséquilibrée. (Velmeshev *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2019).

L'ensemble de ces données démontrent que PTCHD1 est donc un élément essentiel de la signalisation post-synaptique, impliqués dans divers mécanismes neuronaux du développement embryonnaire neuronal, dans la transmission et la plasticité synaptique et le cycle circadien.

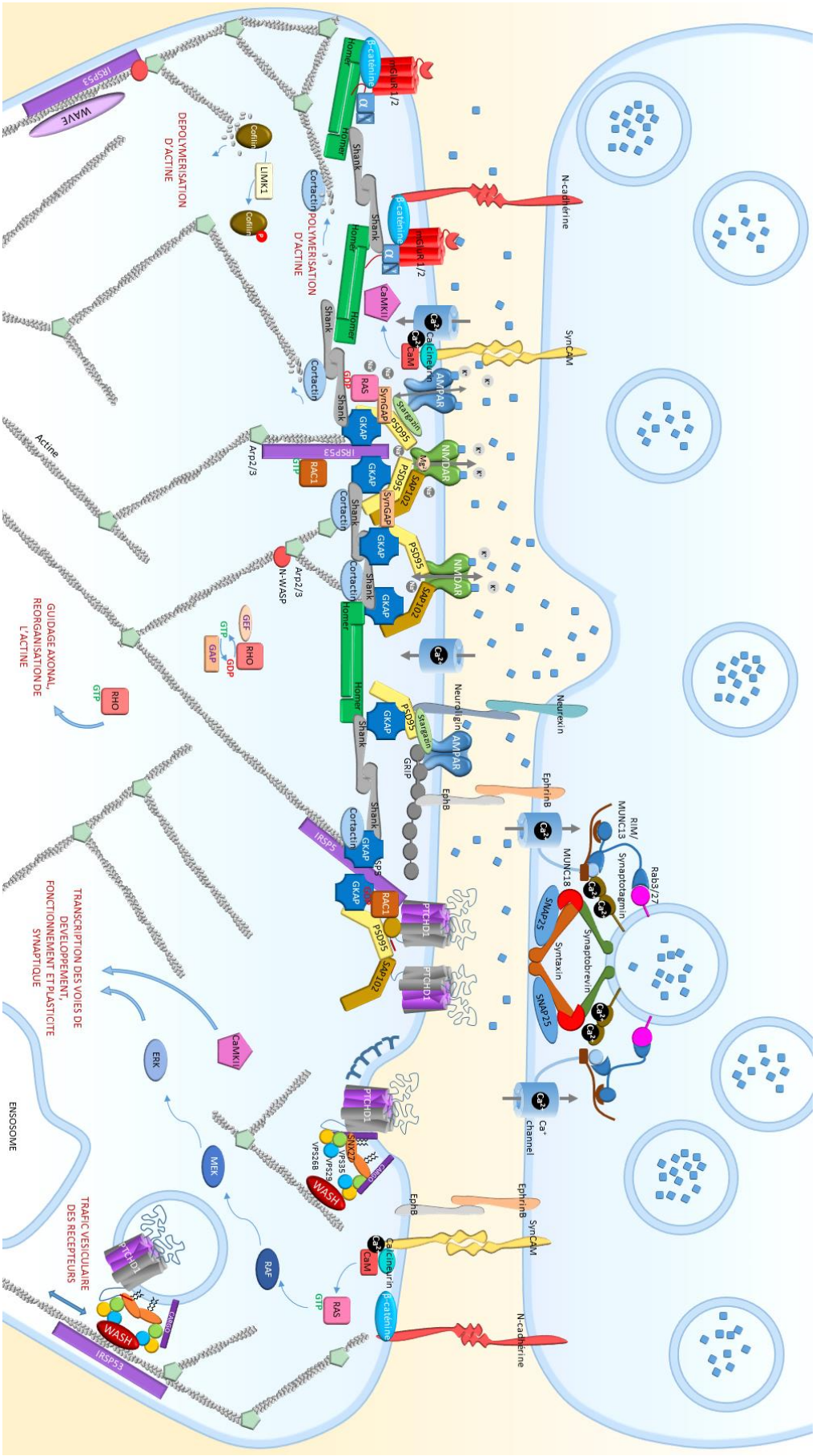


Figure 20 : Schéma de l'architecture post-synaptique des synapses glutamatergiques, avec l'inclusion théorique de PTCHD1 d'après la littérature, en fonction de l'ensemble des études d'interaction et de localisation subcellulaire de PTCHD1

Objectifs de la thèse

Les recherches sur les caractéristiques génétiques des troubles neurodéveloppementaux ont mis en évidence l'importance de gènes impliqués dans la synaptogenèse. Au sein de notre équipe, les recherches menées sur le gène *PTCHD1*, retrouvé perturbé chez des patients atteints de DI et de TSA, a montré une expression importante de la protéine dans l'ensemble du cerveau au stade périnatal, et plus spécifiquement au niveau des épines dendritiques, ainsi que son interaction avec PSD-95 et DLG3 via un motif de liaison au domaine PDZ (I-T-T-V). Des résultats non publiés ont aussi démontré l'interaction de PTCHD1 avec la protéine RAC1, et celle-ci est indépendante de la présence du motif. RAC1 étant impliqué dans des voies de développement des neurites et des synapses, ces découvertes semblent toutes indiquer le rôle possible de PTCHD1 dans le développement des dendrites.

L'objectif de ma thèse a donc résidé à caractériser la fonction physiologique et physiopathologique de la protéine PTCHD1 au niveau de la cellule. Dans un premier temps, j'ai cherché à spécifier l'interaction de PTCHD1 avec la protéine RAC1 au niveau de la queue C-terminale, puis j'ai essayé de caractériser un anticorps élaboré par *Agrobio* contre PTCHD1 afin de pouvoir détecter la protéine endogène dans des tissus cérébraux. Enfin, j'ai caractérisé dans différents modèles cellulaires l'impact physiopathologique de 13 mutations ponctuelles faux-sens de PTCHD1 retrouvées chez des patients atteints de DI et/ou de TSA.

Travaux de thèse

Partie 1

Caractérisation de l'interaction de la queue intracellulaire de PTCHD1 avec la protéine RAC1

I - Contexte scientifique

A la suite des recherches du Dr Dévina Ung au sein de notre équipe présentées dans ses travaux de thèse, de nouveaux partenaires protéiques ont été mis en évidence ; les deux protéines de l'échafaudage post-synaptique PSD-95 et SAP102, présentés dans l'article *Ptchd1 deficiency induces excitatory synaptic and cognitive dysfunctions in mouse*, paru dans *Molecular Psychiatry* en 2018, qui ont confirmé, au-delà de sa présence, l'implication effective de PTCHD1 au sein de la densité post-synaptique, mais également la protéine RAC1. RAC1 est une RhoGTPase impliquée dans la régulation du cytosquelette dans de nombreuses voies, le cycle cellulaire et l'apoptose (Heasman and Ridley, 2008). Au sein des neurones, il joue un rôle dans la morphogenèse des neurites et des épines dendritiques, participe à la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe et participe à l'apprentissage spatial dépendant de l'hippocampe (Haditsch *et al.*, 2009; Bongmba *et al.*, 2011).

En effet, dans l'objectif de mettre en évidence les interactants avec PTCHD1 pour déterminer une voie de signalisation au sein de la synapse, des études de protéomique se sont concentrées sur la queue C-terminale de PTCHD1. Des études de GST pull-down ont été réalisées à partir de constructions fusionnant la GST et la queue C-terminale. Elles ont été incubées dans un lysat protéique de cerveau de souris adulte, puis l'éluat récupéré a été analysé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Parmi les protéines détectées, 17 protéines ont été sélectionnées comme partenaires potentiels (ou avérés, car DLG3 y est retrouvé) de PTCHD1, dont RAC1.

Les expériences de GST pull down ont été réitérées avec l'ajout d'une condition, la GST couplée à une queue C-terminale tronquée de ses quatre derniers acides aminés (ITTV) représentant le motif de liaison aux domaines PDZ. L'éluat de chaque condition a été analysé par Western-blot en conditions SDS-PAGE, puis incubé avec un anticorps anti-RAC1 (**Figure 21**), démontrant la présence de la protéine RAC1 dans l'éluat contenant les protéines qui se sont fixées à la queue C-terminale complète, mais également dans celui de la queue sans le motif ITTV. En parallèle, les observations de la localisation subcellulaire de PTCHD1 et de RAC1 au sein de cultures primaires de neurones de souris ont montré une colocalisation des deux protéines au niveau des épines dendritiques.

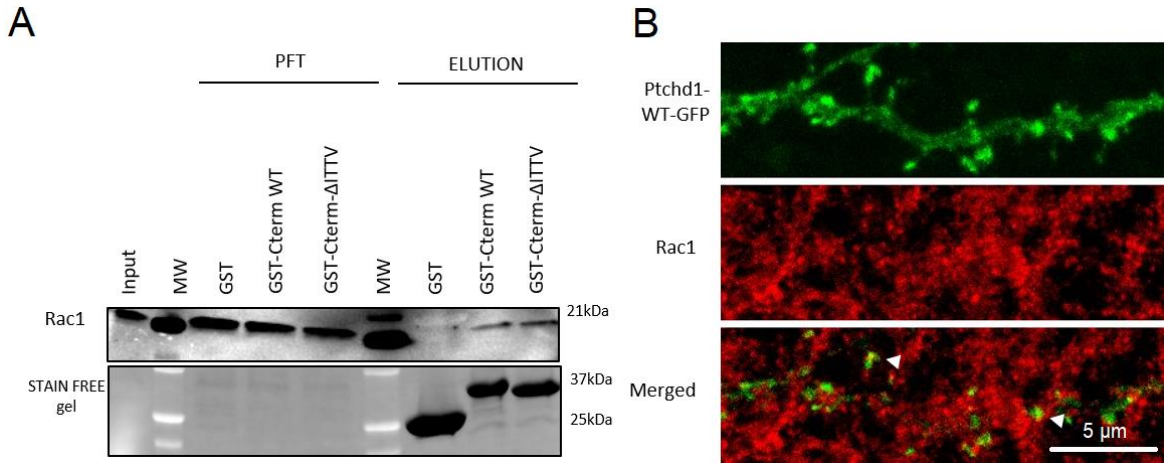


Figure 21 : Détection de la protéine RAC1 comme partenaire protéique de PTCHD1. (A) Révélation de la présence de RAC1 dans l'éluat GST-pull down. PFT : Prey Flow Through, lysat protéique récupéré après l'incubation. Le stain free gel (Biorad) permet la révélation des protéines totales contenues dans le gel (B) Image en microscopie confocale de la colocalisation entre PTCHD1-WT-GFP (vert) et RAC1 (rouge) au niveau des épines dendritiques d'un neurone hippocampique mature Les flèches blanches indique les zones de colocalisation de la protéine. D'après le mémoire de thèse de Dévina Ung (2017)

Ainsi RAC1 se lie certes à la queue C-terminale mais indépendamment du motif de liaison aux domaines PDZ, ce qui n'est pas surprenant étant donné que la protéine ne possède pas de domaines PDZ (De *et al.*, 2020). De plus, dans l'hypothèse où la liaison aux domaines PDZ permet d'ancrer la protéine dans la zone active de la région post-synaptique, nous pouvons supposer que la présence d'une interaction protéine-protéine à un autre niveau de la queue C-terminale serait liée à une fonction d'effecteur au sein d'une voie de signalisation, dans des configurations similaires à d'autres récepteurs synaptiques.

La queue C-terminale de PTCHD1 est composée de 39 acides aminés, de la position 850 à 888 sur la protéine entière. Par souci de clarté, ils seront numérotés de 1 à 39 dans la suite de ce mémoire.



Figure 22 : Séquence protéique de la queue C-terminale de PTCHD1. En jaune, les lysines de la région 4 à 11 de la queue C-terminale, en rouge, le motif de liaison aux domaines PDZ. La numérotation des acides aminés est en fonction de leur position au sein de la protéine entière (en violet) ou de la queue C-terminale uniquement.

L'observation de cette séquence (**Figure 22**) met en évidence une région particulière ; la région des acides aminés en position 4 à 11 présentant un enrichissement en lysine, des acides aminées positivement chargés. Or la présence importante d'un acide aminé spécifique et possédant des propriétés physico-chimiques non neutres au sein d'une région est habituellement impliquée dans les interactions intraprotéiques, nécessaires au repliement protéique, ou interprotéiques, qui concernent les interactions entre les protéines.

Afin d'étudier cette région dans l'interaction avec RAC1, différentes variations de sa séquence ont été élaborées (**Figure 23**). Tout d'abord la séquence de la queue C-terminale entière dite sauvage (Ptchd1CterWT) composée des 39 acides aminés, puis trois séquences tronquées en C-terminale, Ptchd1CterΔ12_39, Ptchd1CterΔ17_39, et Ptchd1CterΔ36_39 (ou Ptchd1CterΔITTV) composées respectivement des 11 , 16 et 35 premiers acides aminés de la séquence protéique, ainsi une séquence entière dont les acides aminés 4 à 11 ont été remplacés par des alanines (Ptchd1CterΔ4_11InsAla4_11).



Figure 23 : Constructions de la queue C-terminale intracellulaire de Ptchd1. En gris, les alanines remplaçant la région 4 à 11 sur la construction Ptchd1CterΔ4_11InsAla4_11.

Les choix de modifications ont été décidés en fonction de nos régions d'intérêt, la forme WT et la forme GST vide étant respectivement des contrôles positifs et négatifs. La construction Ptchd1CterΔ36_39 (ou Ptchd1CterΔITTV) permet bien évidemment d'expérimenter l'impact du motif ITTV de liaison aux domaines PDZ, afin de confirmer les résultats déjà obtenus qui indiquent que RAC1 n'interagit pas avec ce motif. Ptchd1CterΔ12_39 et Ptchd1CterΔ17_39 sont deux raccourcissements successifs conservant toujours la région riche en lysine, étudiant ainsi l'impact des acides aminés 12 à 35.

La construction Ptchd1CterΔ4_11InsAla4_11 annule les propriétés physico-chimiques de cette région en la remplaçant par des acides aminées aliphatiques et apolaires tout en conservant la longueur de la séquence C-terminale intracellulaire de PTCHD1. Cette insertion-délétion induit très probablement un impact sur la conformation de la queue intracellulaire, en plus d'une perte d'interaction au niveau de

cette région. De plus, Ptchd1CterΔ4_11InsAla4_11 permet la conservation des autres acides aminés en prohibant seulement la région riche en lysine, ce qui n'était pas réalisable avec les séquences tronquées.

Ces séquences ont ensuite été couplées à la protéine GST en N-terminale de la séquence, à l'instar des expérimentations de Dévina Ung, afin d'être testées avec la technique du GST pull-down. Le principe de cette technique repose sur l'affinité de la GST (Glutathion S-transférase) avec le glutathion, une molécule biologique impliquée dans le maintien du potentiel redox du cytoplasme, dont l'oxydation et la réduction sont catalysées par la GST (Udomsinprasert *et al.*, 2005). Lors du GST pull-down, le glutathion, fixé sur une résine, se lie à la GST couplé à la protéine d'intérêt (ici la séquence intracellulaire C-terminale de PTCHD1), et un lysat protéique contenant les protéines susceptibles de se fixer à la région d'intérêt. Après des lavages et une élution du complexe, les protéines qui se sont fixées ainsi que la protéine fusion de la GST sont récupérées pour analyse (**Figure 24**).

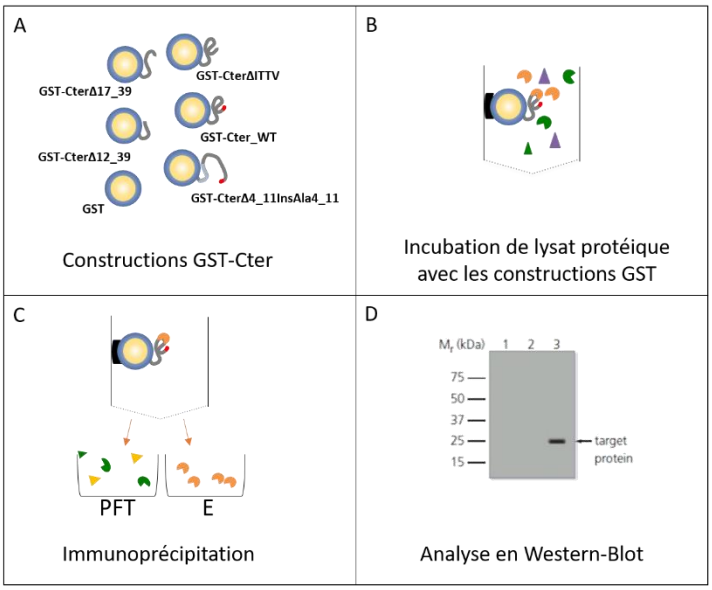


Figure 24 : Etapes du protocole de l'immunoprécipitation par GST pull-down. (A) Génération des constructions GST-PTCHD1Cter. (B) GST pull-down : incubation sur la nuit d'un lysat protéique issu de cerveau de souris adulte. (C) Récupération du lysat après l'incubation (PFT : Prey Flow Through) et de l'éluat (E) (protéines s'étant fixées sur la queue C-terminale). (D) Détection de RAC1 par immunoblot.

Ainsi, en ciblant spécifiquement la protéine RAC1 parmi les protéines récupérées en fonction des différentes constructions, nous pourrons déterminer quelle région est impliquée dans l'interaction entre PTCHD1 et RAC1.

II - Matériels et méthodes

Constructions plasmidiques des différentes protéines-fusion GST-Ptchd1Cter

Les constructions plasmidiques fusionnant la GST et des différentes séquences de la queue C-terminale entière ont été générées à partir de l'amplification de régions spécifiques au sein des 156 derniers nucléotides composant la queue C-terminale de l'ADNc de souris *Ptchd1* du clone 40095445 d'IMAGE cDNA (Source BioScience, Nottingham, Royaume-Uni) pour le Ptchd1Cter_WT, sachant que les 39 derniers acides aminés de la séquence murine et humaine sont parfaitement identiques (Uniprot). A partir de la séquence nucléotidique de Ptchd1Cter_WT, les autres séquence ont été générées par mutagenèse dirigée en insérant ou en délétant des acides nucléiques induisant des codons de terminaison remplaçant les codons formant l'asparagine 12 (Asn861 sur la séquence entière de PTCHD1) pour Ptchd1CterΔ12_39, l'acide glutamique 17 (Glu866) pour Ptchd1CterΔ17_39, et l'isoleucine 36 (Ile885) pour Ptchd1ΔITTV. De la même manière, la mutagenèse dirigée a permis la substitution des acides aminés de la queue C-terminale entre les positions 4 à 11 par des alanines pour le Ptchd1CterΔ4_11InsAla4_11.

Les produits de PCR ont été tous clonés dans pGEX-4T1 (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France), contenant le gène de la GST en amont de nos séquences. Le pGEX-4T1 vide a été également utilisé comme contrôle négatif. Les clones ont été vérifiés par séquençage Sanger.

Sélection d'un temps d'induction

Afin de sélectionner une temps d'induction optimale de la surexpression des protéines-fusions GST-PTCHD1Cter, les plasmides pGEX-4T1, pGEX-4T1-Ptchd1CterWT, pGEX-4T1-Ptchd1CterΔ12_39, pGEX-4T1-Ptchd1CterΔ17_39, pGEX-4T1-Ptchd1ΔITTV et pGEX-4T1-Ptchd1CterΔ4_11InsAla4_11 ont été exprimés dans des bactéries compétentes Escherichia coli BL-21 Lys (Fisher Scientific, Illkirch, France) après transformation bactérienne par choc thermique à 42°C pendant 30 secondes. Les bactéries ayant intégré le plasmide sont sélectionnées et amplifiées dans du milieu SOC Outgrowth Medium (B9020S, Biolabs) avec 1% d'ampicilline pendant 30 min puis dans du LB (Invitrogen) avec 1% d'ampicilline pendant une nuit.

La culture a été repiquée dans 10 ml de milieu LB neuf avec 1% d'ampicilline. La densité optique (DO) a ensuite été contrôlée toutes les 30 minutes par le spectrophotomètre Nanodrop 2000 (Thermo-Scientific) réglé à une longueur d'onde de 600 nm. Quand celle-ci est entre 0,8 et 1, qui est estimé pour correspondre à une concentration en bactéries adéquate par les protocoles, celle-ci est

séparée en deux et 24 µL d'IPTG à 1mM est ajouté dans le milieu d'une des conditions, et le premier prélèvement de chaque tube est effectué (T0). Des échantillons de culture bactérienne sont ensuite prélevés à 1h, 2h, 3h, 4h, 5h et 24h après l'ajout d'IPTG avant d'être lysés au B-Per (78243, Thermo-Scientific) avec 1% d'inhibiteur de protéases (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail 100X, EDTA-Free, 1861278, Thermo-Scientific) et 2% de DNase I (89836, Thermo-Scientific).

Les échantillons ont été déposés sur un gel de polyacrylamide Stain-Free (4-20% Stain Free Mini protean TGX Gel, 456-8094/6, Bio-Rad®) en conditions SDS-PAGE et ont migré à 180 V pendant 1 heure. Les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie (Fisher Scientific) ainsi que révélées avec la méthode Stain-Free par l'imageur Chemidoc Touch (Bio-Rad®), une méthode permettant la révélation des protéines totales contenues dans le gel en réagissant avec les tryptophanes des protéines.

GST pull-down

Les plasmides pGEX-4T1, pGEX-4T1-Ptchd1CterWT, pGEX-4T1-Ptchd1CterΔ12_39, pGEX-4T1-Ptchd1CterΔ17_39, pGEX-4T1-Ptchd1CterΔITTV et pGEX-4T1-Ptchd1CterΔ4_11InsAla4_11 ont été exprimés dans des bactéries compétentes Escherichia coli BL-21 Lys (Fisher Scientific, Illkirch, France) après transformation bactérienne comme expliqué précédemment. Cependant, la lyse des bactéries a été réalisé 4h après l'ajout d'IPTG par un agent d'extraction inclus dans le kit pour les tests de GST pull-down, le kit Pierce® GST Protein Interaction Pull-Down kit (21516, Fisher Scientific). Les protéines issues de la lyse bactérienne ont été incubées pendant 30 minutes afin d'être immobilisées par affinité sur une résine de glutathion (Appât). Les protéines de fusion GST immobilisées ont été incubées pendant une nuit à 4° C avec des lysats protéiques synaptoneurosomaux extraits de cortex de souris WT C57BL/6 adultes (Proie) (Janvier labs, St-Berthevin, France) par l'utilisation du réactif d'extraction Syn-PER (87793, Fisher Scientific). Le lysat synaptoneurosomal a été récupéré après l'incubation (Prey Flow Through), le complexe glutathion-GST-PTCHDCter avec les protéines fixées est lavée 5 fois avant d'être élué avec un tampon contenant 10 nM de glutathion à pH 8.

Révélation du GST pull-down par western-blot

Les échantillons ont été traités par électrophorèse en conditions SDS-PAGE à 180 V pendant 1 heure. Le contrôle du niveau d'expression des protéines a été réalisé par détection Stain-Free. Les gels SDS-PAGE ont été transférés sur une membrane PVDF en utilisant TransBlot Turbo (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) pendant 3 minutes suivant les conditions du fabricant. Un blocage de la membrane a été réalisé pendant 1 heure avec du lait dilué à 5% dans du TBS-Tween (TBS, BP2471-1, Fisher Scientific® avec 0,05% de Tween 20, P1379-500ML, Sigma-Aldrich®). Les anticorps primaires anti-GST (souris, monoclonal, 8-326, MA4-004, Fisher Scientific, 1/1000), et anti-RAC1 (souris,

monoclonal, BD Transduction Laboratories™ ,1/1000) ont été incubés pendant une nuit dans du tampon TBST avec du lait à 5%. Après 3 lavages de 5 minutes au TBST, les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires correspondants couplés à l'HRP (chèvre anti-souris, référence W402B, Promega, Charbonnières-les-bains, France, 1/2500) pendant 45 minutes à température ambiante. La révélation de la membrane par chimiluminescence a été effectuée en utilisant le kit Clarity Western ECL (Cat#1705061, Bio-Rad®) sur l'appareil ChemiDoc Touch (Bio-Rad®).

III - Résultats

Détection de l'interaction entre la queue C-terminale de PTCHD1 et RAC1 en GST pull-down

Dans un premier temps, nous avons cherché à sélectionner un temps d'induction optimal de l'expression protéique des protéines fusions GST-PTCHD1-Cter après le déclenchement de la transcription des différents plasmides pGEX-4T1-Ptchd1Cter. En effet, celle-ci est induite par l'IPTG, afin que la surexpression des protéines-fusion GST-Cter ne n'interfère pas dans la croissance et la survie des bactéries transformées. Les prélèvements ont été réalisés juste après l'introduction d'IPTG dans le milieu (T0), puis à 1h (T1), 2h (T2), 3h (T3), 4h (T4) et 24h (T24). Les bactéries ont été conservées à -20°C avant d'être lysées, et leurs protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.

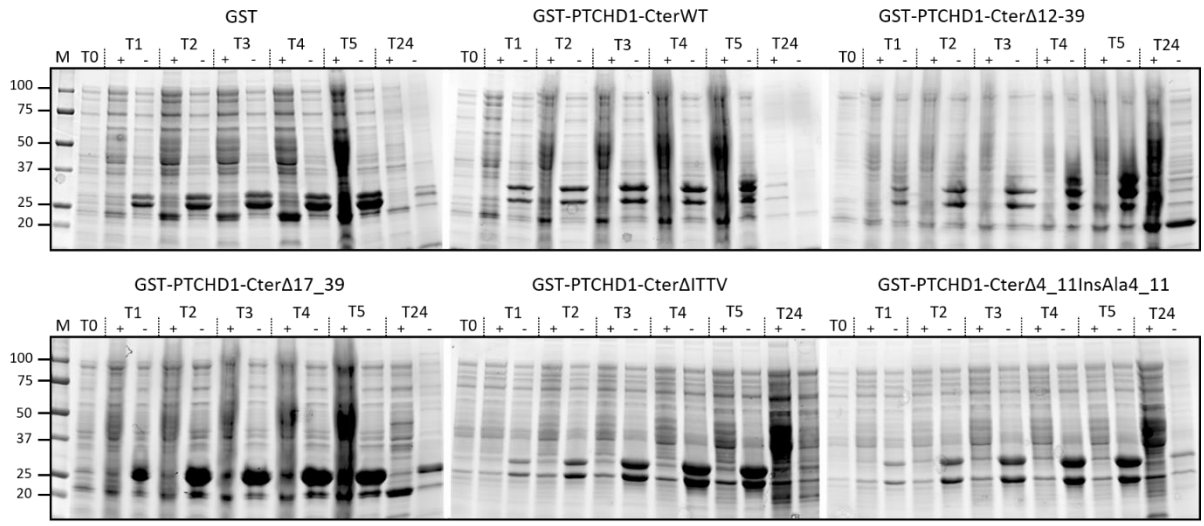


Figure 25 : Détection des protéines totale sur les gels par la méthode Stain-Free. La présence de la GST est détectable entre 25 et 37 kDa en fonction de la construction. M : Marqueur de masse moléculaire.

Parmi l'ensemble des protéines révélées par la méthode Stain Free (**Figure 25**), le signal correspondant à la protéine-fusion, dont le poids moléculaire varie entre 26 kDa (pour la GST seule) à 30 kDa (quand la GST est fusionnée avec les formes à 39 acides aminés), se distingue nettement entre 37 et 25 kDa, avec une augmentation progressive de son intensité pour les protéines issues des cultures avec IPTG en fonction de la durée de l'induction jusqu'à 5h, suivi d'un ralentissement de cette progression à partir de 4h. Le signal protéique des puits issus des cultures sans IPTG reste constant dans le temps, notamment entre 37 et 25 kDa. A 24h, le signal de la protéine GST est nettement réduit dans les puits avec IPTG.

Pour la suite de nos expériences, une induction de 4h par l'IPTG a donc été sélectionnée. La culture bactérienne transformée par les différents plasmides a ensuite été directement lysée par un tampon intégré dans le kit de GST pull-down. Les protéines qui se sont fixées au complexe GST-Cter et qui ont été récupérées après élution (éluats, E) ainsi que les lysats synaptoneurosomaux récupérés après incubation des expériences de pull-down (Prey Flow Through, PFT), ont été déposés sur un gel d'électrophorèse. Après la migration, la quantité de protéines a été contrôlée par Stain Free, puis les échantillons ont été analysés par immunoblot sur une membrane de PVDF grâce à un anticorps ciblant RAC1. La présence des protéines-fusions dans l'éluat et leur taille relative ont également été contrôlées par l'utilisation d'un anticorps anti-GST. Un échantillon du lysat protéique synaptoneurosomal de souris (Proie) conservé avant l'expérience et dilué au 1/20 a été également testé (Input) comme contrôle (**Figure 26**).

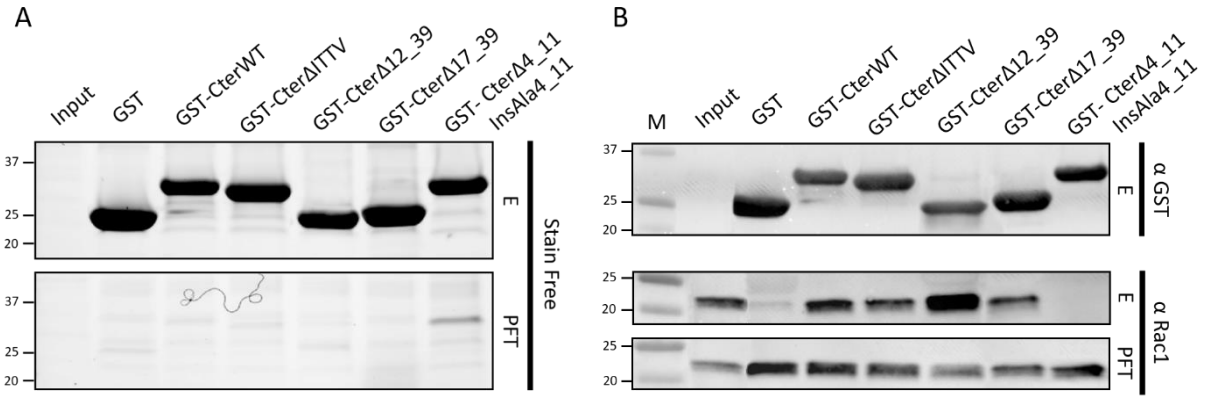


Figure 26 : Révélation de la protéine RAC1 dans les éluats et PFT après GST pull-down. (A) : Stain-Free des gels des éluats et PFT après migration afin de contrôler la présence et la quantité des protéines. (B) Immunoblot anti-GST et anti-RAC1 et des éluats et PFT. **Input** : lysat protéique synaptoneurosomal issu de cortex de souris C56BL/6 adultes avant les expérimentations ; **E** : éluat, contenant les protéines qui se sont fixées à la queue C-terminale ; **PFT** : Prey Flow Through, le lysat récupéré après passage sur les colonnes de GST, contenant les protéines qui ne se sont pas fixées à la queue C-terminale. (n=3)

La présence d'un signal vers 21 kDa est retrouvée dans les éluats pour le contrôle positif GST-CterWT et dans l'input, mais aussi pour la construction GST-CterΔITTV, soit la queue C-terminale privée du motif de liaison aux domaines PDZ, démontrant une interaction entre RAC1 et la queue C-terminale de PTCHD1 indépendante de ce motif, ce qui concorde avec les résultats précédemment obtenus.

Le signal est également détecté dans les éluats des constructions GST-CterΔ12_39 et GST-CterΔ17_39, et il semble relativement plus intense pour la construction GST-CterΔ12_39. Le signal est absent dans l'éluat de la construction GST-CterΔ4_11InsAla4_11, ainsi que sur le contrôle négatif de la GST seule. La présence de la GST surexprimée dans les éluats aux tailles attendues valide la réussite de nos expérimentations.

Les PFT présentent un signal dans toutes les conditions, résultant des protéines RAC1 résiduelles qui ne se sont pas fixées sur le complexe GST-PTCHD1Cter. Les variations du signal sont trop subtiles pour être comparées, néanmoins, l'affaiblissement du signal semble être plus accentué pour la condition GST-CterΔ12_39, et à l'inverse il est plus intense pour la construction GST seule et GST-CterΔ4_11InsAla4_11.

Les résultats de l'immunoblot anti-RAC1 montrent clairement une conservation de l'interaction entre la queue intracellulaire C-terminale de PTCHD1 et RAC1 malgré la délétion des 28 derniers acides aminés, ce qui signifierait que leur interaction se situe au niveau des 11 premiers acides aminés, sur la région riche en lysine. Cette constatation est confirmée par la perte du signal anti-RAC1 pour la condition GST-CterΔ4_11InsAla4_11, où les acides aminés KKKRKEKK ont été remplacés par des alanines alors que le reste de la séquence est entièrement conservé. De plus, il semblerait que la délétion des 28 derniers acides aminés de la construction de GST-CterΔ12_39 semble augmenter l'efficacité d'interaction entre RAC1 et PTCHD1. Il est possible de la conformation tridimensionnelle de la queue C-terminale entière entrave l'accessibilité au motif riche en lysine.

IV - Résultats supplémentaires

1 - Co-immunoprécipitation entre PTCHD1 et RAC1

Afin de valider définitivement l'interaction entre PTCHD1 et RAC1, des études de co-immunoprécipitation ont été menées. Cette technique permet de mettre en évidence l'interaction *in vitro* entre les protéines sous leur forme entière et native, malgré la présence d'une étiquette à l'une des extrémités de chaque protéine afin de pouvoir être détectées par immunomarquage. C'est pourquoi la protéine PTCHD1 est fusionnée à la GFP au niveau son extrémité C-terminale, tout comme RAC1 est lié à l'étiquette Myc (**Figure 27**).

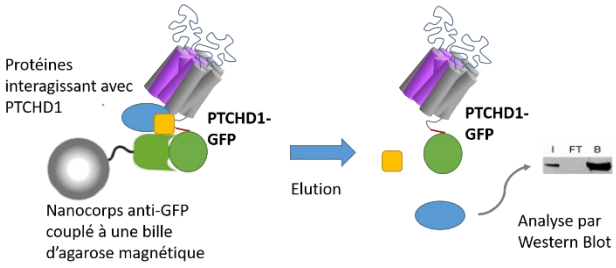


Figure 27 : Le principe de la co-immunoprécipitaition est d'effectuer la capture par immunoprécipitation d'une protéine mais de détecter par western-blot une autre protéine susceptible de se lier à la protéine immunoprécipitée qui serait donc présente dans l'éluat de celle-ci.

RAC1 est présent dans les HEK 293T de manière endogène, contrairement à PTCHD1. L'utilisation de billes avec des nanocorps anti-Myc nous permet ainsi de cibler uniquement la protéine RAC1 surexprimé de manière ectopique.

Matériels et méthodes

Plasmides

La séquence complète de l'ADNc de souris *Ptchd1* a été amplifiée à partir du clone 40095445 d'IMAGE cDNA (Source BioSience, Nottingham, Royaume-Uni) et insérée dans des vecteurs pAcGFP1-N en utilisant la stratégie de clonage In-Fusion (632501, Clontech Laboratories®) afin de générer la protéine PTCHD1 avec étiquette GFP à l'extrémité C-terminale (précédemment décrit dans Ung *et al.*, 2018). Le plasmide pCMV3-RAC1-t1-Myc provient de Sino Biological (HG10535-CM, Beijing, China). Les clones ont été vérifiés par séquençage Sanger.

Culture de lignées cellulaires HEK 293T

Les lignées cellulaires HEK 293T ont été cultivées avec du milieu DMEM (Gibco, réf 31966047), avec 1% de solution de pyruvate de sodium (100 mM, Réf: S8636-100ML, Sigma-Aldrich®), 1% de solution d'acides aminés non essentiels MEM (M7145 -100ML, Sigma-Aldrich®) et 10% de sérum fœtal bovin (SVF) (Eurobio, CVFSVF06-01). Elles ont été repiquées deux fois par semaine par trypsinisation (trypsine 0,25%, Gibco, 25200056).

Transfection

Les cellules HEK 293T ont été soit transfectées par les plasmides pCMV-Ptchd1-GFP (ou pCAG-Ptchd1-GFP) et RAC1-Myc en quantité équivalente ou avec 2 à 3 fois plus de RAC1-Myc que Ptchd1-GFP, soit transfectées avec l'un des deux. Les plasmides et la Lipofectamine 2000 (11668027, Thermo-Scientific) ont été mélangés avec 8 µg d'ADN total pour 16 µL de L2000 dans 500µL de DMEM sans complément. Le mélange de transfection a été ajouté aux cellules et elles ont été incubées pendant 4 heures, puis il a été remplacé par du milieu neuf. Les cellules ont été lysées 48 heures après la transfection par un tampon de lyse intégré dans le kit d'immunoprécipitation avec 1% d'inhibiteurs de protéases (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail 100X, EDTA-Free, 1861278, Thermo-Scientific).

Co-immunoprécipitation

Les co-immunoprécipitations ont été réalisées à l'aide d'un kit de ChromoTek (Munich, Allemagne), qui comprend des billes magnétiques couplées de manière covalentes à des nanocorps anti-GFP (gtmak-20) ou anti-Myc (ytmak-20), qui sont des anticorps à domaine unique créés à partir d'anticorps à chaine lourde de lama. Cette technique permet d'éviter la présence des sous-unités d'IgG dans les éluats.

Les lysats protéiques des trois conditions (PTCHD1-GFP/RAC1-Myc, PTCHD1-GFP et RAC1-Myc) (Proie) ont été incubés soit avec les billes couplés aux nanocorps anti-GFP, soit aux nanocorps anti-Myc, à 4°C pendant la nuit sous agitation. Le lysat PTCHD-GFP/RAC1-Myc a été également incubé avec des billes magnétiques sans nanocorps, utilisés comme contrôle négatif, afin de vérifier l'absence de liaison non spécifique entre les billes et les protéines. Après incubation, les lysats ont été récupérés (Prey Flow Through, PFT) pour analyse. Les billes ont été lavées trois fois avec un tampon de lavage du kit ChromoTek, puis l'élution a été réalisée à l'aide d'une solution d'urée à 8M (17-1319-01, GE Healthcare Life Sciences™) à la place de la solution d'élution du kit, deux fois pendant 15 minutes à 37°C sous agitation.

Analyse par western-blot

Les échantillons ont été traités sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE à 180 V pendant 1 heure. Les gels SDS-PAGE ont été transférés sur une membrane PVDF en utilisant la machine TransBlot Turbo (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) pendant 7 minutes à 25V et 1,3A, qui est le temps nécessaire pour transférer PTCHD1 d'après nos protocoles expérimentaux. Un blocage de la membrane pendant 1 heure avec du lait dilué à 5% dans du TBS-Tween (TBS, BP2471-1, Fisher Scientific® avec 0,05% de Tween 20, P1379-500ML, Sigma-Aldrich®) a été réalisé. Les anticorps primaires anti-GFP (lapin, polyclonal, 632592, Takara Bio®, 1/2000), anti-RAC1 (souris, monoclonal, BD Transduction Laboratories™ ,1/1000) et anti-GAPDH couplés à l'HRP (souri monoclonal, clone 71.1 G9295-20UL Sigma) ont été incubés pendant une nuit dans du tampon TBST avec du lait à 5%. Après 3 lavages de 10 minutes au TBST, les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires correspondants couplés à l'HRP (chèvre anti-lapin, W4018 et chèvre anti-souris, W402B, Promega, Charbonnières-les-bains, France, 1/2500) pendant 45 minutes à température ambiante. La révélation de la membrane par chimiluminescence a été effectuée en utilisant le kit Clarity Western ECL (Cat#1705061, BioRad®) sur l'appareil ChemiDoc Touch (Bio-Rad).

Résultats

Nos analyses en immunoblot ont donné des résultats peu concluants. Nous avons d'abord dû faire face à deux difficultés (**Figure 28**).

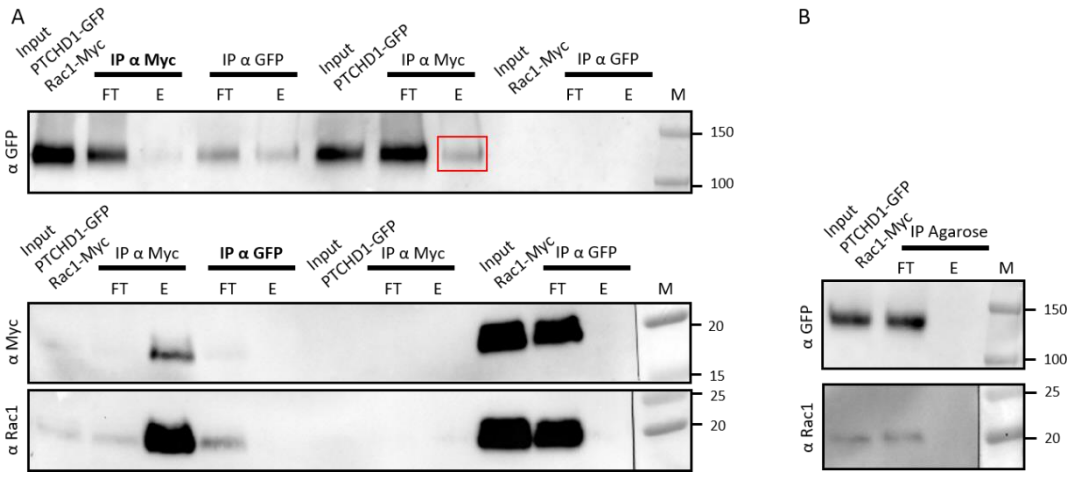


Figure 28 : Co-immunoprécipitation entre PTCHD1-GFP et RAC1-Myc, (A) montrant nos difficultés récurrentes (n=6) face à ce protocole, soit la présence d'un signal de PTCHD1-GFP dans les éluats de l'immunoprécipitation anti-Myc ou le signal très faible de RAC1-Myc dans les inputs. (B) Contrôle de l'absence de signal RAC-Myc et PTCHD1-GFP dans les éluats des billes d'agarose sans nanocorps (Détection anti-Myc absente car signal trop faible).

Tout d'abord la présence d'un signal de PTCHD1-GFP dans l'éluat de l'immunoprécipitation anti-Myc pour les cellules transfectées avec pCMV-Ptchd1-GFP uniquement. Le contrôle avec les billes d'agarose sans nanocorps montre une absence d'interaction non spécifique entre les protéines et les billes d'agarose. Néanmoins, il pourrait s'agir d'une interaction non spécifique entre PTCHD1 et les nanocorps anti-Myc. Etant donné que les billes anti-Myc ne ciblent que RAC1-Myc surexprimé et non le RAC1 endogène des cellules HEK 293T, il ne peut s'agir d'une interaction entre PTCHD1-GFP et et le RAC1 endogène.

Ensuite, la détection de RAC1-Myc par l'anticorps anti-RAC1 est très faible et quasiment indétectable avec l'anticorps anti-Myc, même au sein des inputs (données non montrées). De plus, parmi les inputs, il semble que RAC1 est moins exprimé dans les lysats où il est co-exprimé avec PTCHD1-GFP. A l'inverse, le signal de PTCHD1-GFP semble être équivalent dans les lysats avec ou sans RAC1-Myc.

Nous avons donc vérifié l'efficacité de nos anticorps anti-Myc et anti-RAC1, ainsi que l'expression protéique de pCMV3-RAC1-Myc transfecté seul ou avec pCMV-Ptchd1-GFP ou pCAG-Ptchd1-GFP (un autre plasmide utilisé pour nos transfections neuronales, que nous utilisons pour observer si un changement de promoteur pourrait avoir une influence sur l'expression) avec différents ratio de quantité entre les deux plasmides (**Figure 29**). La protéine GAPDH a été utilisée pour contrôler la quantité de protéines dans chaque puits.

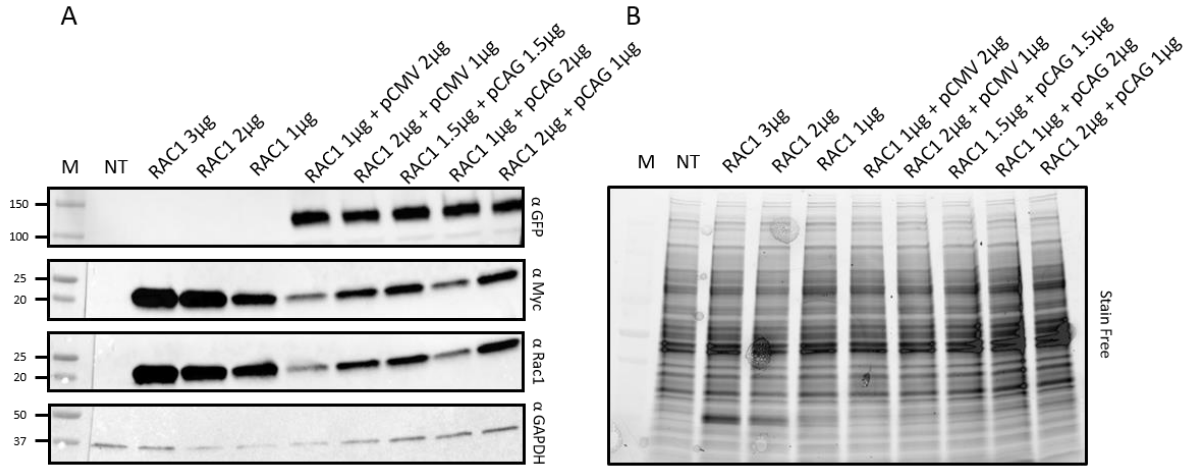


Figure 29 : Evaluation quantitative de RAC1-Myc (A) en fonction de la quantité de plasmides transfecté dans les cellules HEK 293T et de sa co-transfection avec pCMV ou pCAG-Ptchd1-GFP. (B) Révélation de la quantité de protéines totales par la méthode Stain-Free.

L'expression de RAC1 est manifestement diminuée quand il a été co-transfecté avec PTCHD1, quelque soit le promoteur. Nous avons donc décidé d'augmenter progressivement la quantité de plasmide pCMV3-Rac-Myc et de diminuer celle de pCMV-Ptchd1-GFP dans nos co-transfections,

jusqu'à introduire trois plus de plasmide RAC1-Myc que Ptchd1-GFP. Les co-immunoprécipitations suivantes réalisées avec un lysat issus de ces transfections ont permis de pouvoir mieux détecter Rac-Myc avec les deux anticorps, bien que le signal soit toujours faible (**Figure 28**). Cependant, nous ne sommes pas parvenus à trouver une solution pour « effacer » le signal dans l'éluat de l'immunoprécipitation anti-Myc du lysat contenant uniquement PTCHD1-GFP, ce qui invalide la présence de signal PTCHD1-GFP dans l'éluat de la co-immunoprécipitation anti-Myc. Ces deux signaux sont d'ailleurs variables en fonction de nos immunoblots. Cependant, l'interaction ne peut pas être entièrement invalidée, étant donné la présence d'un signal PTCHD1-GFP présent dans le contrôle positif, soit les éluats de l'immunoprécipitation GFP.

Aucun signal RAC1-Myc n'est détecté par immunoblot avec l'anticorps anti-Myc ou anti-RAC1 dans l'éluat de l'immunoprécipitation anti-GFP, alors que le signal est très fort dans l'éluat de l'immunoprécipitation anti-Myc. Le signal de RAC1-Myc dans le lysat (input) et le Flow Through est très faible, mais détectable.

Il nous est donc difficile de conclure sur ces résultats. Les co-immunoprécipitations réalisées ne valident pas l'interaction entre PTCHD1 et RAC1. Il est possible que ce soit dû au matériel expérimental, malgré nos contrôles. L'utilisation d'un autre protocole permettant le couplage entre des billes d'agarose et l'anticorps de notre choix (Kit Dynabeads Protein G, 10007D, Thermo-Scientific) n'a pas été plus concluant, en raison de signaux trop faibles dans nos immunoblots. Il est également possible que la présence de la GFP au niveau de la queue C-terminale interagissant avec les nanocorps empêche l'interaction entre PTCHD1 et RAC1 à cause de l'encombrement stérique, ou que la conformation de PTCHD1 soit perturbée dans les lysats protéiques et s'agrège, étant donné qu'il s'agit d'une protéine membranaire. C'est une limite qui n'était pas présente dans les expériences de GST pull-down, où la présence de la queue C-terminale seule et démunie de GFP mimait d'une certaine manière les conditions cellulaires de PTCHD1. L'utilisation d'un anticorps ciblant spécifiquement PTCHD1 pourrait palier ces limites, c'est pourquoi nous avons cherché à en développer un au sein de l'équipe.

2 - Production et évaluation d'un anticorps anti–PTCHD1

PTCHD1 ne possède pas d'anticorps sur le marché, en raison des difficultés de produire un anticorps sur une protéine possédant de nombreux domaines transmembranaires. Toutes nos expériences jusqu'alors ont été menées avec des plasmides couplés à la GFP en C-terminale. Or la présence de cette étiquette de détection est un perturbateur possible de la conformation de la queue C-terminale et ainsi de ses interactions avec ses partenaires protéiques, comme nous l'avons vu auparavant. Une tentative d'élaboration avait été menée durant les recherches du Dr Dévina Ung, ciblant des régions prédites

immunogènes de PTCHD1 notamment au niveau des boucles extracellulaires et intracellulaires, ainsi que la queue C-terminale. Par des analyses sur immunoblot sur des lysats protéiques de HEK 293T transfectées par Ptchd1-GFP, deux des sérums, qui avaient été générées en ciblant entre autres une région de la queue-C-terminale, détectait la présence d'une bande vers 126 kDa (101 kDa pour PTCHD1 et 25 kDa pour la GFP), mais également des signaux parasites.

L'équipe de Peter Scheiffele a développé également un anticorps publié par Tora *et al.* en 2017. Cet anticorps détectait une bande vers 100/105 kDa uniquement présente dans la fraction post-synaptique (PSD) de lysat de cerveau de souris adultes, soit la taille attendue de PTCHD1, en utilisant un protocole de purification des fractions protéiques synaptiques fondé sur des gradients de concentration en sucrose, du triton-X100 et d'étapes d'ultracentrifugation (Tora *et al.*, 2017). Cette bande n'est plus observable avec les lysats de souris PTCHD1-KO (*Ptchd1*$^{-/y}$).

Cependant la détection de PTCHD1 dans des extraits protéiques est compliquée. Il est supposé que cette protéine est incluse dans des radeaux lipidiques, des régions de la membrane plasmique où sont concentrés des cholestérols, sphingolipides et des acides docosahexaénoïques entourant des certaines protéines membranaires (Wiktorowska-Owczarek *et al.*, 2015), notamment dans la zone active des synapses, comme les protéines du complexe SNARE (Lang, 2007) ou les récepteurs à l'AMPA (Hering *et al.*, 2003).

Nous avons donc réitéré ces expériences en choisissant une immunisation chez le lapin ciblant la queue C-terminale de PTCHD1 à partir des constructions GST-PTCHD1Cter, utilisées également pour le GST pull-down.

Matériels et méthodes

Production d'un anticorps anti-PTCHD1

L'anticorps anti-PTCHD1 a été développé par la société Agrobio, à partir des constructions protéiques GST-PTCHD1Cter. Elles ont été injectées dans trois lapins (225, 226 et 227), puis leur sérum a été prélevé au jour 63 et au jour 77 après inoculation. Des contrôles ont montré la présence d'une réponse immunitaire.

Transfection dans les lignées cellulaires HEK 293T

Les lignées ont été cultivées comme décrit précédemment, tout comme la méthode de transfection. Les plasmides transfectées sont pCAG-Ptchd1-GFP, donc la séquence de Ptchd1 a été clonée dans le pCAG-GFP (#11150, Addgene) Le pCAG-Ptchd1 sans GFP a été généré de pCAG-Ptchd1-GFP par mutagenèse dirigée avec l'insertion d'un codon stop juste après la séquence de Ptchd1. Les cellules ont été lysées 48 heures après la transfection par un tampon de lyse RIPA (89900, Thermo-Scientific) avec 1% d'inhibiteurs de protéase (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail 100X, EDTA-Free, 1861278, Thermo-Scientific).

Purification de la densité post-synaptique et détection de la protéine PTCHD1 dans les tissus neuraux

Dans l'objectif de détecter la protéine PTCHD1 endogène, nous avons constitué des lysats protéiques à partir de cerveaux de souris C57BL/6J adultes frais ou conservés à -80°C. Comme la détection de PTCHD1 sur des lysats réalisés par le kit de purification synaptosomale que nous utilisons habituellement (Syn-Per, ref : 87793, ThermoFisher®) s'est avérée non concluante, notre équipe a utilisé un protocole élaboré par l'équipe du Dr Stéphane Martin (IPMC, CNRS) permettant des purifications successives des régions cellulaires au sein des tissus neuraux, notamment des fractions présynaptiques et post-synaptiques. Une grande partie de ce travail a été réalisée avec l'aide de Jean-Eudes Bavay dans le cadre de son stage de fin d'études en Licence Professionnelle Biologie Analytique et Expérimentale. Ce protocole, par l'utilisation des divers détergents et de sucrose, permet de nous passer de protocoles nécessitant des ultracentrifugations et l'utilisation de gradients de sucrose.

Les tampons ont été réalisés au maximum 24 heures avant le début de la réalisation du protocole. 1% d'inhibiteur de protéase (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail 100X, EDTA-Free, 1861278, Thermo-Scientific) et 1% d'EDTA (0.5 m EDTA Solution 100X, 1861275, Thermoo-Scientific) ont été ajoutés dans chaque tampon juste avant leur utilisation. Les cerveaux ont d'abord été placés dans un premier tampon comprenant du sucrose à 0,32M et 10mM d'Hepes à pH=7,4 fabriqué en conditions stériles. Ils ont été broyés et homogénéisés avec la machine gentle MACS Dissociator (Miltenyi Biotech). L'homogénat a ensuite été passé au sonicateur Covaris M220 Focused-Ultrasonicator (Covaris) configuré aux paramètres recommandés par le fournisseur afin de fractionner divers débris cellulaires et la chromatine pour éviter des contaminations nucléaires. Un échantillon a été prélevé (Input), avant que l'homogénat soit centrifugé 10 minutes à 1000g. Le surnageant (fraction post-nucléaire, PN) est conservé et le culot est resuspendu dans 200µL de tampon « 0,32M sucrose » et centrifugé à nouveau. Après récupération du nouveau surnageant dans la fraction PN, celui-ci est à nouveau centrifugé pendant 6 minutes à 1000g et le surnageant récupéré pour enlever toute contamination nucléaire restante, et un échantillon est récupéré pour analyse.

La fraction PN est centrifugée 20 minutes à 12000g pour séparer le surnageant contenant la fraction cytosolique du culot contenant la fraction synaptosomale. Il est resuspendu dans un tampon à 4mM d'HEPES et 1mM d'EDTA à pH=7,4. Un échantillon est prélevé (fraction synaptosomale, S), puis le culot est lavé deux fois avec le tampon HEPES/EDTA après des phases de centrifugation de 20 minutes à 12000g. Le culot est resuspendu dans un tampon « G-actin » (20mM d'HEPES (pH=7,2) et 100 mM de NaCl) auquel a été ajouté 0,5% de triton-X100. Il est incubé 15 minutes sous agitation à 4°C puis centrifugé 20 minutes à 12000g. Le surnageant est récupéré et est identifié comme la fraction non post-synaptique (NP). Le culot est resuspendu dans un tampon « F-actin » (20mM d'HEPES (ph=7,5), 0,15 mM de NaCl, 1% de triton-X100, 1% d'acide déoxycholique et 1% de SDS) auquel a été ajouté 1mM de dithiothréitol (dTT). Après avoir été agité pendant 1 heure à 4°C, la solution est ensuite centrifugée 15 minutes à 10 000g. Le surnageant récupéré est la fraction post-synaptique (P).

Révélations par immunoblot

Les échantillons ont été traités dans des gels Stain-Free (4-20% Stain Free Mini protean TGX Gel, 456-8094/6, Bio-Rad) en conditions SDS-PAGE, comme décrits précédemment, tout comme le transfert des protéines et le blocage. Les anticorps primaires utilisés sont bien entendus les 6 sérums testés (223, 225 et 226 à J63 et J77) dilués généralement à 1/1000, et également des anticorps anti-VGLUT1 (lapin polyclonal, 135302, Synaptic System, 1/1000), anti-Synaptophysine (souris monoclonal, ab8049, Abcam, 1/500), anti-PSD-95 (souris monoclonal, 7E3-1B8, Invitrogen, 1/1000), anti-GFP (lapin polyclonal, 632592, TaKaRa, 1/1000) et anti-β-actine couplé à l'HRP (A3854-200UL, Sigma-Aldrich®, 1/100000). Ils ont été incubés pendant une nuit dans du tampon TBST avec 5% de lait. Après 3 lavages de 5 minutes au TBST, les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires correspondants couplés à l'HRP (chèvre anti-lapin, W4018 et chèvre anti-souris, W402B, Promega, Charbonnières-les-bains, France, 1/2500) pendant 45 minutes à température ambiante, puis les membranes ont été révélées par chimiluminescence en utilisant le kit Clarity Western ECL (Cat#1705061, BioRad®) sur l'appareil ChemiDoc Touch (Bio-Rad®).

Résultats

Tout d'abord, les sérums de lapin ont été testés sur des lysats protéiques issus de culture de HEK 293T transfectées par les plasmides pCAG-Ptchd1 (sans GFP). Présentant une meilleure réponse immunitaire, les sérums prélevés au jour 63 ont été utilisés comme anticorps primaires sur les membranes de PVDF contenant les protéines des HEK 293T séparés par électrophorèse, puis incubés avec des anticorps secondaires anti-lapin couplés à l'HRP.

La révélation des immunoblots (**Figure 30**) montre tout d'abord que les trois sérums détectent tous bien une bande vers 100 kDa dans les cellules transfectées (T) par PTCHD1 et qui est absente des échantillons non transfectés (NT). Cependant, seul le sérum issu du lapin 225 au jour 63 (225 J63) présente une bande unique à 100 kDa dans les cellules transfectées et aucune bande sur les cellules non transfectées, alors que d'autres signaux apparaissent dans les deux conditions pour les deux autres sérums, à 75 kDa pour le sérum 223 J63 et à 75 kDa et 100 kDa pour le sérum 226 J63. Dans les cellules transfectées par PTCHD1, une bande large est détectée à 250 kDa pour ces deux sérums, mais qui n'est pas détecté par le sérum 225 J63.

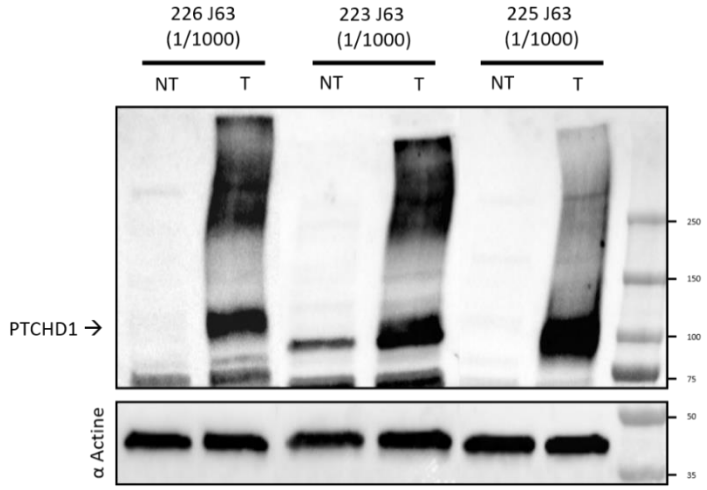


Figure 30 : Evaluation de l'efficacité des sérums au jour 63 sur des cellules HEK 293T transfectées (T) ou non transfectées (NT). La quantité de protéines dans chaque puits a été contrôlée par l'actine. (n = 3)

Afin de contrôler la spécificité du sérum 225 J63, de nouvelles analyses sur des lysats issus de HEK 293T transfectées par pCAG-GFP, pCAG-Ptchd1-GFP ou pCAG-Ptchd1 (**Figure 31**). Après incubation de la membrane soit par le sérum 225 J63, soit par un anticorps anti-GFP, les résultats de la membrane traité par le sérum montre effectivement la présence d'un signal important à 125 kDa pour la condition où les cellules ont été transfectées par pCAG-Ptchd1-GFP et une bande à 100 kDa pour les HEK transfectées par pCAG-Ptchd1. Ces bandes ne sont pas présentes dans les cellules non transfectées ou transfectées avec pCAG-GFP. Des bandes parasites d'intensité plus faible sont cependant présentes dans toutes les conditions, suggérant une spécificité partielle du sérum. La membrane incubée avec l'anticorps anti-GFP montre bien la présence d'un signal correspondant à la GFP à 25 kDa pour les HEK transfectées par pCAG-GFP et une bande à 125 kDa pour celles surexprimant PTCHD1-GFP, correspondant à la taille attendue de la protéine. Ces signaux sont absents pour la condition NT et transfecté par le plasmide contenant PTCHD1 non fusionnée à la GFP.

Le sérum 225 J63 semble donc détecter PTCHD1 de manière quasi-spécifique. Nous avons donc voulu dans un second temps évaluer la capacité de cet anticorps à détecter la protéine PTCHD1 endogène au sein de protéines issues de tissus cérébraux. Nos premiers essais sur des tissus lysés par RIPA ou même plus spécifiquement sur des tissus synaptoneurosomaux n'ont rien donné de concluant. En nous inspirant des expérimentations de l'équipe de Peter Scheiffele et de sa démarche de fractionnement et d'enrichissement de différentes fractions cellulaires, soit bien entendu les fractions autour de la région synaptique, nous avons tenté l'expérience avec un autre protocole élaboré par l'équipe du Dr Stéphane Martin sur des cerveaux de souris adultes.

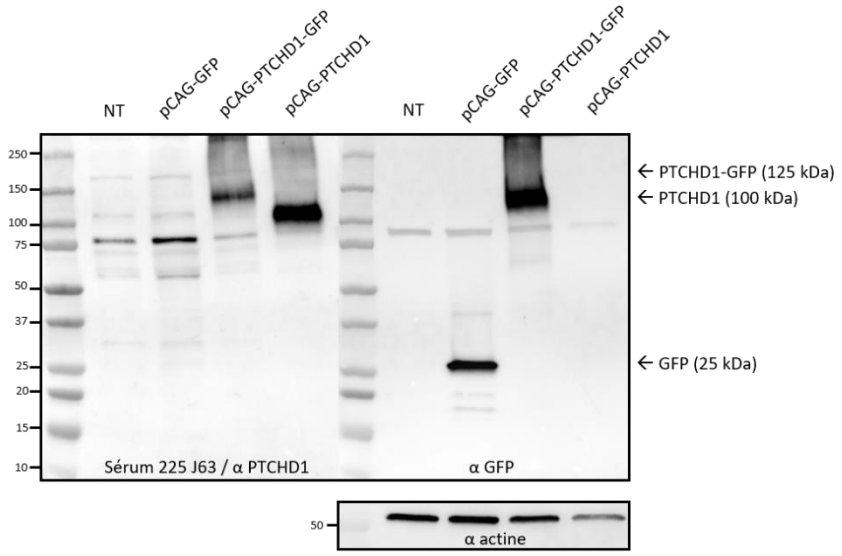


Figure 31 : Analyse de l'efficacité du sérum 225 au jour 63 sur des lysats protéiques de cellules HEK 293T non transfectées (NT) ou transfectées avec pCAG-GFP, pCAG-Ptchd1-GFP ou pCAG-Ptchd1. Un immunoblot anti-GFP a été réalisé comme contrôle, ainsi que pour l'actine pour quantifier les protéines. (n = 3)

Le protocole a d'abord été validé par immunodétection avec des anticorps ciblant des protéines spécifiques des régions présynaptiques, tels que la Synaptophysine et VGLUT1, post-synaptique, comme PSD-95, ainsi que l'actine pour contrôler la quantité de protéines présentes (**Figure 32**). On constate que PSD-95 est en effet présent dans l'homogénat total (Input) et la fraction non nucléaire (PN), mais également dans la fraction synaptique (S) et post-synaptique (P) avec un signal plus intense, et ce signal est fortement diminué dans la fraction présynaptique (NP). De même, la Synaptophysine et VGLUT1 présentent un signal dans l'homogénat total, la fraction non nucléaire (PN) et l'ensemble du synaptosome (S), et l'intensité de ce signal est augmentée dans la fraction présynaptique et nettement diminuée dans la fraction post-synaptique.

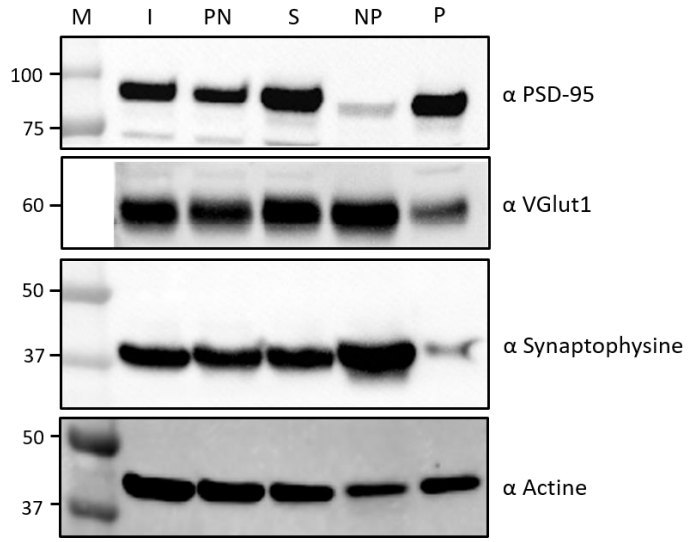


Figure 32 : Validation du protocole de purification avec des anticorps contre des marqueurs de la région présynaptique et post-synaptique. M : marqueur de taille ; I : Input ; PN: Post-nucléaire ; S : Synaptosome ; NP : Pré-synaptique ; P : Post-synaptique. (n=3)

Le protocole a été réitéré avec trois des sérums, le 225 J63, 226 J63 et 223 J77 (**Figure 33**). Malgré les résultats en HEK, le sérum 225 J63 présente de nombreuses bandes qui sont non spécifiques et progressivement éliminés par les purifications successives. Aucune d'entre elles ne semble être susceptible d'être PTCHD1. Les sérums 226 J63 et 223 J77 reconnaissent un grand nombre de bandes protéiques non spécifiques à des poids différents, à l'instar des ce qui a été vu en HEK. De manière intéressante cependant, la présence d'une bande (encadrés bleus) est retrouvée uniquement dans les fractions synaptosomales (S) et post-synaptiques (P) et absente dans la fraction présynaptique (NP) entre 100 et 150 kDa.

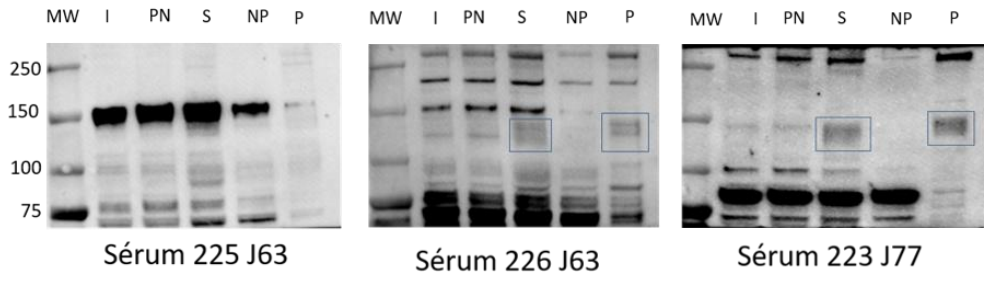


Figure 33 : Evaluation de l'efficacité des sérums 225 J63, 226 J63 et 223 J77 sur des fractions non-nucléaires (PN), synaptosomale (S), pésynaptique (NP) et post-synaptique (P).

Il est bien entendu difficile de conclure qu'il s'agit de PTCHD1, étant donné la non-spécificité des sérums, et que ce signal à une masse moléculaire plus élevée que la masse attendue. La présence d'un signal de PTCHD1 à une masse moléculaire plus élevée que 100/105 kDa pourrait cependant s'expliquer par la présence de modifications post-traductionnelles.

Partie 2

Analyse fonctionnelle de variants génétiques du gène *PTCHD1* associés à la déficience intellectuelle et à l'autisme

I - Contexte scientifique

Dans l'objectif de caractériser la physiopathologie de PTCHD1, nous nous sommes penchés sur des mutations faux-sens mises en évidence chez des patients atteints de phénotypes pathologiques. Ces constatations suggèrent une perturbation importante de la fonction de la protéine dans des régions spécifiques, tel que la stabilité et la maturation de la protéine, l'adressage membranaire ou encore les interactions fonctionnelles avec des ligands et d'autres protéines.

Cette étude est le sujet d'un article soumis à ce jour dans *Human Mutation*, que nous avons réalisé en collaboration avec le Service de Génétique du CHRU de Tours, le Département de Génétique des Hospices Civils de Lyon, le Laboratoire de diagnostic génétique de l'Institut de Génétique Médicale d'Alsace à Strasbourg, la Clinique de Génétique Guy Fontaine au CHU de Lille et le Département de Génétique de l'Hôpital Universitaire Robert Debré à Paris.

Nous avons donc cherché à étudier l'impact de 13 mutations faux-sens de PTCHD1 retrouvés chez des patients atteints de TSA ou de DI. Huit d'entre elles sont décrites dans la littérature. En effet, les mutations Leu73Phe, Ile173Val, Val195Ile, pHis359Arg, Ala470Asp et Glu479Gly ont été répertoriés par l'équipe de Noor (2010) chez patients atteints de TSA, Ser51Asn a été reporté par l'équipe de Torrico et est associé à une DI (2015) et le variant Lys181Thr a été identifié par séquençage de l'exome entier chez un patient souffrant de dysplasie corticale lissencéphalique frontale et de convulsions (Karaca *et al.*, 2015). Les cinq autres variants sont issus du réseau national de génétique sur la déficience intellectuelle, au sein duquel l'équipe est référente pour l'analyse moléculaire et fonctionnelle des variants de PTCHD1 identifiés en dépistage génétique. La mutation Pro32Arg a été trouvée chez un patient avec DI et a été transmise par sa mère; Pro32Leu a été identifié chez un patient atteint de TND et était également présent chez un oncle sans description de TND. Nous avons également collecté les données de patients atteints de TND et porteurs d'un variant Gly300Arg, Tyr213Cys, ainsi qu'un variant *de novo* Ala310Pro chez un patient avec des TND.

Pour mieux déterminer le degré de pathogénicité des variants faux-sens, nous avons réalisé des analyses fonctionnelles *in vitro* en utilisant des expériences de transfection de plasmides PTCHD1-GFP WT ou mutés dans diverses lignées cellulaires, à savoir HEK 293T (humain), Neuro-2a (souris), et des cultures neuronales hippocampiques primaires embryonnaires de souris, afin d'y observer les niveaux d'expression protéiques et les impacts différentiels des variants de PTCHD1 sur le modèle de localisation de la membrane cellulaire (Noor *et al.*, 2010; Ung *et al.*, 2018). Notre objectif était de mesurer la localisation subcellulaire de PTCHD1 au sein de la cellule, indépendamment du nombre de

cellules transfectées par rapport au nombre de cellules totales. Pour cela, nous avons sélectionné le coefficient relatif de Manders qui ne mesure que l'intensité de fluorescence émise par PTCHD1-GFP co-occurant avec l'intensité du marqueur cellulaire d'intérêt (calnexine, PSMB5 et ATPase Na^+/K^+) par rapport à la totalité de fluorescence GFP, en suivant l'équation $M_2 = \frac{\sum G_{i,coloc}}{\sum G_1}$, $G_{i,coloc}$ étant l'intensité du fluorophore vert par pixel où le fluorophore rouge est présent et G_1 l'intensité totale de fluorophore vert émis (Adler and Parmryd, 2010).

Nos résultats ont montré que certains variants situés notamment dans des domaines structuraux tels que des segments transmembranaires ont aboli l'expression membranaire de PTCHD1, bloquant la protéine au niveau du réticulum endoplasmique. Outre le nombre croissant de microdélétions pathogènes et de mutations tronquées de PTCHD1 à l'origine des TSA et de la DI, nos données fournissent une preuve supplémentaire du rôle de PTCHD1 dans les troubles neurodéveloppementaux, avec la contribution croissante des mutations faux-sens entraînant une perte de fonction.

II - Résumé des résultats de l'article

Article: Novel missense mutations in PTCHD1 altering its plasma membrane subcellular localization and causing intellectual disability and autism spectrum disorder.

La plupart des études de quantification de l'ARNm et des protéines ont été réalisées par le Dr Sylviane Marouillat. Manon Dixneuf a participé à l'élaboration de certaines lames d'immunofluorescence des cultures de HEK 293T et de Neuro-2a durant son stage de Master 2.

Une étude préalable sur la base de la structure secondaire prédite de la protéine PTCHD1 nous a permis de localiser les variants faux-sens dans des domaines structuraux précis comme les segments transmembranaires (TM) (Proline 32 dans le premier domaine TM, Glycine 300 et Alanine 310 dans le troisième domaine TM), la première boucle extracellulaire (Serine 51, Leucine 73, Isoleucine 173, Lysine 181, Valine 195 et Tyrosine 213), ou les boucles intracellulaires (Histidine 359, Alanine 470 et Glutamate 479) (**Article**, **Figure 1**). Les SNV étudiés sont pour la plupart absents de la base de données gnomAD, à l'exception des variants Leu73Phe, Ile173Val et Val195Ile détectés respectivement chez 5, 34 et 1 individus mâles (**Article**, **Tableau 1**).

La prédiction de l'effet délétère des 13 changements faux-sens dans PTCHD1 par l'utilisation des logiciels SIFT, Polyphen-2 et UMD-Predictor a montré des résultats variables (**Article**, **Tableau 1**). Seules les variants Pro32Arg, Pro32Leu, Tyr213Cys, Gly300Arg, Ala310Pro et Glu479Gly ont été unanimement considérés comme potentiellement néfastes.

Les mutations ont été générées par mutagenèse dirigée dans un plasmide contenant le gène *Ptchd1* de souris qui partage le même nombre d'acides aminés (888) et un pourcentage d'identité de 98% (Uniprot). Bien entendu, les acides aminés aux positions de nos variations sont identiques dans la séquence humaine et murine (**Article**, **Figure 1B**). Ces plasmides contenant les gènes WT ou mutées ont été transfectés dans les cellules des lignées HEK 293T, avant que celles-ci soient lysées afin de quantifier le niveau d'expression d'ARNm et de protéines. Les ADNc de Ptchd1-GFP résultant de la qPCR sont retrouvés surexprimés à des niveaux similaires (**Article**, **Figure 2A**) alors que de fortes diminutions sont observées par Western blot pour les protéines PTCHD1 contenant les mutations Pro32Arg, Pro32Leu, Lys181Thr, Tyr213Cys, Gly300Arg et Ala310Pro par rapport au WT (**Figure 2B, C**), alors que les cellules exprimant la protéine avec les mutations Ser51Asn, Leu73Phe, Ile173Val, Val195Ile, His359Arg, Ala470Asp et Glu479Gly ont conservé une expression protéique similaire à la forme sauvage.

Nous avons ensuite réalisé des études de localisation subcellulaire de la protéine sauvage et des 13 variants de PTCHD1 dans les cellules issues des lignées HEK 293T, Neuro-2a et également de cultures neuronales primaires. Dans les études précédentes, la protéine PTCHD1 est principalement exprimée au niveau de la membrane plasmique dans des lignées cellulaires neuronales et non neuronales, et également trouvé enrichie dans les épines dendritiques de neurones observées dans les cultures cellulaire primaires (Noor *et al.*, 2010; Tora *et al.*, 2017; Ung *et al.*, 2018).

Les expériences d'immunofluorescence observées au microscope confocal SP8 (Leica) ont révélé que le PTCHD1-GFP WT et les formes mutées contenant les variants Ser51Asn, Leu73Phe, Ile173Val, Val195Ile, His359Arg, Ala470Asp ou Glu479Gly sont principalement localisés au niveau de la membrane plasmique dans les cellules HEK 293T transfectées, comme confirmé par co-coloration avec le marqueur de la membrane plasmique, l'ATPase Na^+ / K^+ (**Figure 34 ; Article**, **Figures 3A, B**). Inversement, nous avons trouvé une faible localisation membranaire pour les protéines PTCHD1 avec les variants Pro32Arg, Pro32Leu, Lys181Thr, Tyr213Cys, Gly300Arg et Ala310Pro (**Figure 34 ; Article**, **Figures 3A, B**). Ces résultats indiquent que la plupart des protéines PTCHD1 avec ces 6 mutations ne sont pas efficacement adressées à la membrane plasmique, ce qui pourrait être lié à un repliement anormal du domaine extracellulaire (pour les variantes Lys181Thr et Tyr213Cys) ou des segments transmembranaires (pour Pro32Arg, Pro32Leu, Gly300Arg et Ala310Pro), conduisant à une

rétention partielle de la protéine dans le RE et à une dégradation ultérieure par le protéasome. Enfin, cela pourrait expliquer la diminution des niveaux d'expression des protéines mis en évidence dans nos expériences d'immunoblot.

La rétention des six variants de PTCHD1 dans le RE est confirmée par la présence d'une forte colocalisation de ces protéines mutées avec l'anticorps anti-calnexine, marqueur du RE (**Figure 35 ; Article**, **Figure 3C, D**), ainsi que la dégradation protéasomale avec l'anticorps PSMB5, un marqueur du protéasome P20S (**Figure 36 ; Article**, **Figure S1**). Notre analyse comparative dans les cellules de précurseurs neuronaux de souris Neuro-2a transfectées avec les formes WT et les variants de PTCHD1-GFP a confirmé nos résultats initiaux observés dans les cellules HEK 293T (**Figures 37, 38, 39 ; Article**, **Figure 4**).

Enfin, nous avons évalué la localisation subcellulaire des variants PTCHD1 dans les cultures primaires de neurones hippocampiques matures qui présentent des caractéristiques morphologiques neuronales spécifiques telles que les dendrites et les épines dendritiques. Nous avons confirmé que PTCHD1-GFP WT était exprimée à la membrane et au niveau des épines dendritiques, colocalisant avec PSD-95, un marqueur spécifique des structures post-synaptiques excitatrices (**Article**, **Figure 5**). Nous avons également montré que les neurones surexprimant les protéines PTCHD1-GFP portant les variants Ala470Asp, Leu73Phe, Ile173Val, His359Arg et Val195Ile présentaient également une localisation synaptique sans aucune altération de la densité synaptique (**Article**, **Figure 5**). Nous n'avons pas pu détecter de neurones transfectés surexprimant les variants Pro32Arg, Pro32Leu, Ser51Asn, Lys181Thr, Tyr213Cys, Gly300Arg, Ala310Pro et Glu479Gly.

Les images de microscopie confocal ont été reproduites ci-dessous en grande taille afin de pouvoir observer la localisation subcellulaire de PTCHD1-GFP et des marqueurs au sein des cellules.

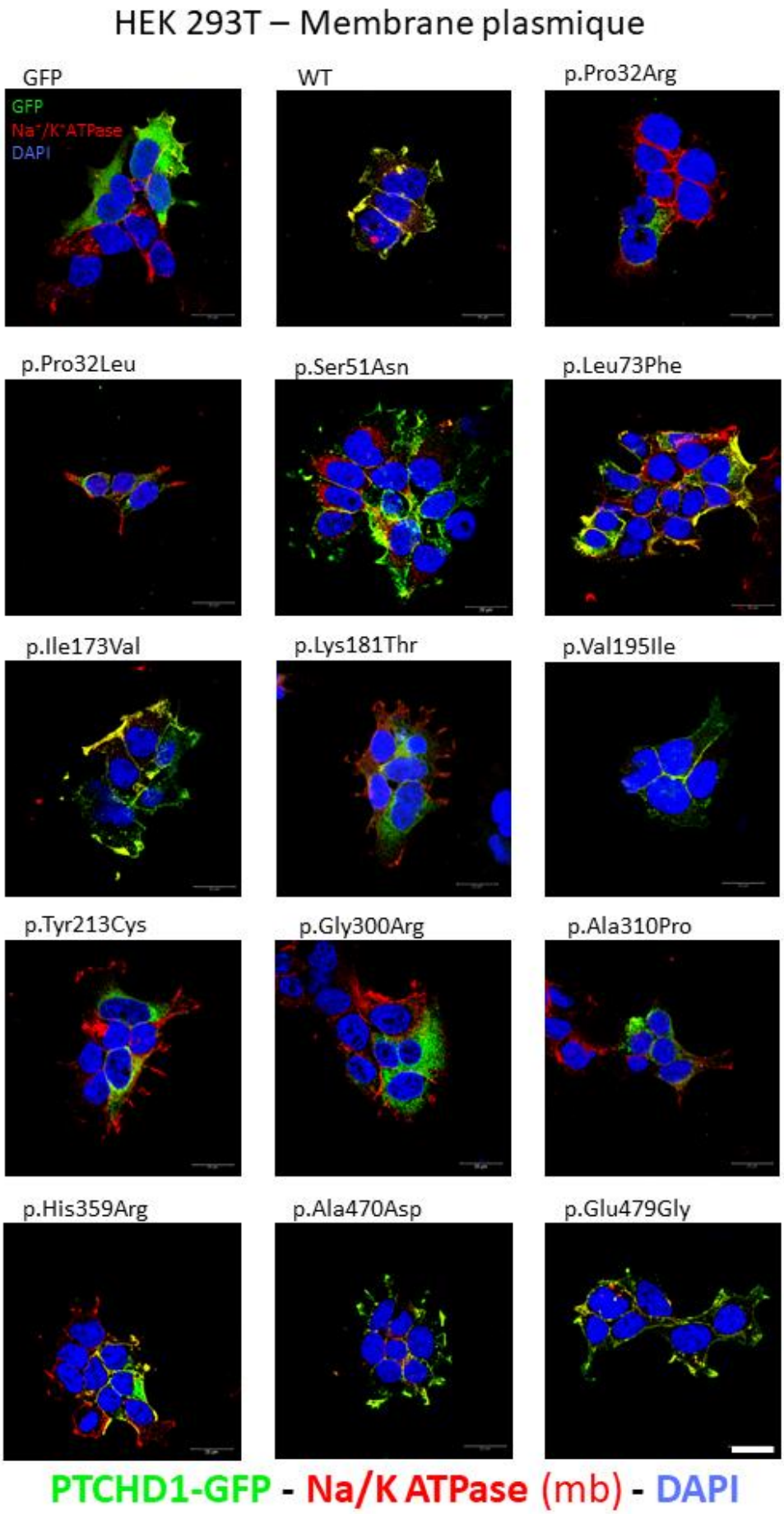


Figure 34 : Images de microscopie confocale représentatives de cellules HEK 293T transfectées avec la *GFP* ou *PTCHD1-GFP* sauvage (WT) ou muté et avec un marquage de la membrane plasmique. PTCHD1-GFP est détecté grâce à un anticorps anti-GFP (vert), la membrane plasmique est mise en évidence grâce à un anticorps anti-ATPase Na^+/K^+ (rouge) et le noyau grâce au DAPI (bleu). n = 3 transfections indépendantes ont réalisées. Echelle = 20µm.

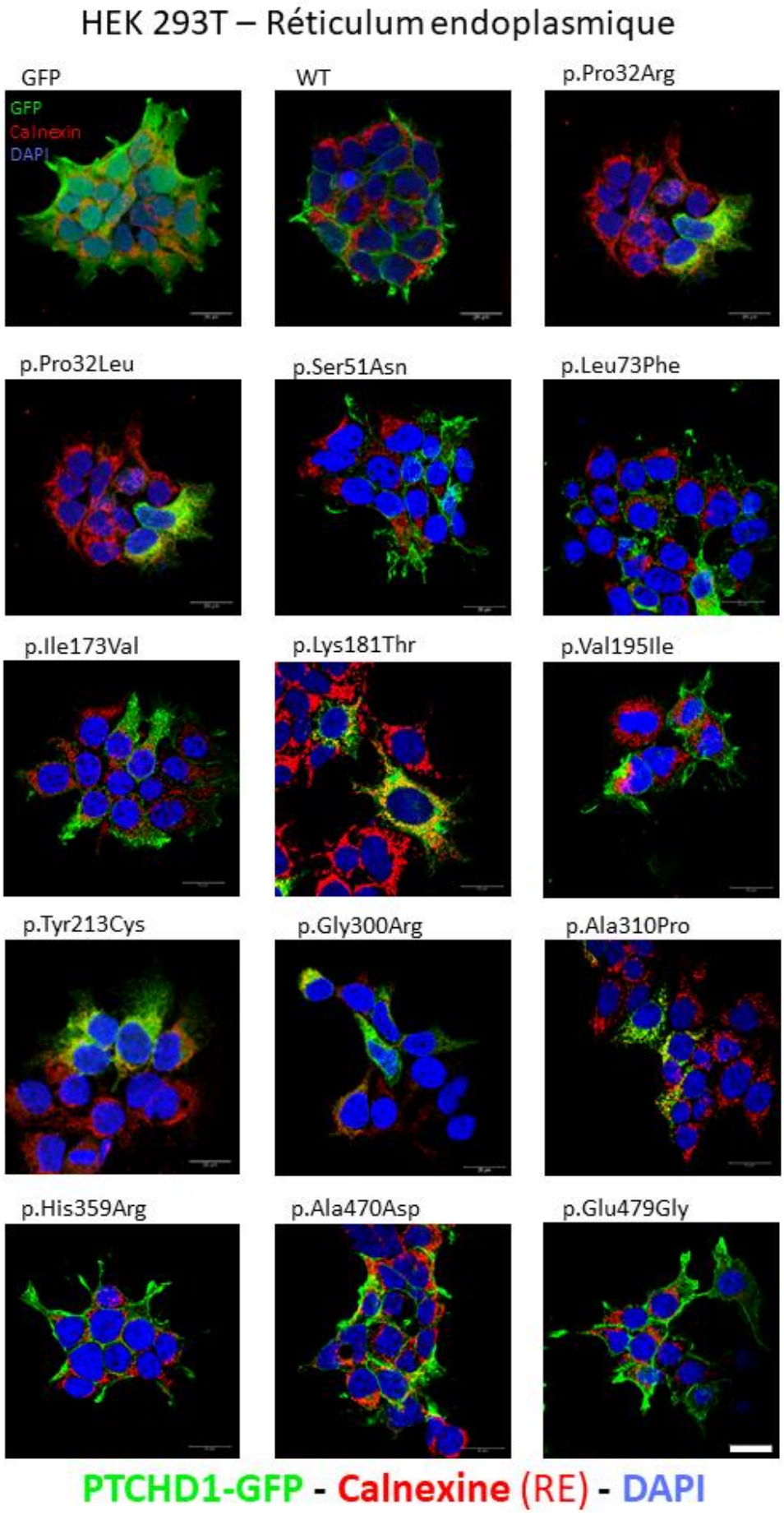


Figure 35 : Images de microscopie confocale représentatives de cellules HEK 293T transfectées avec la *GFP* ou *PTCHD1-GFP* sauvage (WT) ou muté et avec un marquage du réticulum endoplasmique. PTCHD1-GFP est détecté grâce à un anticorps anti-GFP (vert), le réticulum endoplasmique est mis en évidence grâce à un anticorps anti-calnexine (rouge) et le noyau grâce au DAPI (bleu). n = 3 transfections indépendantes ont réalisées. Echelle = 20µm.

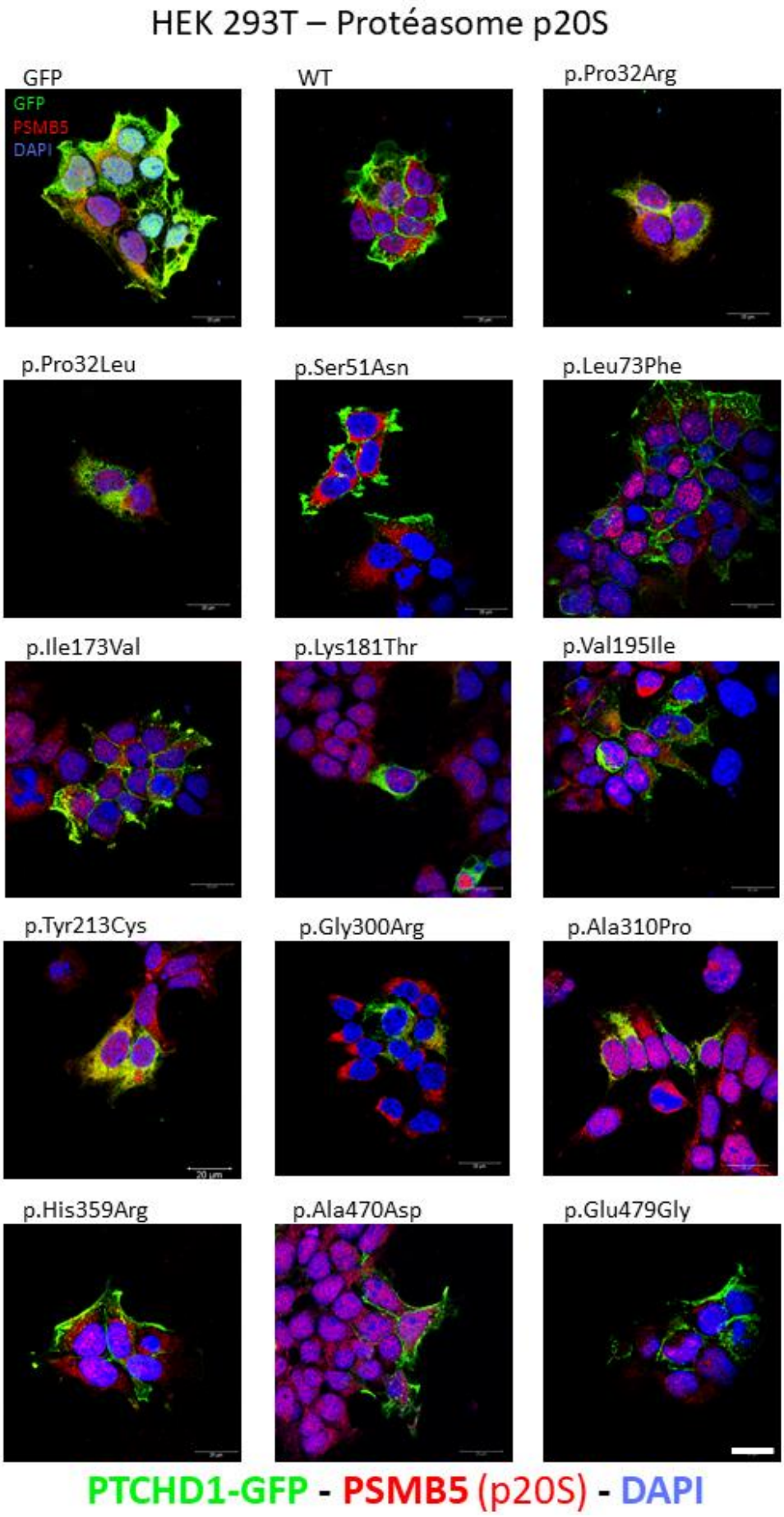


Figure 36 : Images de microscopie confocale représentatives de cellules HEK 293T transfectées avec la *GFP* ou *PTCHD1-GFP* sauvage (WT) ou muté et avec un marquage du protéasome p20S. PTCHD1-GFP est détecté grâce à un anticorps anti-GFP (vert), le protéasome est mis en évidence grâce à un anticorps anti-PSMB5 (rouge) et le noyau grâce au DAPI (bleu). n = 3 transfections indépendantes ont réalisées. Echelle = 20µm.

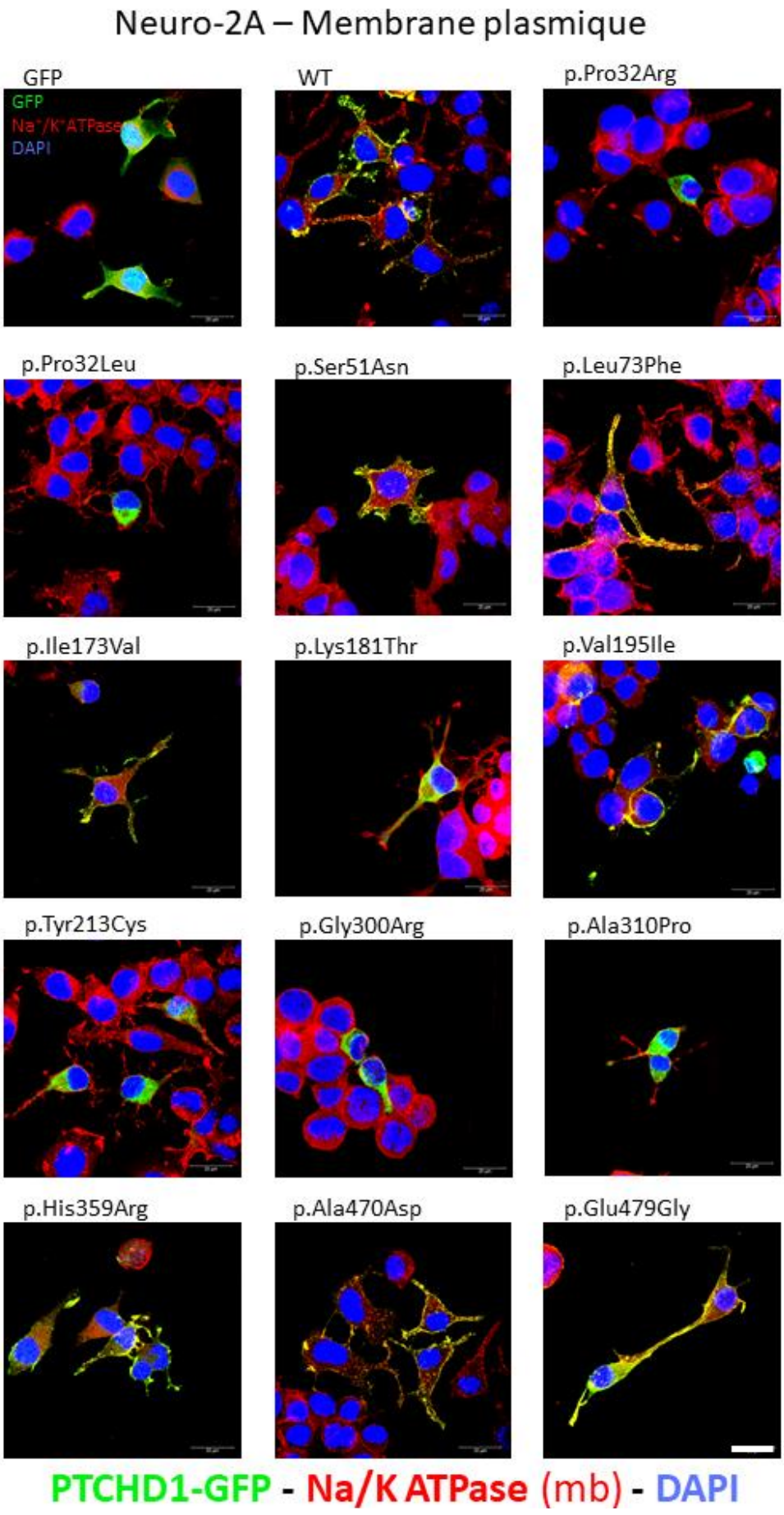


Figure 37 : Images de microscopie confocale représentatives de cellules Neuro-2A transfectées avec la *GFP* ou *PTCHD1-GFP* sauvage (WT) ou muté et avec un marquage de la membrane plasmique. PTCHD1-GFP est détecté grâce à un anticorps anti-GFP (vert), la membrane plasmique est mise en évidence grâce à un anticorps anti-ATPase Na^+/K^+ (rouge) et le noyau grâce au DAPI (bleu). n = 3 transfections indépendantes ont réalisées. Echelle = 20µm.

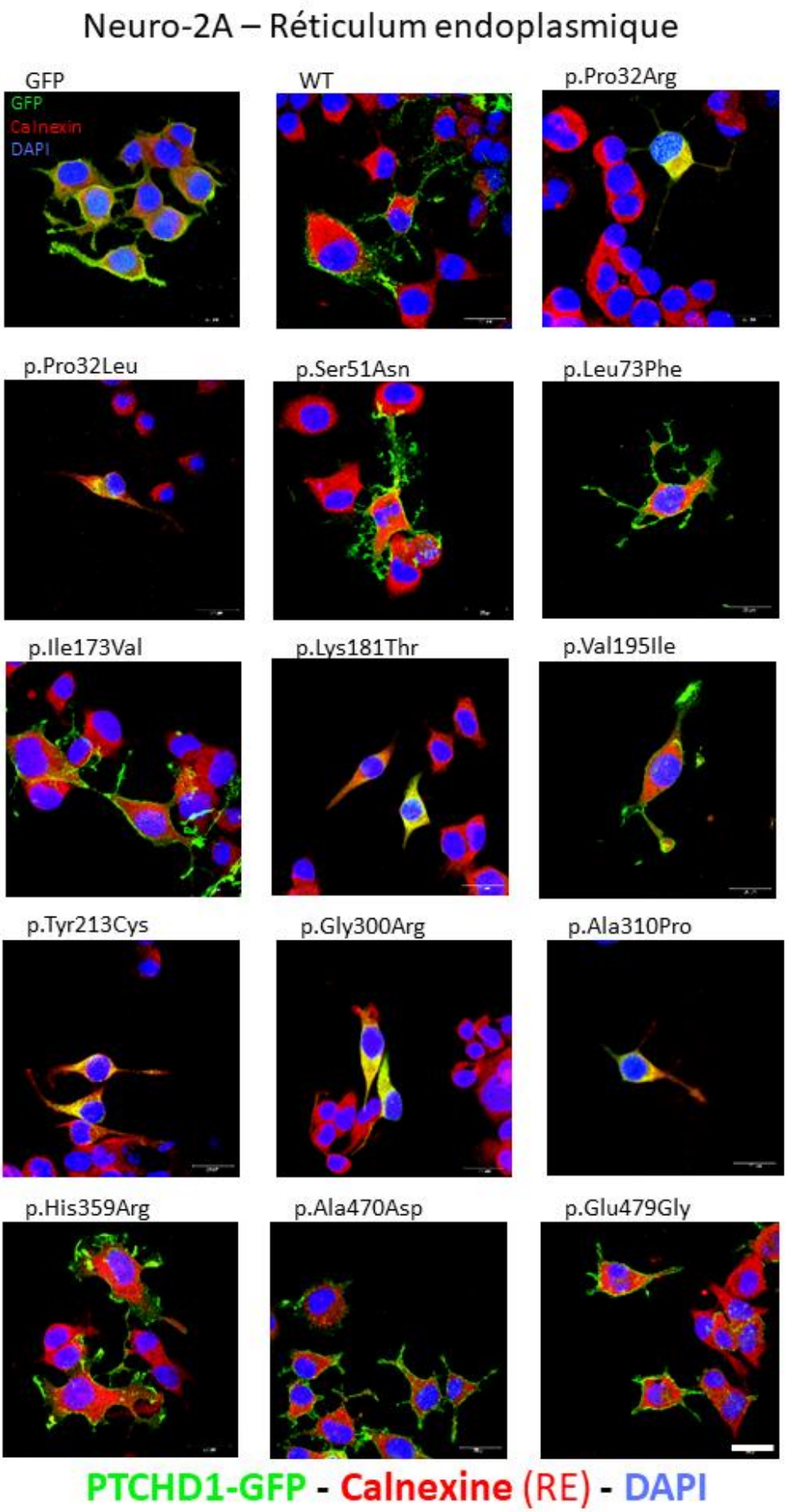


Figure 38 : Images de microscopie confocale représentatives de cellules Neuro-2A transfectées avec la *GFP* ou *PTCHD1-GFP* sauvage (WT) ou muté et avec un marquage du réticulum endoplasmique. PTCHD1-GFP est détecté grâce à un anticorps anti-GFP (vert), le réticulum endoplasmique est mis en évidence grâce à un anticorps anti-calnexine (rouge) et le noyau grâce au DAPI (bleu). n = 3 transfections indépendantes ont réalisées. Echelle = 20µm.

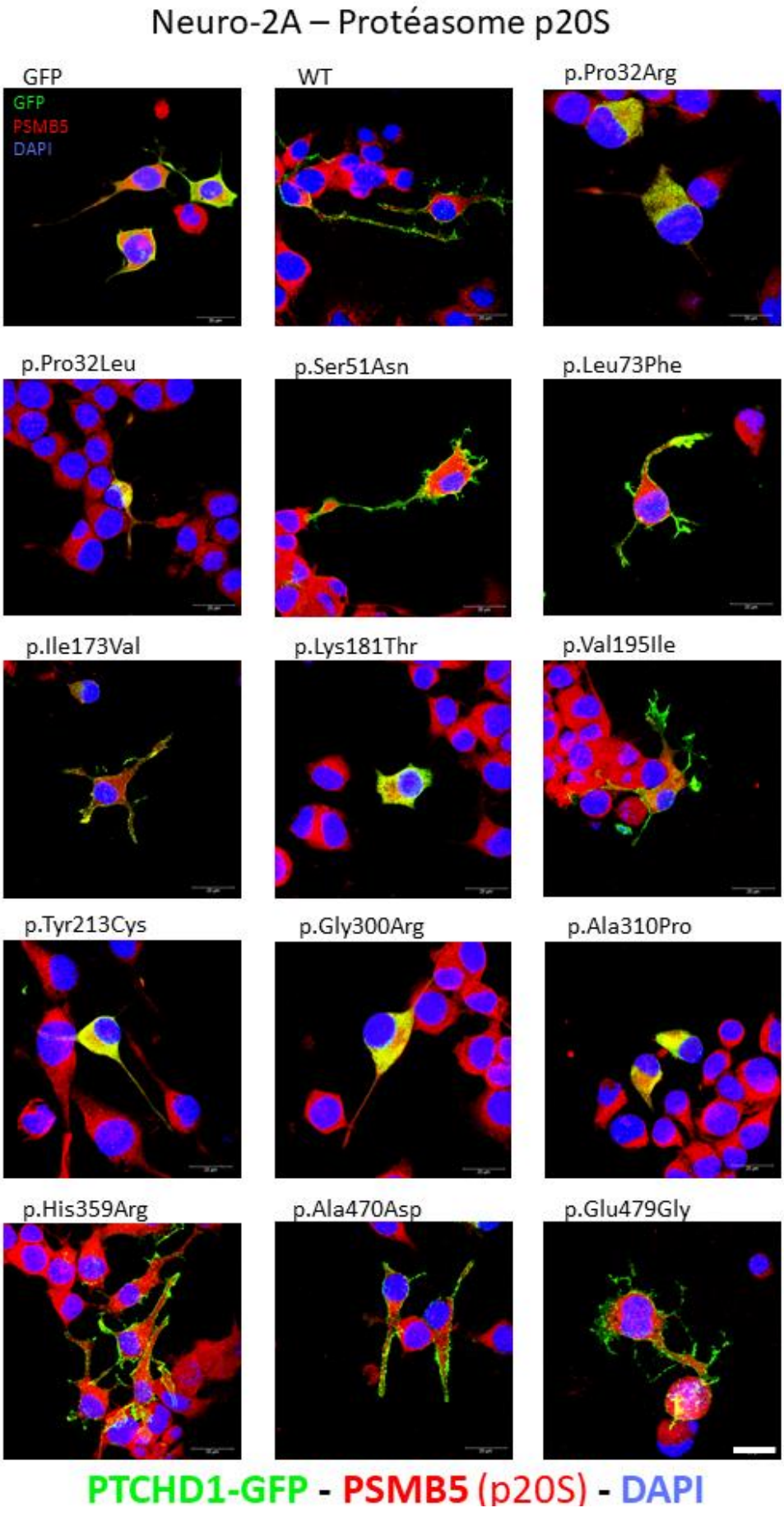


Figure 39 : Images de microscopie confocale représentatives de cellules Neuro-2A transfectées avec la *GFP* ou *PTCHD1-GFP* sauvage (WT) ou muté et avec un marquage du protéasome p20S. PTCHD1-GFP est détecté grâce à un anticorps anti-GFP (vert), le protéasome est mis en évidence grâce à un anticorps anti-PSMB5 (rouge) et le noyau grâce au DAPI (bleu). n = 3 transfections indépendantes ont réalisées. Echelle = 20µm.

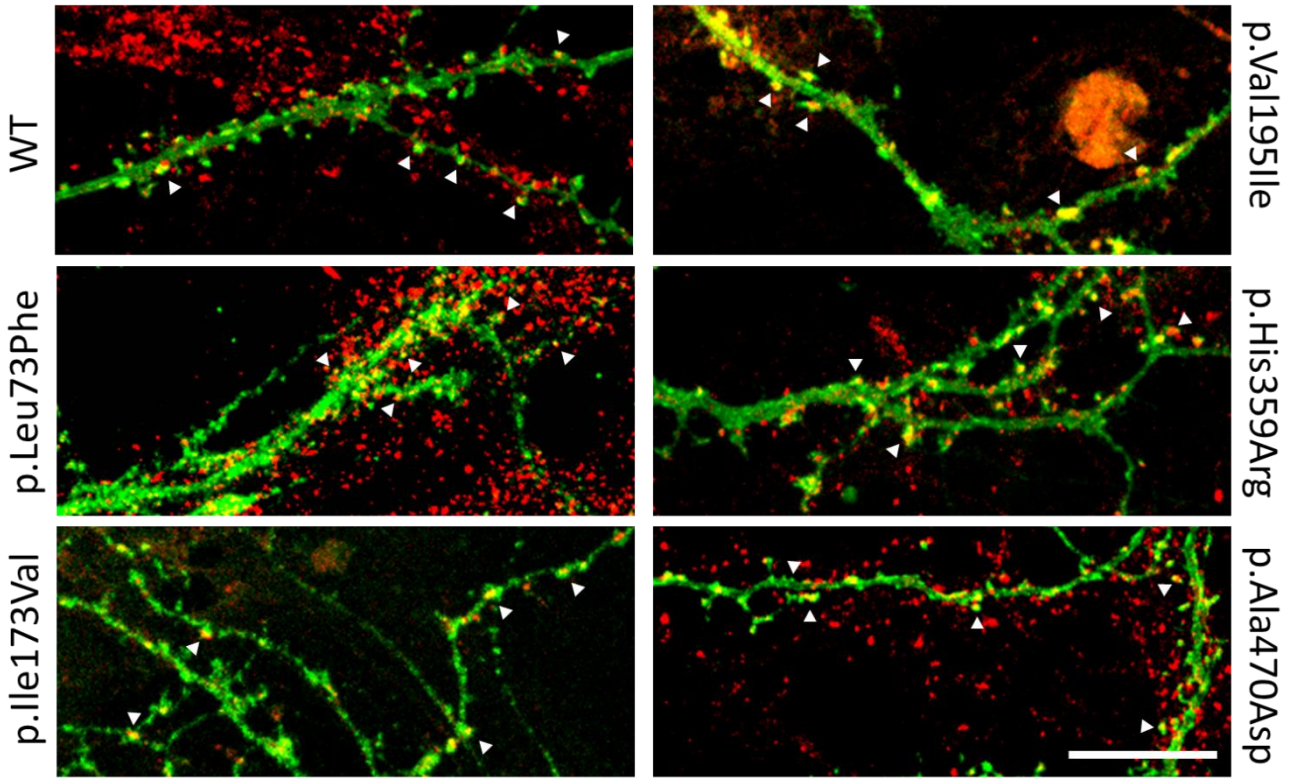


Figure 40 : Localisation synaptique des variants de PTCHD1 dans les cultures neuronales primaires, transfectées avec PTCHD1-GFP WT, p.Leu73Phe, p.Ile173Val, p.Val195Ile, p.His359Arg et p.Ala470Asp. PTCHD1-GFP est détecté grâce à un anticorps anti-GFP (vert) et les synapses sont mises en évidence grâce à un anticorps anti-PSD-95 (rouge). Les signaux de chevauchement synaptique (points jaunes) sont indiqués par la pointe des flèches blanches. n = 2 transfections indépendantes. Echelle = 15 µm.

Human Mutation
Variation, Informatics, and Disease
OFFICIAL JOURNAL HGV HUMAN GENOME VARIATION SOCIETY

Novel missense mutations in PTCHD1 altering its plasma membrane subcellular localization and causing intellectual disability and autism spectrum disorder

Journal:	*Human Mutation*
Manuscript ID	humu-2020-0481
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	17-Dec-2020
Complete List of Authors:	Halewa, Judith; UMR 1253 Imaging and Brain Marouillat, Sylviane; UMR 1253 Imaging and Brain, neurogenomics and neuronal pathophysiology Dixneuf, Manon; UMR 1253 Imaging and Brain, neurogenomics and neuronal pathophysiology Thépault, Rose-Anne; UMR 1253 Imaging and Brain, neurogenomics and neuronal pathophysiology Ung, Dévina; UMR 1253 Imaging and Brain, neurogenomics and neuronal pathophysiology CHATRON, Nicolas; Centre Hospitalier Universitaire de Lyon, Service de Génétique Gérard, Bénédicte; Hopitaux universitaires de Strasbourg, Molecular Genetics Ghoumid, Jamal; Universite du Droit et la Sante de Lille 2 Faculte de Medecine Henri-Warembourg, Genetics; Centre Hospitalier Regional Universitaire de Lille, Clinical Genetics Gaetan, LESCA; Centre Hospitalier Universitaire de Lyon, Service de Génétique Till, Marianne; Centre Hospitalier Universitaire de Lyon, Department of genetics Smol, Thomas; Universite du Droit et la Sante de Lille 2 Faculte de Medecine Henri-Warembourg, EA7364 RADEME; Centre Hospitalier Regional Universitaire de Lille, Institut de génétique médicale Couque, Nathalie; Robert-Debré Hospital Department of Genetics Ruaud, Lyse; Robert-Debré Hospital Department of Genetics Chune, Valérie; Robert-Debré Hospital Department of Genetics Grotto, Sarah; Robert-Debré Hospital, Département de Génétique verloes, alain; Robert-Debré Hospital Department of Genetics Vuillaume, Marie-Laure; UMR 1253 Imaging and Brain, neurogenomics and neuronal pathophysiology; CHU Tours, Genetics Toutain, Annick; UMR 1253 Imaging and Brain, neurogenomics and neuronal pathophysiology; CHU Tours, Genetics Raynaud, Martine; UMR 1253 Imaging and Brain; CHU Tours, Genetics Laumonnier, Frédéric; UMR 1253 Imaging and Brain, neurogenomics and neuronal pathophysiology; CHU Tours, Department of Genetics
Key Words:	intellectual disability, autism spectrum disorder, missense variants, PTCHD1 (Patched domain containing 1) gene, functional analyses, in

	vitro cellular models, subcellular localization

SCHOLARONE™
Manuscripts

Novel missense mutations in PTCHD1 altering its plasma membrane subcellular localization and causing intellectual disability and autism spectrum disorder

Judith Halewa[1], Sylviane Marouillat[1], Manon Dixneuf[1], Rose-Anne Thépault[1], Dévina C. Ung[1], Nicolas Chatron[2,3], Bénédicte Gérard[4], Jamal Ghoumid[5], Gaëtan Lesca[2,3], Marianne Till[2], Thomas Smol[6], Nathalie Couque[7], Lyse Ruaud[7,8], Valérie Chune[7], Sarah Grotto[7,8], Alain Verloes[7,8], Marie-Laure Vuillaume[1,9], Annick Toutain[1,9], Martine Raynaud[1,9], Frédéric Laumonnier[1,9]

[1] UMR1253, iBrain, University of Tours, Inserm, Tours, France

[2] Genetics Department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

[3] Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR-5310, INSERM U-1217, Institut NeuroMyoGène, Lyon, France

[4] Laboratoire de diagnostic génétique, Institut de Génétique Médicale d'Alsace, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

[5] EA7364 RADEME, Université de Lille, Clinique de Génétique Guy Fontaine, CHU Lille, Lille, France

[6] EA7364 RADEME, Université de Lille, Institut de Génétique Médicale, CHU Lille, Lille, France

[7] Department of Genetics, APHP-Robert Debré University Hospital, Paris, France

[8] Denis Diderot School of Medicine, Paris University, Inserm, UMR1141, Paris, France

[9] Service de Génétique, CHRU de Tours, Tours, France

Address for correspondence:

Dr Frédéric Laumonnier, PhD

Inserm UMR1253, Imagerie et Cerveau, équipe "neurogénomique et physiopathologie neuronale"

Faculté de Médecine; 10 Bd Tonnellé; 37032 Tours cedex, France

Phone: +33(0)247366062; Email: frederic.laumonnier@univ-tours.fr

Grant numbers:

Fondation de France : Grant numbers 2012-3362 and 00089599

Agence Nationale de la Recherche (ANR) : Grant number ANR-20-CE17-0006

For Peer Review

Abstract

The X-linked *PTCHD1* gene, encoding a synaptic membrane protein, has been involved in neurodevelopmental disorders with the description of deleterious genomic microdeletions or truncating coding mutations. Missense variants were also identified, however without any functional evidence supporting their pathogenicity level. We investigated 13 missense variants of PTCHD1, including eight previously described (c.152G>A,p.(Ser51Asn) ; c.217C>T,p.(Leu73Phe) ; c.517A>G,p.(Ile173Val) ; c.542A>C,p.)Lys181Thr) ; c.583G>A,p.(Val195Ile) ; c.1076A>G,p.(His359Arg) ; c.1409C>A,p.(Ala470Asp) ; c.1436A>G,p.(Glu479Gly)), and five novel ones (c.95C>T,p.(Pro32Leu) ; c.95C>G,p.(Pro32Arg) ; c.638A>G,p.(Tyr213Cys) ;c.898G>C,p.(Gly300Arg) ; c.928G>C,p.(Ala310Pro)) identified in male patients with intellectual disability (ID) and/or Autism Spectrum Disorder (ASD). Interestingly, several of these variants involve amino-acids localized in structural domains such transmembrane segments. To evaluate their potential deleterious impact on PTCHD1 protein function, we performed *in vitro* overexpression experiments of the wild type and mutated forms of PTCHD1-GFP in HEK 293T and in Neuro-2a cell lines as well as in mouse hippocampal primary neuronal cultures. We found that six variants impaired the expression level of the PTCHD1 protein, and were retained in the endoplasmic reticulum suggesting abnormal protein folding. Our functional analyses thus provided evidence of the pathogenic impact of missense variants in PTCHD1, which reinforces the involvement of the *PTCHD1* gene in ID and in ASD.

Keywords : intellectual disability; autism spectrum disorder; missense variants; *PTCHD1* (Patched domain containing 1) gene ; functional analyses ; in vitro cellular models ; subcellular localization

Running Head Title : PTCHD1 missense mutations in neurodevelopmental disorders

For Peer Review

MAIN TEXT

Background

From the last decades, the molecular study of neurodevelopmental disorders revealed the involvement of numerous genes essential in neuronal developmental processes like morphogenesis or neuronal plasticity and synaptogenesis (Laumonnier et al. 2007; Gilman et al., 2011; Bourgeron, 2015; Krishnan et al., 2016; Moyses-Oliveira et al., 2020; Parenti et al., 2020). Among them, microdeletions and mutations in the X-chromosomal *PTCHD1 (Patched domain containing 1)* gene were described in patients with autism spectrum disorders (ASD) and/or intellectual disability (ID) (Marshall *et al.*, 2008; Noor *et al.*, 2010; Filges *et al.*, 2011; Chaudhry *et al.*, 2015). Furthermore, the *PTCHD1* gene or upstream genomic region (including the antisense long non-coding RNA *PTCHD1-AS*) disruptions cause an recessive X-linked recessive non-syndromic neurodevelopmental disorder characterized by variable features of ID, ASD, global developmental delay in their childhood with also infantile hypotonia (especially hypotonic face features), motor incoordination, and sometimes dysmorphic features (Pinto *et al.*, 2010). Some patients display behavioural or psychiatric issues, including attention deficit with or without hyperactivity (ADHD), sleep disruptions, aggressive or impulsive behaviour (Chaudhry *et al.*, 2015). No evidence for a recognizable and significant pattern of congenital anomalies or serious medical co-morbidities in association with disruptions or deletions of this gene was highlighted.

PTCHD1 encodes a membrane protein located and enriched in the postsynaptic density (PSD) of GABAergic neurons (Wells *et al.*, 2016) and glutamatergic neurons (Tora *et al.*, 2017; Ung et *al.* 2018), with 12 predicted transmembrane domains, two large extracellular loops, and intracellular amino and carboxy terminal tails. Recent studies highlighted that PTCHD1 can bind postsynaptic scaffold proteins PSD95 and DLG3 (SAP102) via a PDZ binding domain motif at the end of the C terminal tail (Tora et *al.* 2017; Ung *et al.*, 2018), as well as retromer complex proteins SNX27, and also VPS26B and VPS35 but independently from the PDZ-domain binding motif (Tora *et al.*, 2017). PTCHD1 is also predicted to be a receptor, homologous to PTCH1, which is involved in the sonic Hedgehog (SHH) pathway, however

For Peer Review

PTCHD1 does not include the SHH ligand-binding site motif which is present in PTCH1 and has been found unable to modulate the SHH pathway (Bosanac *et al.*, 2009; Ung *et al.*, 2018).

Single nucleotide variants (SNVs), including missense, nonsense or truncating mutation in PTCHD1 have been highlighted in patients with NDD. Strikingly, little is known about the pathogenic evaluation of PTCHD1 missense variants using biological in vitro experiments, which leads to significant issues in genetic medical diagnosis. We established a functional analysis to investigate 13 missense variants using *in vitro* non neuronal (HEK 293T) and neuronal (Neuro-2a and primary neurons) cellular models. Here we report findings showing differential impacts of PTCHD1 variants on the cell membrane localization pattern, as well as protein expression levels. Specifically, variants located in structural domains such as transmembrane segments abolished the membrane expression of PTCHD1, which was retained in the endoplasmic reticulum. Besides the increasing number of pathogenic microdeletions and truncating mutations of PTCHD1 causing ASD and ID, our data provide further evidence of the role of PTCHD1 in neurodevelopmental disorders, with the growing contribution of missense mutations leading to loss-of-function consequences.

For Peer Review

Methods

Patients and identification/follow-up of missense variants in *PTCHD1*

The genetic investigations regarding the patients with the five novel PTCHD1 variants were approved by the local institutional review boards (Lille, Lyon, Paris, Strasbourg), and written informed consent was obtained from the patients' parents, including explicit permission to share clinical and identifying information. The molecular analyses were performed through genetic diagnosis protocols using whole-exome strategies on the affected boy and co-segregation were processed on parents' genomic DNA when available. The collection of these variants was possible through the French National Genetics Network on Intellectual Disability. The eight published missense variants have been reported in the SFARI gene database (https://gene.sfari.org).

Pathogenicity prediction of the variants

The *PTCHD1* variants are named according to the isoform Refseq NM_173495.3 which encodes a protein of 888 amino-acids (Refseq NP_775766.2). The potential effects of missense variants were predicted using SIFT (Kumar et *al.*, 2009) (https://sift.bii.a-star.edu.sg/), Polyphen-2 (Adzhubei *et al.*, 2010) (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), UMD Predictor (Salgado *et al.*, 2016) (http://umd-predictor.eu/). As SIFT is a tool relying on sequence homology between species, the protein sequence was taken from all species referred on Uniprot (https://www.uniprot.org/uniprot/), corresponding to 816 complete or partial PTCHD1 orthologues. Protein sequences were aligned with Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) on Uniprot. In SIFT, human PTCHD1 protein sequence (Refseq NP_775766.2) was entered as the query sequence, the others as related sequences in SIFT Aligned Sequences tool, with the FASTA file of aligned sequences generated by Uniprot after the alignment. In UMD-Predictor, "single analysis" was performed on the human *PTCHD1* transcript ENST00000379361 from Ensembl (https://www.ensembl.org/). The presence of the different variants in the general population was assessed using gnomAD database (http://gnomad.broadinstitute.org/, v2.1.1).

PTCHD1 expression plasmid and site-directed mutagenesis

The sequence of full-length coding *Ptchd1* mouse cDNA was amplified from the IMAGE cDNA clone 40095445 (GenBank accession number BC116312) (Source BioSience) and cloned in pAcGFP1-N vectors using In-Fusion cloning strategy (Catalog No. 632501, Clontech) to generate PTCHD1-GFP with GFP tag at the C-terminal end (previously described in Ung et *al.*, 2018). Importantly, the murine PTCHD1 protein shares the same amino-acids length (888) with 98% of sequence identity between murine and human PTCHD1 proteins. The mutant PTCHD1-GFP plasmids were generated using the Q5® Site-Directed Mutagenesis kit (New England Biolabs) according to the manufacturer's recommendations. The Primers sequences for each mutagenesis are indicated in **Table S1**. The efficiency of the site-directed mutagenesis was verified by Sanger Sequencing.

For Peer Review

HEK 293T and Neuro-2a cell lines culture

HEK 293T cell lines (ATCC, CRL-3216) were cultured with DMEM (Gibco, ref 31966047) medium, with 1% of Sodium Pyruvate Solution (100 mM, S8636, Sigma-Aldrich®) and 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution (M7145, Sigma-Aldrich®) and 10% of Foetal Bovine Serum (FBS) (Eurobio, CVFSVF06-01). Neuro-2a (N2A) cell lines (ATCC, CCL-131) were cultured with EMEM medium (ATCC, 30-2003) and 10% of FBS. Both cell lines were subcultured twice a week by trypsinization (trypsin 0.25%, Gibco, 25200056).

Primary neuronal cultures

All mouse experiments performed at the University of Tours/INSERM were approved by the French Ministry of Research (Project authorization number 01456.03). Brain tissues were dissected from embryonic day 17.5 C57BL/6J WT mouse embryos (Janvier Labs) on cold DPBS with 1% of penicillin-streptomycin (PS) (Thermo-Scientific), and the hippocampi were incubated with papain (10 U/ml; Worthington) for 22 min at 37°C, then mechanically dissociated in DMEM:F12 (Gibco, 31331093) with 10% of FBS (Eurobio, CVFSVF06-01) and centrifuged at 250 x *g* for 5 min. The cellular pellet was resuspended in Neurobasal Plus (Gibco, A3582901) supplemented with B27 Plus (Gibco A35828-01) 1X and L- glutamine (0.5 mM, Gibco, 25030149). Dissociated neurons were seeded on glass coverslips coated with Poly-D-lysine (Sigma, P7280) and laminin (4µg/ml) (Gibco, 23017-015) with a density of 400 cells per mm^2. Half of the medium was changed twice a week.

Transfection

Hippocampal neurons (at 11th day of culture in vitro), HEK 293T and Neuro-2a cell lines were transfected with a plasmid construct (WT or mutated forms of PTCHD1-GFP) using Lipofectamine 2000 (Thermo-Scientific, 11668027) with 1µg of DNA/2µL of L2000 diluted in Neurobasal medium. The mix was added to cells and they were incubated for 4 hours (37°C, 5% CO2), then the transfection medium was replaced with a mix 1:1 of new complete culture medium and previously removed medium

For Peer Review

(conditioned medium) for neurons, or only new medium for cell lines. Microscopy analyses were carried out 48 hours after transfection.

Gene expression study by qPCR

HEK 293T cells were transfected with pAc-PTCHD1-GFP different plasmids using lipofectamine 2000 as described above. Two days after transfection total RNA was extracted from HEK 293T samples awith Trizol and then purified using DirectZol kit (Ozyme). 1 µg of RNA was used to generate cDNA using PrimeScript RT reagent kit (Takara, RR037B). PCR amplification of *Ptchd1* cDNA was performed with a forward primer located in exon 1 is 5'- GCCAACATGCTAGACCAACA -3', and the reverse primer located in exon 2 is 5'- CCCGAGCATTCTTTAGCTCTT -3'. The human *GAPDH* cDNA was used as reference gene with a forward primer: (5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3') and a reverse primer (5'-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'). PCR analyses were done in duplicates using Sybr green Takyon kit (Eurogentec, UF-NSMT-B0701) and a LightCycler 480 (Roche) on total cDNAs obtained from four independent cultures. Data were normalized to the *GAPDH* gene and to the pAc-PTCHD1-GFP WT control according to the 2-ΔΔCp method. Data statistical analysis was carried out with GraphPad Prism 8, using a Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons from at least four independent experiments.

Western Blot

Two days post transfection, cells were washed 2 times with cold PBS then were lysed using RIPA buffer (Pierce) with protease inhibitors cocktails for 15 minutes on ice. After incubation, the lysates were centrifugated at 15,000g for 10 minutes. The supernatants were collected and total protein lysates were quantified. A total of 30µg of non-denatured proteins were processed for SDS-PAGE at 180V during one hour using mini-PROTEAN precast gels 4-20% TGX stain free (456-8094, Bio-Rad). SDS-PAGE gels were blotted on PVDF membrane using TransBlot Turbo (Bio-Rad) followed by blocking the membrane for 1 hour with 5% milk diluted in TBS-Tween (0,05% tween 20). Primary antibodies for

John Wiley & Sons, Inc.

PTCHD1-GFP (1/2000, 632592, TakaraBio) and actin (1:100000, A3854, Sigma-Aldrich) were incubated overnight at 4°C in 5% milk in TBST buffer. After 3 washes (10 minutes) with TBST, membranes were incubated with corresponding HRP-conjugated secondary antibodies (Goat anti-rabbit 1/2500, W4018, Promega) for 45 minutes at room temperature. Proteins were detected after one-minute incubation for Actin blot and five minutes incubation for PTCHD1-GFP blot with Clarity western ECL kit (1705061, Bio-rad) and the membranes were visualized in a Chemidoc Touch imaging system (Bio-Rad). Immunoblots were analyzed by Chemidoc Touch (Bio-rad) by calculating the volume of each band for the same area. The bands intensity was normalized to Actin. Data statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 8 and using Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test.

Immunocytochemistry

Cells cultured on coverslips were fixed in a solution of paraformaldehyde 4%/sucrose 4%, 2-3 days after transfection. They were incubated during 20 minutes at room temperature with fixation solution, then conserved in DPBS at 4°C until immunofluorescence staining preparation. Fixed cells were blocked and permeabilized by a DPBS solution with 10% of Donkey serum (DS) (Sigma-Aldrich) and 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 1 hr at room temperature (RT). They were incubated in a similar solution (DPBS, 0.2% Triton X-100, 3% DS) containing primary antibodies : GFP rabbit Polyclonal Antibody (1/200, TakaraBio, 632592), mouse monoclonal anti-GFP (1/200, Sigma-Aldrich, 11814460001), PSD-95 mouse Monoclonal Antibody 7E3-1B8 (1/200, ThermoFisher, MA1-046), PSMB5 rabbit Polyclonal Antibody, (1/200, Thermo-Scientific PA1-977) Calnexin mouse monoclonal antibody (1/500, Thermo-Scientific, MA3-027), anti-Sodium Potassium ATPase rabbit monoclonal antibody (1/500, Abcam, ab76020), β3-tubulin chicken polyclonal antibody (1/500, Synaptic Systems, 302 306) during 1hr at RT. After three washes in DPBS for 10 min each, the cells were incubated for 45 min at RT with polyclonal secondary antibodies coupled to fluorophores, diluted in the same solution (DPBS, 0.2% Triton X-100, 3% DS): FP-488 Donkey anti-mouse IgG antibody (1/300), FP-488 Donkey anti-rabbit IgG antibody (1/300), FP-546 Donkey anti-mouse IgG antibody (1/300 - 1/500), FP-546 Donkey anti-rabbit IgG

For Peer Review

antibody (1/300) (Interchim) and CF™405 Goat anti-chicken IgG antibody (1/500, Sigma-Aldrich, SAB4600466). The cells were mounted with the DAPI ProLong gold antifade solution (Fisher Scientific).

Image analysis

The cellular-imaging study was performed using a confocal microscope Leica SP8 and the associated software Leica Application Suite X (LAS X). The White Light Laser (WLL) (set at 546 nm) maximum intensity was limited at 70%, the 488 nm argon laser at 30% and the 405 nm diode. Inner settings were performed depending on the emitted fluorescence from cells. Sequential acquisitions were made, and high-resolution z stack images of cells were taken with the optical magnification of x6 300 with optical section separation (z interval) of 0,6 µm. The Image co-localization Manders' coefficient (Aaron et *al.*, 2018) was used to quantify PTCHD1-GFP overlapping with each used co-marker (calnexin, PSMB5 and Na^+/K^+ APTase) and was calculated via Fiji software (with automatic thresholds), on three consecutive stack image per condition. Data analysis was carried out using GraphPad Prism 8. We used a d'Agostino-Pearson Normality test followed by an Analysis of variance (ANOVA) Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test to compare the variants of PTCHD1 with WT PTCHD1, on at least three independent experiments.

For Peer Review

Results

Missense variants in PTCHD1 in individuals with neurodevelopmental disorder

Based on the literature and on the SFARI Gene database (https://gene.sfari.org/database/human-gene/PTCHD1#variants-tab), we first collected eight missense variants. The p.(Leu73Phe), p.(Ile173Val), p.(Val195Ile), p.(His359Arg), p.(Ala470Asp) and p.(Glu479Gly) mutations were described in patients with ASD, ID or other NDD (Noor *et al.*, 2010), the p.(Ser51Asn) variant was reported in a patient with ID (Torrico et *al.*, 2015), and the p.(Lys181Thr) variant was identified by whole exome sequencing in a patient with frontal lissencephalic cortical dysplasia and seizures (Karaca et *al.*, 2015) (**Table 1**). As no functional validation was performed on these variants, the authors did not conclude

about their pathogenicity degree. The five remaining, novel variants included in our study were identified in the French National Genetics Network on Intellectual Disability from genetic molecular diagnosis purposes. The p.Pro32Arg mutation was found in a patient with ID and inherited from his mother; the p.(Pro32Leu) was identified in a patient with NDD and was also present in an uncle without description of NDD. We also collected patients with NDD and carrying the p.(Gly300Arg), p.(Tyr213Cys) variants. Interestingly, we detected a *de novo* p.(Ala310Pro) variant in a patient with ID. None of these SNVs were found in the gnomAD database, with the exception of the p.(Leu73Phe), p.(Ile173Val) and p.(Val195Ile) changes detected in 5, 34 and in 1 male individuals respectively (**Table 1**). Based on the predicted secondary structure of the PTCHD1 protein, we were able to locate the missense variants in distinct structural domains, such as transmembrane segments (Proline 32 in the first (TM) domain, Glycine 300 and Alanine 310 in the third TM domain), the extracellular loop (Serine 51, Leucine 73, Isoleucine 173, Lysine 181, Valine 195 and Tyrosine 213), or intracellular loops (Histidine 359, Alanine 470 and Glutamate 479) (**Figure 1A**).

The PTCHD1 protein is relatively intolerant to missense changes

We reviewed all the missense variants present in the general population using the gnomAD database (v2.1.1). Almost 30% less missense variants were described when compared to what would be expected (238/342), which suggests that *PTCHD1* gene would be relatively intolerant to missense changes (indicated Z-score = 2). In total, 234 missense variants are reported in the gnomAD « non-neuro » cohort, i.e. in individuals not ascertained with a neurological or psychiatric condition. The prediction of the deleterious effect of the 13 missense changes in PTCHD1 protein showed a wide range of scores, using SIFT, Polyphen-2 and UMD-Predictor softwares (**Table 1**). Although all missense variants involve amino-acids located in conserved region of PTCHD1 orthologs within vertebrates (**Figure 1B**), only 6 variants were unanimously predicted potentially damaging, including the p.(Pro32Arg), p.(Pro32Leu), p.(Tyr213Cys,) p.(Gly300Arg), p.(Ala310Pro), and p.(Glu479Gly). Consequently, without performing dedicated functional studies to assess the impact of the variants on

For Peer Review

subcellular localization of PTCHD1 at the plasma membrane, it would be difficult to interpret the pathogenicity level of the candidate variants found in patients with NDD only by *in silico* predictions.

Missense mutations impair PTCHD1 protein expression level in transfected HEK293 cells

To better determine the pathogenicity degree of the missense variants, we performed in vitro functional analyses using transfection experiments of WT and variants PTCHD1-GFP expression plasmids in various cell lines, i.e. HEK 293T (human), neuro-2a (mouse) cell lines, and mouse embryonic primary hippocampal neuronal cultures, thus providing various morphological details depending on non neuronal or differentiated neuronal cellular type. *Ptchd1* mRNA and protein expression levels were analyzed in HEK 293T cell lines, for which we did not detect any expression of an endogenous *PTCHD1* mRNA or protein (data not shown). As shown in **Figure 2A**, we confirmed that all Ptchd1-GFP cDNAs were overexpressed at similar, not statistically different levels, whereas strong decreases were observed by western blotting in the level of PTCHD1 variant proteins Pro32Arg, Pro32Leu, Lys181Thr, Tyr213Cys, Gly300Arg and Ala310Pro, when compared to WT (**Figure 2B,C**). This suggests that the stability or expression of the PTCHD1 protein is likely affected, particularly by mutations involving amino-acids located in transmembrane segments (Pro32, Gly300 and Ala310), or amino-acids present in an extra-cellular loop and that might be crucial for its spatial organization. The remaining seven PTCHD1 variants were expressed at levels similar to PTCHD1-GFP WT.

Missense variants impair PTCHD1 plasma membrane localization

We then performed subcellular localization studies of the WT and the 13 variant forms of PTCHD1 in HEK 293T, Neuro-2a and primary neuronal cultures. As seen in previous studies, the PTCHD1 protein is mostly expressed at the plasma membrane in neuronal and non-neuronal cell lines, and also enriched in dendritic spines of neurons observed in primary cell culture (Noor et *al.*, 2010; Tora et *al.*, 2017; Ung et *al.*, 2018).

Immunostaining experiments revealed that the WT PTCHD1-GFP and variant forms of PTCHD1 containing the Ser51Asn, Leu73Phe, Ile173Val, Val195Ile, His359Arg, Ala470Asp or Glu479Gly variants are mostly and similarly localized at the plasma membrane in HEK 293T (Manders' coefficient mean value: 0.7785 for WT) and in Neuro-2a transfected cells, as confirmed by co-staining with the plasma membrane cell marker (Na^+/K^+ ATPase pump) (**Figure 3A,B**). Conversely, we found a weak membrane localization for the PTCHD1 proteins with Pro32Arg, Pro32Leu, Lys181Thr, Tyr213Cys, Gly300Arg and Ala310Pro variants (**Figure 3A,B**). These findings indicate that most of the PTCHD1 proteins with these 6 variants are not efficiently addressed to the plasma membrane, which could be linked to abnormal folding of the extracellular domain (for the Lys181Thr and Tyr213Cys variants) or the transmembrane segments (For Pro32Arg, Pro32Leu, Gly300Arg and Ala310Pro variants), leading to a partial retention of the protein in the ER and subsequent degradation by the proteasome. Finally, this could explain the decreased protein expression levels found in our western blotting experiments.

We indeed confirmed the retention in the ER for the six variants using costaining with calnexin antibody (**Figure 3C,D**), as well as the colocalization with the PSMB5 antibody, a marker of proteasome P20S (**Figure S1**). Our comparative analysis in the mouse neuronal precursor Neuro-2a cells transfected with the WT and variant forms of PTCHD1-GFP confirmed our initial findings observed in HEK 293T cells (**Figure 4**).

Lastly, we evaluated the subcellular localization of the PTCHD1 variants in primary cultures of mature hippocampal neurons which exhibit specific neuronal morphological features such as dendrites, and dendritic spines. We confirmed that PTCHD1-GFP WT was expressed in dendrites and dendritic spines, colocalizing with PSD95, a specific marker of the excitatory postsynaptic structures (**Figure 5**). We also showed that neurons overexpressing the PTCHD1-GFP proteins carrying Ala470Asp, Leu73Phe, Ile173Val, His359Arg and Val195Ile variants also displayed synaptic localization without any impairment in synaptic density (**Figure 5**). We could not detect any transfected neurons overexpressing the Pro32Arg, Pro32Leu, Ser51Asn, Lys181Thr, Tyr213Cys, Gly300Arg, Ala310Pro, Glu479gly variants.

For Peer Review

Discussion

Mostly truncating mutations and genomic microdeletions of *PTCHD1* (either inherited or *de novo*) have been described in male individuals with X-linked intellectual disability and ASD (Marshall et *al.* 2008; Pinto et *al.*, 2010; Whibley et *al.*, 2010; Noor et *al.*, 2010; Filges et *al.*, 2011; Chaudhry et *al.*, 2015 ; Gambin et *al.*, 2017 ; DDD study, 2017). Furthermore the available functional studies performed so far, in cellular and animal models, were all based on the absence of *PTCHD1* expression (Wells *et al.*, 2016; Tora *et al.*, 2017; Ung *et al.*, 2018; Murakami *et al.*, 2019). The analysis of the coding sequence of *PTCHD1* gene in numerous cohorts of individuals with ID/ASD led to the description of few missense variants, however without any relevant evidence supporting their pathogenicity.

We found that six missense mutations impair the membrane localization of PTCHD1, thus confirming that non-synonymous missense variants in *PTCHD1* are likely pathogenic and responsible for a neurodevelopmental disorder. We demonstrated that PTCHD1 proteins carrying Pro32Arg, Pro32Leu, Lys181Thr, Tyr213Cys, Gly300Arg and Ala310Pro variants do not reach properly the plasma membrane in non-neuronal or neuronal cells used for overexpression studies. This model suggests that mutated PTCHD1 proteins would be likely absent at postsynaptic sites in the human brain, leading to a possible loss-of function consequence.

In view of these findings, we also found these six particular mutations induce a major decrease of PTCHD1 protein expression level. The associated pathophysiological mechanism is still speculative but would affect either the PTCHD1 sorting and trafficking toward plasma membrane, from the integration of PTCHD1 into ER to the vesicular transport, or the structural conformation of the protein, which will induce proteasomal degradation process (Ott *et al.*, 2002; Guna *et al.*, 2018). The Pro32Arg and Pro32Leu mutations are located in the first transmembrane (TM) domain and Gly300Arg and Ala310Pro are in the third TM domain. Consequently, the α helix structural organization of the TM domains would be affected with the replacement of hydrophobic residues (proline 32, glycine 300) by the charged arginine amino acid in the case of Pro32Arg and Gly300Arg. As PTCHD1 does not include

John Wiley & Sons, Inc.

For Peer Review

a peptide signal sequence at its N-terminal end, the first TM will contain the signal anchor sequence which binds the signal recognition protein (SRP) during translation and SRP leads the ribosome-nascent-chain to the ER for translocation and membrane integration (Ott *et al.*, 2002). The ineffective plasma membrane targeting of the PTCHD1 protein may be a direct clue supporting a pathological phenotype. While disrupting variants in *PTCHD1* are highly penetrant (Chaudhry *et al.*, 2015), we found that the Pro32Leu variant has also been detected in the patient's uncle who has not been diagnosed with NDD, suggesting a variable penetrance in this family, or the presence of secondary genetic/non genetic events that would compensate the impact of the PTCHD1 Pro32Leu variant.

We showed that the variants His359Arg, Ala470Asp and Glu479Gly, which are located in intracellular loops, did not impair PTCHD1 membrane localization. Prediction pathogenicity data indicated that the His359Arg and Glu479Gly variants would be deleterious. We cannot exclude the possibility that these missense variants might impact potential protein interaction sites without altering PTCHD1 expression at the membrane, similarly to what was described for the C-terminal intracellular tail (Ung *et al.*, 2018), as well as for other synaptic proteins involved in NDD (Zhang-James et al., 2019; Grant, 2019). The proband carrying the Glu479Gly mutation is diagnosed with high functioning autism, and the proband with the Ala470Asp mutation has mild ID (Noor *et al.*, 2010). The patient with the His359Arg mutation carries also a 2 kilobases deletion on Xq13.2 involving the last exon of *SLC16A2* (or monocarboxylate transporter 8, MCT8) gene involved in mild ID with hypotonia and in Allan-Herdnon-Dudley syndrome (Remerand *et al.*, 2019). Indeed Noor *et al.* (2010) noted that the patient has a severe ID with no ASD features and seizures, which is part of typical features of AHDS. Consequently, these mutations, in combination with other common or rare variants, may contribute to the neurodevelopmental phenotype, as previously suggested by Noor et al. (2010).

For Peer Review

The ClinVar database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) reports 11 missense variants in *PTCHD1* involving amino-acids included in the first extracellular loop (amino-acids 43 to 271), whereas only two missense variants are referenced in the second extracellular loop (amino acids 521 to 695).

As classically undertaken in X-linked disorders, the X-inactivation status of the patient's mothers who transmitted their variant, as well as the segregation analyses in unaffected and/or affected relatives from different generations would provide further arguments on the association of the candidate variant with the genetic disorder. This is however not always possible (i.e. *de novo* mutation or studies of trios cohorts), and the clinical validation of missense variants without functional evidence is still challenging to conclude about the pathogenicity degree, even with various prediction softwares. For example, we found that the variant Lys181Thr prevented membrane localization of PTCHD1 and caused ER retention, whereas it was predicted as benign by SIFT and Polyphen-2 (but not with UMD predictor, **Table1**). It is thus crucial to establish such experimental strategies to provide formal evidence for a relevant evaluation of missense candidate variants, as recently illustrated for the synaptic NLGN3 and NLGN4X proteins (Quartier *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2020), and to gain more knowledge on the structural organization and functional domains of the PTCHD1 protein, which is still an orphan receptor.

For Peer Review

Declaration of interests

The authors declare no competing interest

Acknowledgements

We would like to thank the patients and their families for their participation in the study. We thank Nadine Marmin and Benoit Dessay for their technical assistance in mutagenesis experimental work. We also thank the « IBiSA Electron Microscopy Facility » of the University of Tours for management and access to the confocal microscopy platform. This work was funded by the Association pour le Développement de la Neurogénétique (ADN) and The Fondation de France (Grant numbers 2021-3362 and 00089599), the Agence Nationale pour la Recherche (Grant number ANR-20-CE17-0006) to F.L., and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) for providing material support.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

Aaron, J. S., Taylor, A. B., & Chew, T. L. (2018). Image co-localization - co-occurrence versus correlation. *Journal of Cell Science 131*, jcs211847. *doi:*10.1242/jcs.211847

Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods, 7,* 248-249. *doi:*10.1038/nmeth0410-248.

For Peer Review

Bosanac, I., Maun, H. R., Scales, S. J., Wen, X., Lingel, A., Bazan, J. F., de Sauvage, F. J., Hymowitz, S. G., & Lazarus, R. A. (2009). The structure of SHH in complex with HHIP reveals a recognition role for the Shh pseudo active site in signaling. *Nature Structural and Molecular Biology, 16,* 691-697. *doi:*10.1038/nsmb.1632.

Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience, 16*, 551-563. *doi:*10.1038/nrn3992.

Chaudhry, A., Noor, A., Degagne, B., Baker, K., Bok, L. A., Brady, A. F., Chitayat, D., Chung, B. H., Cytrynbaum, C., Dyment, D., Filges, I., Helm, B., Hutchison, H. T., Jeng, L. J., Laumonnier, F., Marshall, C. R., Menzel, M., Parkash, S., Parker, M. J.; DDD Study, Raymond, L. F., Rideout, A. L., Roberts, W., Rupps, R., Schanze, I., Schrander-Stumpel, C. T., Speevak, M. D., Stavropoulos, D. J., Stevens, S. J., Thomas, E. R., Toutain, A., Vergano, S., Weksberg, R., Scherer, S. W., Vincent, J. B., & Carter, M. T. (2015). Phenotypic spectrum associated with PTCHD1 deletions and truncating mutations includes intellectual disability and autism spectrum disorder. *Clinical Genetics, 88,* 224-233. *doi:*10.1111/cge.12482.

Deciphering Developmental Disorders Study. (2017). Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature, 542,* 433-438. *doi:*10.1038/nature21062.

Filges, I., Röthlisberger, B., Blattner, A., Boesch, N., Demougin, P., Wenzel, F., Huber, A. R., Heinimann, K., Weber, P., & Miny, P. (2011). Deletion in Xp22.11: PTCHD1 is a candidate gene for X-linked intellectual disability with or without autism. *Clinical Genetics, 79,* 79-85. *doi:*10.1111/j.1399-0004.2010.01590.x.

Gambin, T., Yuan, B., Bi, W., Liu, P., Rosenfeld, J. A., Coban-Akdemir, Z., Pursley, A. N., Nagamani, S. C. S., Marom, R., Golla, S., Dengle, L., Petrie, H. G., Matalon, R., Emrick, L., Proud, M. B., Treadwell-Deering, D., Chao, H. T., Koillinen, H., Brown, C., Urraca, N., Mostafavi, R., Bernes, S., Roeder, E. R., Nugent, K. M., Bader, P. I., Bellus, G., Cummings, M., Northrup, H., Ashfaq, M., Westman, R., Wildin, R., Beck, A. E., Immken, L., Elton, L., Varghese, S., Buchanan, E., Faivre, L., Lefebvre, M., Schaaf, C. P., Walkiewicz, M., Yang, Y., Kang, S. L., Lalani, S. R., Bacino, C. A., Beaudet, A. L., Breman, A. M., Smith, J. L., Cheung, S. W., Lupski, J. R., Patel, A., Shaw, C. A., & Stankiewicz, P. (2017). Identification of novel candidate disease genes from de novo exonic copy number variants. *Genome Medicine, 9,* 83. *doi:*10.1186/s13073-017-0472-7.

Gilman, S. R., Iossifov, I., Levy, D., Ronemus, M., Wigler, M., & Vitkup, D. (2011). Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. *Neuron, 70,* 898-907. *doi:*10.1016/j.neuron.2011.05.021.

Grant, S. G. N. (2019). Synapse diversity and synaptome architecture in human genetic disorders. *Human Molecular Genetics, 28,* R219-R225. *doi:*10.1093/hmg/ddz178.

Guna, A., & Hegde, R. S. (2018). Transmembrane Domain Recognition during Membrane Protein Biogenesis and Quality Control. *Current Biology, 28,* R498-R511. *doi:*10.1016/j.cub.2018.02.004.

Karaca, E., Harel, T., Pehlivan, D., Jhangiani, S. N., Gambin, T., Coban, Akdemir, Z., Gonzaga-Jauregui, C., Erdin, S., Bayram, Y., Campbell, I. M., Hunter, J. V., Atik, M. M., Van Esch, H., Yuan, B., Wiszniewski, W., Isikay, S., Yesil, G., Yuregir, O. O., Tug Bozdogan, S., Aslan, H., Aydin, H., Tos, T., Aksoy, A., De Vivo, D. C., Jain, P., Geckinli, B. B., Sezer, O., Gul, D., Durmaz, B., Cogulu, O., Ozkinay, F., Topcu, V., Candan, S., Cebi, A. H., Ikbal, M., Yilmaz Gulec, E., Gezdirici, A., Koparir, E., Ekici, F., Coskun, S., Cicek, S., Karaer, K., Koparir, A., Duz, M. B., Kirat, E., Fenercioglu, E., Ulucan, H., Seven, M., Guran, T., Elcioglu, N.,

Yildirim, M. S., Aktas, D., Alikaşifoğlu, M., Ture, M., Yakut, T., Overton, J. D., Yuksel, A., Ozen, M., Muzny, D. M., Adams, D. R., Boerwinkle, E., Chung, W. K., Gibbs, R. A., & Lupski, J. R. (2015). Genes that Affect Brain Structure and Function Identified by Rare Variant Analyses of Mendelian Neurologic Disease. *Neuron, 88,* 499-513. *doi:*10.1016/j.neuron.2015.09.048.

Krishnan, A., Zhang R, Yao, V., Theesfeld, C. L., Wong, A. K., Tadych, A., Volfovsky, N., Packer, A., Lash, A., & Troyanskaya, O. G. (2016). Genome-wide prediction and functional characterization of the genetic basis of autism spectrum disorder. *Nature Neuroscience, 19,* 1454-1462. *doi:*10.1038/nn.4353.

Kumar, P., Henikoff, S., & Ng, P.C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols, 4,* 1073-1081. *doi:*10.1038/nprot.2009.86.

Laumonnier, F., Cuthbert, P. C., & Grant, S. G. (2007). The role of neuronal complexes in human X-linked brain diseases. *The American Journal of Human Genetics, 80*, 205-220. *doi:*10.1086/511441.

Marshall, C. R., Noor, A., Vincent, J. B., Lionel, A. C., Feuk, L., Skaug, J., Shago, M., Moessner, R., Pinto, D., Ren, Y., Thiruvahindrapduram, B., Fiebig, A., Schreiber, S., Friedman, J., Ketelaars, C. E., Vos, Y. J., Ficicioglu, C., Kirkpatrick, S., Nicolson, R., Sloman, L., Summers, A., Gibbons, C. A., 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, S. W. (2008). Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *The American Journal of Human Genetics, 82,* 477-488. *doi:*10.1016/j.ajhg.2007.12.009.

Moyses-Oliveira, M., Yadav, R., Erdin, S., & Talkowski, M. E. (2020). New gene discoveries highlight functional convergence in autism and related neurodevelopmental disorders. *Current Opinion in Genetics and Development, 65*, 195-206. *doi:*10.1016/j.gde.2020.07.001.

Murakami, Y., Imamura, Y., Saito, K., Sakai, D., & Motoyama, J. (2019). Altered kynurenine pathway metabolites in a mouse model of human attention-deficit hyperactivity/autism spectrum disorders: A potential new biological diagnostic marker. *Scientific Reports, 9,* 13182. *doi:*10.1038/s41598-019-49781-y.

Nguyen, T.A., Wu, K., Pandey, S., Lehr, A. W., Li, Y., Bemben, M. A., Badger, J. D. 2nd, Lauzon, J. L., Wang, T., Zaghloul, K. A., Thurm, A., Jain, M., Lu, W., & Roche, K.W. (2020). A Cluster of Autism-Associated Variants on X-Linked NLGN4X Functionally Resemble NLGN4Y. *Neuron, 106,* 759-768.e7. *doi:*10.1016/j.neuron.2020.03.008.

Noor, A., Whibley, A., Marshall, C. R., Gianakopoulos, P. J., Piton, A., Carson, A. R., Orlic-Milacic, M., Lionel, A. C., Sato, D., Pinto, D., Drmic, I., Noakes, C., Senman, L., Zhang, X., Mo, R., Gauthier, J., Crosbie, J., Pagnamenta, A. T., Munson, J., Estes, A. M., Fiebig, A., Franke, A., Schreiber, S., Stewart, A. F., Roberts, R., McPherson, R., Guter, S. J., Cook, E. H. Jr, Dawson, G., Schellenberg, G. D., Battaglia, A., Maestrini, E.; Autism Genome Project Consortium, Jeng, L., Hutchison, T., Rajcan-Separovic, E., Chudley, A. E., Lewis, S. M., Liu, X., Holden, J. J., Fernandez, B., Zwaigenbaum, L., Bryson, S. E., Roberts, W., Szatmari, P., Gallagher, L., Stratton, M. R., Gecz, J., Brady, A. F., Schwartz, C. E., Schachar, R. J., Monaco, A. P., Rouleau, G. A., Hui, C. C., Raymond, F. L., Scherer, S. W., & Vincent, J. B. (2010). Disruption at the PTCHD1 Locus on Xp22.11 in Autism spectrum disorder and intellectual disability. *Science Translational Medicine, 2,* 49ra68. *doi:*10.1126/scitranslmed.3001267.

Ott, C. M., & Lingappa, V.R. (2002). Integral membrane protein biosynthesis: why topology is hard to predict. *Journal of Cell Science, 115,* 2003-2009.

Parenti, I., Rabaneda, L.G., Schoen, H., & Novarino, G. (2020). Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways. *Trends in Neuroscience, 43*, 608-621. *doi:*10.1016/j.tins.2020.05.004.

Pinto, D., Pagnamenta, A. T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., Regan, R., Conroy, J., Magalhaes, T. R., Correia, C., Abrahams, B. S., Almeida, J., Bacchelli, E., Bader, G. D., Bailey, A. J., Baird, G., Battaglia, A., Berney, T., Bolshakova, N., Bölte, S., Bolton, P. F., Bourgeron, T., Brennan, S., Brian, J., Bryson, S. E., Carson, A. R., Casallo, G., Casey, J., Chung, B. H., Cochrane, L., Corsello, C., Crawford, E. L., Crossett, A., Cytrynbaum, C., Dawson, G., de Jonge, M., Delorme, R., Drmic, I., Duketis, E., Duque, F., Estes, A., Farrar, P., Fernandez, B. A., Folstein, S. E., Fombonne, E., Freitag, C. M., Gilbert, J., Gillberg, C., Glessner, J. T., Goldberg, J., Green, A., Green, J., Guter, S. J., Hakonarson, H., Heron, E. A., Hill, M., Holt, R., Howe, J. L., Hughes, G., Hus, V., Igliozzi, R., Kim, C., Klauck, S. M., Kolevzon, A., Korvatska, O., Kustanovich, V., Lajonchere, C. M., Lamb, J. A., Laskawiec, M., Leboyer, M., Le Couteur, A., Leventhal, B. L., Lionel, A. C., Liu, X. Q., Lord, C., Lotspeich, L., Lund, S. C., Maestrini, E., Mahoney, W., Mantoulan, C., Marshall, C. R., McConachie, H., McDougle. C. J., McGrath, J., McMahon, W. M., Merikangas, A., Migita, O., Minshew, N. J., Mirza, G. K., Munson, J., Nelson, S. F., Noakes, C., Noor, A., Nygren, G., Oliveira, G., Papanikolaou, K., Parr, J. R., Parrini, B., Paton, T., Pickles, A., Pilorge, M., Piven, J., Ponting, C. P., Posey, D. J., Poustka, A., Poustka, F., Prasad, A., Ragoussis, J., Renshaw, K., Rickaby, J., Roberts, W., Roeder, K., Roge, B., Rutter, M. L., Bierut, L. J., Rice, J. P., Salt, J., Sansom, K., Sato, D., Segurado, R., Sequeira, A. F., Senman, L., Shah, N., Sheffield, V. C., Soorya, L., Sousa, I., Stein, O., Sykes, N., Stoppioni, V., Strawbridge, C., Tancredi, R., Tansey, K., Thiruvahindrapduram, B., Thompson, A. P., Thomson, S., Tryfon, A., Tsiantis, J., Van Engeland, H., Vincent, J. B., Volkmar, F., Wallace, S., Wang, K., Wang, Z., Wassink, T. H., Webber, C., Weksberg, R., Wing, K., Wittemeyer, K., Wood, S., Wu, J., Yaspan, B. L., Zurawiecki, D., Zwaigenbaum, L., Buxbaum, J. D., Cantor, R. M., Cook, E. H., Coon, H., Cuccaro, M. L., Devlin, B., Ennis, S., Gallagher, L., Geschwind, D. H., Gill, M., Haines, J. L., Hallmayer, J., Miller, J., Monaco, A. P., Nurnberger, J. I. Jr, Paterson, A. D., Pericak-Vance, M. A., Schellenberg, G. D., Szatmari, P., Vicente, A. M., Vieland, V. J., Wijsman, E. M., Scherer, S. W.,

Sutcliffe, J. S., & Betancur, C. (2010). Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature, 466,* 368-372. *doi:*10.1038/nature09146.

Quartier, A., Courraud, J., Thi Ha, T., McGillivray, G., Isidor, B., Rose, K., Drouot, N., Savidan, M. A., Feger, C., Jagline, H., Chelly, J., Shaw, M., Laumonnier, F., Gecz, J., Mandel, J. L., & Piton, A. (2019). Novel mutations in NLGN3 causing autism spectrum disorder and cognitive impairment. *Human Mutation, 40,* 2021-2032. *doi:*10.1002/humu.23836.

Remerand, G., Boespflug-Tanguy, O., Tonduti, D., Touraine, R., Rodriguez, D., Curie, A., Perreton, N., Des Portes, V., Sarret, C.; RMLX/AHDS Study Group. (2019). Expanding the phenotypic spectrum of Allan-Herndon-Dudley syndrome in patients with SLC16A2 mutations. *Developmental Medicine and Child Neurology, 61,* 1439-1447. *doi:*10.1111/dmcn.14332.

Salgado, D., Desvignes, J. P., Rai, G., Blanchard, A., Miltgen, M., Pinard, A., Lévy, N., Collod-Béroud, G., & Béroud, C. (2016). UMD-Predictor: A High-Throughput Sequencing Compliant System for Pathogenicity Prediction of any Human cDNA Substitution. *Human Mutation, 37,* 439-446. *doi:*10.1002/humu.22965.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology, 7,* 539. *doi:*10.1038/msb.2011.75.

Tora, D., Gomez, A. M., Michaud, J. F., Yam, P. T., Charron, F., & Scheiffele, P. (2017). Cellular Functions of the Autism Risk Factor PTCHD1 in Mice. *Journal of Neuroscience, 37,* 11993-12005. *doi:*10.1523/JNEUROSCI.1393-17.2017.

Torrico, B., Fernàndez-Castillo, N., Hervás, A., Milà, M., Salgado, M., Rueda, I., Buitelaar, J. K., Rommelse, N., Oerlemans, A. M., Bralten, J., Freitag, C. M., Reif, A., Battaglia, A., Mazzone, L., Maestrini, E., Cormand, B., & Toma, C. (2015). Contribution of common and rare variants of the PTCHD1 gene to autism spectrum disorders and intellectual disability. *European Journal of Human Genetics, 23,* 1694-1701. *doi:*10.1038/ejhg.2015.37.

Ung, D. C., Iacono, G., Méziane, H., Blanchard, E., Papon, M. A., Selten, M., van Rhijn, J. R., Montjean, R., Rucci, J., Martin, S., Fleet, A., Birling, M.C., Marouillat, S., Roepman, R., Selloum, M., Lux, A., Thépault, R. A., Hamel, P., Mittal, K., Vincent, J. B., Dorseuil, O., Stunnenberg, H. G., Billuart, P., Nadif Kasri, N., Hérault, Y., & Laumonnier, F. (2018). Ptchd1 deficiency induces excitatory synaptic and cognitive dysfunctions in mouse. *Molecular Psychiatry, 23,* 1356-1367. *doi:*10.1038/mp.2017.39.

Wells, M. F., Wimmer, R. D., Schmitt, L. I., Feng, G., & Halassa, M. M. (2016). Thalamic reticular impairment underlies attention deficit in Ptchd1(Y/-) mice. *Nature, 532,* 58-63. *doi:*10.1038/nature17427.

Whibley, A. C., Plagnol, V., Tarpey, P. S., Abidi, F., Fullston, T., Choma, M. K., Boucher, C. A., Shepherd, L., Willatt, L., Parkin, G., Smith, R., Futreal, P. A., Shaw, M., Boyle, J., Licata, A., Skinner, C., Stevenson, R. E., Turner, G., Field, M., Hackett, A., Schwartz, C. E., Gecz, J., Stratton, M. R., & Raymond, F. L. (2010). Fine-scale survey of X chromosome copy number variants and indels underlying intellectual disability. *The American Journal of Human Genetics, 87,* 173-188. *doi:*10.1016/j.ajhg.2010.06.017.

Zhang-James, Y., Vaudelv M., Mjaavattenv O., Bervenv F. S., Haavikv J., & Faraone, S.V. (2019). Effect of disease-associated SLC9A9 mutations on protein-protein interaction networks: implications for

molecular mechanisms for ADHD and autism. *ADHD Attention Deficit Hyperactivity Disorders, 11,* 91-105. *doi:*10.1007/s12402-018-0281-x.

For Peer Review

Figure Legends

Figure 1. Schematic representation of the structural organization of PTCHD1 protein and localization of the variants. (A) The predicted secondary structure of PTCHD1 protein (NP_775766.2, 888 amino-acids) has been generated using TMHMM server 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/), revealing the 12 transmembrane domains (their respective boundaries are indicated by the amino-acid number) embedded in the plasma membrane structure, the intracellular loops, N-terminal and C-terminal ends, as well as the two extracellular loops. The missense variants are positioned with orange-colored squares, transmembrane (TM) domains by blue cylinders and the PDZ-domain binding motif (ITTV) is represented at the end of the C-terminal tail by a yellow box. (B) Clustal Omega protein sequences alignment of PTCHD1 orthologs of regions surrounding the amino-acids replaced by the missense variants (highlighted in orange). The PTCHD1 orthologs Uniprot RefSeq are: Mouse (Q14B62), chimpanzee (H2QYE5), horse (F6XSF0), xenopus (A0A6I8SSY4) and zebrafish (Q5RIV7).

Figure 2. Expression analysis of the GFP-tagged wild-type and variant PTCHD1 mRNAs and proteins in transfected HEK293T cells. (A) Expression analysis of *Ptchd1* mRNAs in HEK293T cells transfected with PTCHD1-GFP expression plasmids during 48 hours. Quantification of mRNA expression levels was measured by RT-qPCR using the reference gene *GAPDH* on total RNA lysates extracted from 3 to 4 independent transfected cultures. Data were normalized to *GAPDH* and to PTCHD1-WT condition. Analysis of variance (ANOVA) Kruskal-Wallis tests and Dunn's multiple comparisons test were done to compare expression of variant PTCHD1 with WT mRNA expression. ns: not significant; error bars represent SEM. (B) Expression analysis of PTCHD1-GFP WT and variant proteins in transiently transfected HEK 293T cells. The PTCHD1-GFP protein (130 KDa) expression was detected by SDS-PAGE and immunoblotting using an anti-GFP antibody and the actin protein was used as reference. (C) Expression analysis of PTCHD1-GFP proteins overexpressed in HEK293T cells 48 hours post-transfection. Quantifications were performed using expression of actin protein on four independent transfected cultures, and measurements were normalized to actin and WT condition. Analysis of

John Wiley & Sons, Inc.

For Peer Review

variance (ANOVA) Kruskal-Wallis tests and Dunn's multiple comparisons test were done to compare expression of variant PTCHD1 with WT protein. ns: not significant; *p<0,05; **p<0,01; *** p=0,001; error bars represent SEM. WT, wild-type; SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SEM, standard error of the mean.

Figure 3. Subcellular localization of GFP-tagged wild-type and variant PTCHD1 proteins overexpressed in HEK293T cells. (A) Representative confocal microscopy images of HEK293T cells transfected with GFP, PTCHD1 expression plasmids, GFP-tagged wild-type (WT) or variants of PTCHD1, and stained with anti-GFP antibody (PTCHD1-GFP, green), anti-Na^+/K^+ ATPase antibody (plasma membrane, red) and DAPI (nucleus, blue). n= 3 independent transfections. (B) Manders' coefficient of co-localization calculating the percentage of PTCHD1-GFP WT or variants overlapping Na^+/K^+ ATPase (plasma membrane) staining. Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons tests were made to compare each PTCHD1 variant to the WT. Normality of each condition was measured by d'Agostino-Pearson normality test. For each condition, n= 7-10 images (each one indicated by one respective dot), from 3 independent transfections(C) Representative confocal microscopy images of HEK293T cell lines transfected with GFP, PTCHD1 expression plasmids, GFP-tagged wild-type (WT) or variants of PTCHD1, and stained with anti-GFP antibody (PTCHD1-GFP, green), anti-calnexin antibody (endoplasmic reticulum (ER), red) and DAPI (nucleus, blue). n= 3 independent transfections. (D) Manders' coefficient of co-localization calculating the percentage of Ptchd1-GFP WT or variants overlapping calnexin (ER) staining. For each condition, n= 7-10 images (indicated by one respective dot), from 3 independent transfections. Scale bar, 20µm; ns: not significant; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0,0001 ; error bars represent SEM.

Figure 4. Subcellular localization of GFP-tagged PTCHD1 proteins in transfected Neuro2a cells. Representative confocal microscopy images of immunofluorescence experiments in Neuro2a cells at 48 hours post transfection and fixation. The anti-GFP antibody revealed the subcellular localization of

For Peer Review

Ptchd1-GFP WT or variant forms (green fluorescence). The DAPI staining indicates the position of the nuclei. The subcellular compartments targeted in our analysis were: (A) the plasma membrane (Na^+/K^+ ATPase antibody, red), (B) the endoplasmic reticulum (Calnexin antibody, red), or (C) the proteasome 20S (PSMB5 antibody, red). n = 3 independent transfections, with a minimum of 6 to 8 images for each condition. Scale bar, 20µm.

Figure 5. Synaptic localization of PTCHD1 variants in primary neuronal cultures. Mature hippocampal primary neuronal cultures were transiently transfected with PTCHD1-GFP WT, p.Leu73Phe, p.Ile173Val, p.Val195Ile, p.His359Arg and p.Ala470Asp variant constructs. The immunocytochemistry was performed using an anti-GFP antibody (PTCHD1-GFP, green) and an anti-PSD95 antibody for labelling the dendritic spines (red). The synaptic overlapping signals (yellow dots) are indicated by white arrowheads. n= 2 independent transfections, with 2 neurons for each transfection. Scale bar, 15µm.

For Peer Review

Figure 1

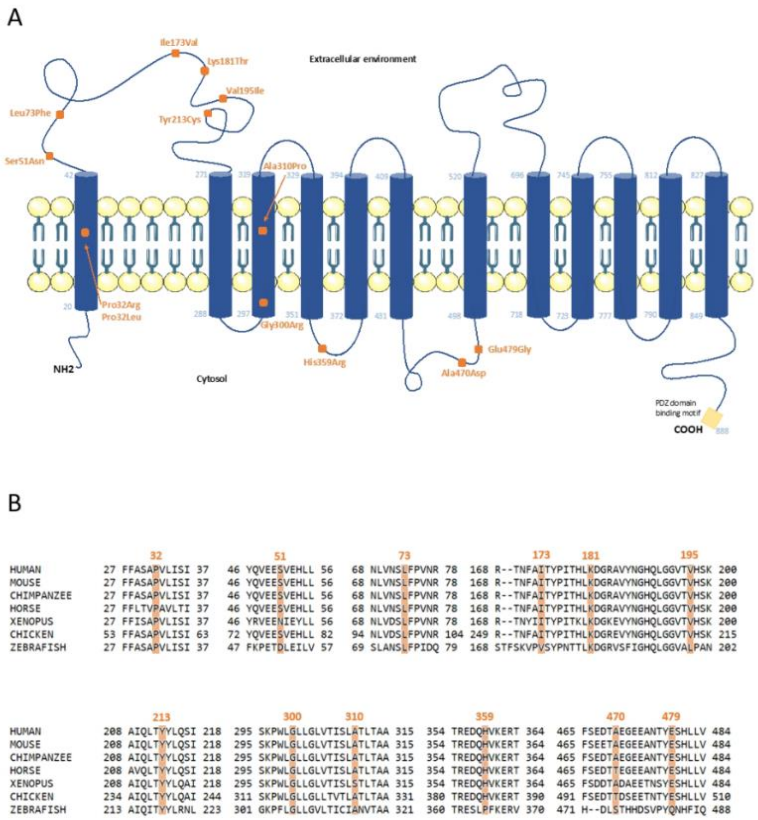


Figure 1

190x275mm (150 x 150 DPI)

Figure 2

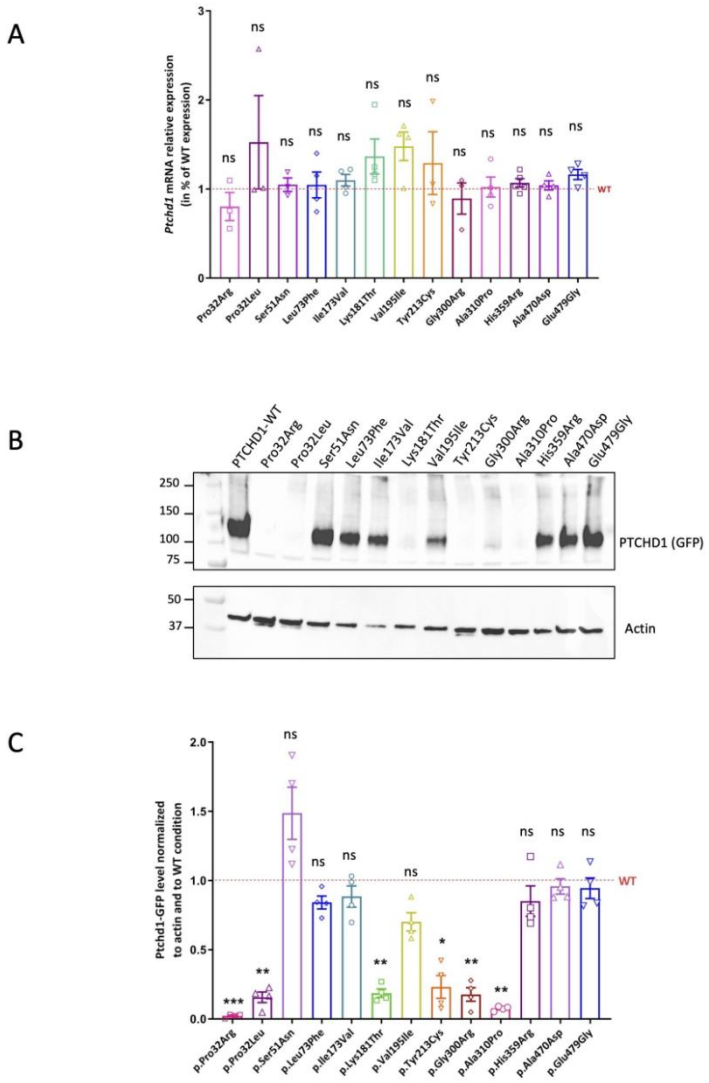


Figure 2

169x244mm (300 x 300 DPI)

Figure 3

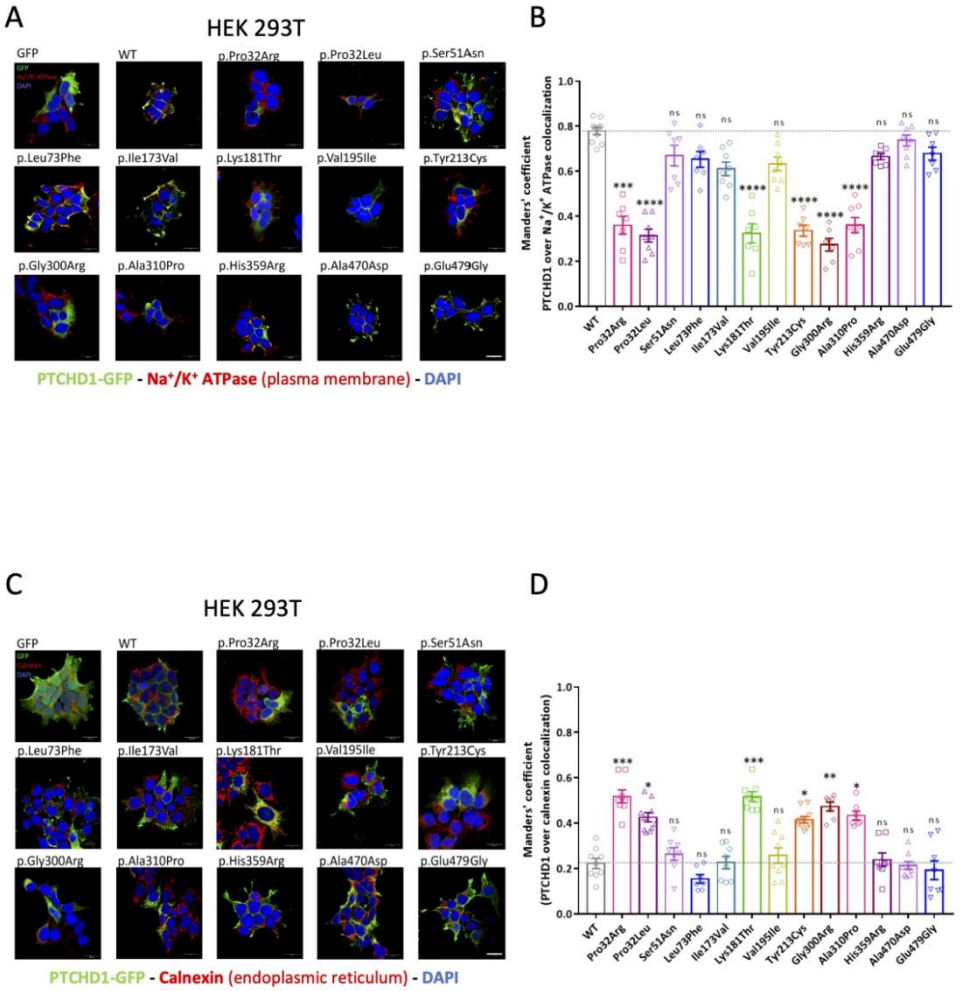


Figure 3

187x221mm (300 x 300 DPI)

Figure 4

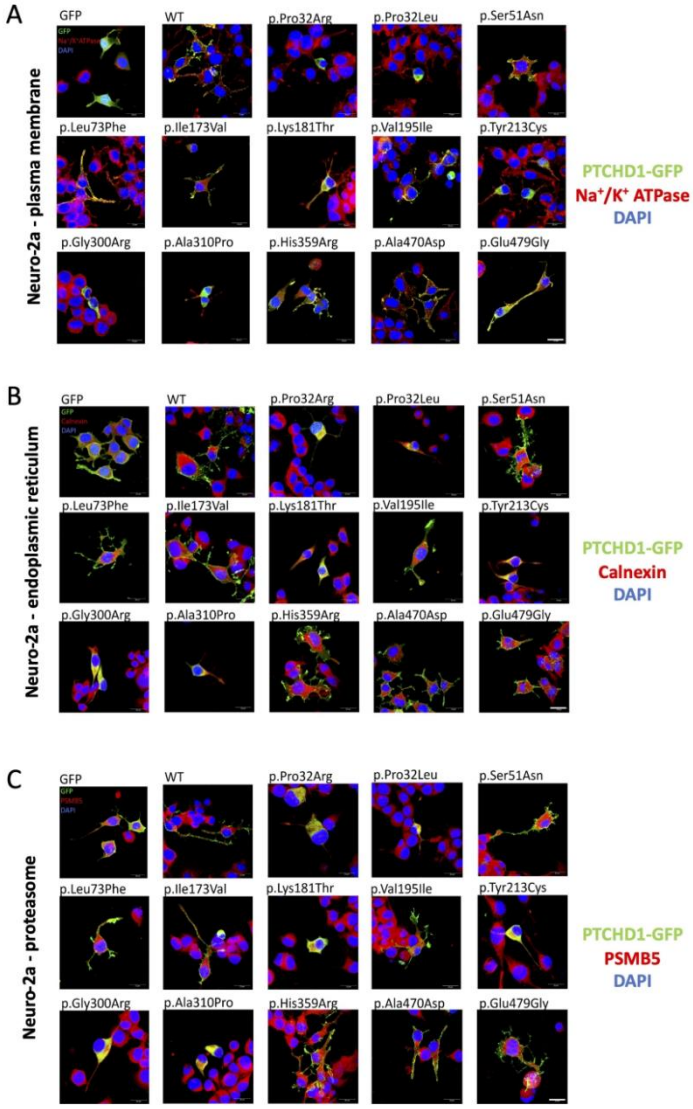


Figure 4

163x256mm (300 x 300 DPI)

Figure 5

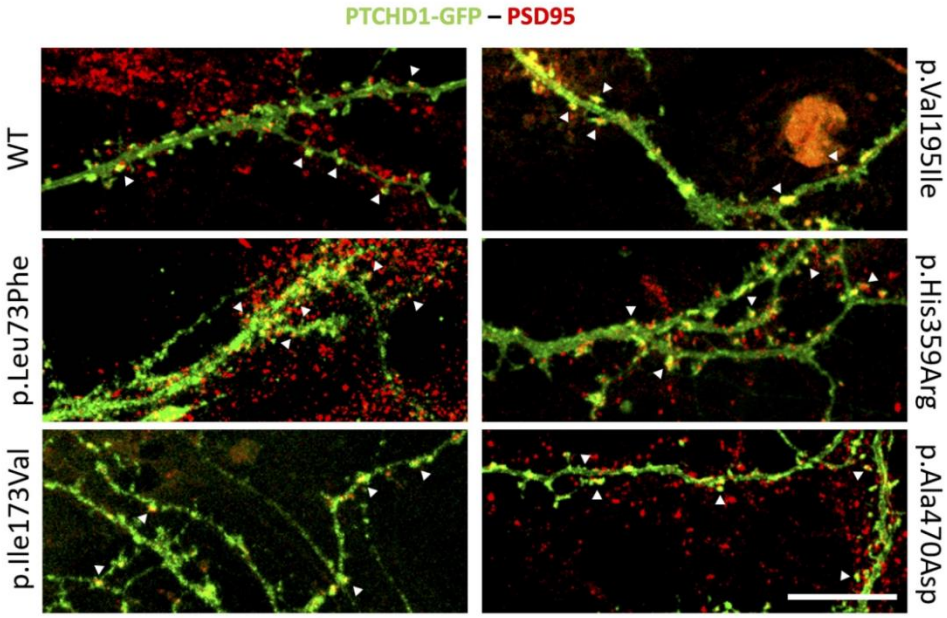


Figure 5

184x161mm (300 x 300 DPI)

Table 1. Clinical, molecular, in silico pathogenicity prediction details and functional analyses on the thirteen missense *PTCHD1* variants included in the study

PTCHD1 variant	*PTCHD1* exon	Localization in *PTCHD1* (NM_173495.3)	Protein domain	Neurodevelopmental phenotype	Inheritance	Other genetic findings	Hemizygous subjects in gnomAD (v2.1.1)	Pathogenicity prediction scores			Plasma Membrane localization	Reference
								SIFT	Polyphen-2 (HumDiv / HumVar)	UMD predictor		
p.Pro32Leu	Exon 1	c.95C>T	1st TM	NDD	maternal	detected in one uncle without NDD	none	Not tolerated	Probably damaging	Pathogenic	impaired	Novel (Lyon)
p.Pro32Arg	Exon 1	c.95C>G	1st TM	ID, ASD, congenital ataxia (normal brain MRI at 2 years old)	maternal	n/a	none	Not tolerated	Probably damaging	Pathogenic	impaired	Novel (Lille)
p.Ser51Asn	Exon 1	c.152G>A	1st EC loop	ID	n/a	n/a	none	Tolerated	Benign	Polymorphism	yes	Torrico *et al.*, 2015
p.Leu73Phe	Exon 1	c.217C>T	1st EC loop	ASD	maternal	n/a	5	Not tolerated	Benign	Polymorphism	yes	Noor *et al.*, 2010
p.Ile173Val	Exon 2	c.517A>G	1st EC loop	Proband 1 : ASD Proband 2 : ASD, ID hyperactivity, weak motor coordination	maternal	*de novo* deletion including *DPYD* in proband 2	34	Tolerated	Benign	Polymorphism	yes	Noor *et al.*, 2010
p.Lys181Thr	Exon 2	c.542A>C	1st EC loop	Cortical Dysplasia, frontal lissencepahly	maternal	n/a	none	Tolerated	Benign	Pathogenic	impaired	Karaca *et al.*, 2015
p.Val195Ile	Exon 2	c.583G>A	1st EC loop	ASD, speech disorder	maternal	*de novo* deletion of *DPP6*	1	Tolerated	Probably damaging / Benign	Polymorphism	yes	Noor *et al.*, 2010
p.Tyr213Cys	Exon 2	c.638A>G	1st EC loop	NDD	maternal	n/a	none	Not tolerated	Probably damaging	Pathogenic	impaired	Novel (Paris/Strasbourg)
p.Gly300Arg	Exon 2	c.898G>C	3rd TM	NDD	maternal	n/a	none	Not tolerated	Probably damaging	Pathogenic	impaired	Novel (Lille)
p.Ala310Pro	Exon 2	c.928G>C	3rd TM	NDD	*de novo*	de novo 16p11.2 deletion	none	Not tolerated	Probably damaging	Pathogenic	impaired	Novel (Paris)
p.His359Arg	Exon 3	c.1076A>G	IC loop between 4th and 5th TM	Severe ID	maternal	+ 2 Kb deletion involving last exon of *SLC16A2*	none	Not tolerated	Benign	Pathogenic	yes	Noor *et al.*, 2010
p.Ala470Asp	Exon 3	c.1409C>A	IC loop between 6th and 7th TM	Moderate ID	maternal	n/a	none	Tolerated	Benign	Polymorphism	yes	Noor *et al.*, 2010
p.Glu479Gly	Exon 3	c.1436A>G	IC loop between 6th and 7th TM	ASD	maternal	n/a	none	Not tolerated	Probably damaging	Pathogenic	yes	Noor *et al.*, 2010

† Abbreviations: ASD, Autism Spectrum Disorder; EC, extracellular; IC, Intracellular; ID, Intellectual Disability; NDD, Neurodevelopmental Disorder; n/a, not available; TM, Transmembrane domain

For Peer Review

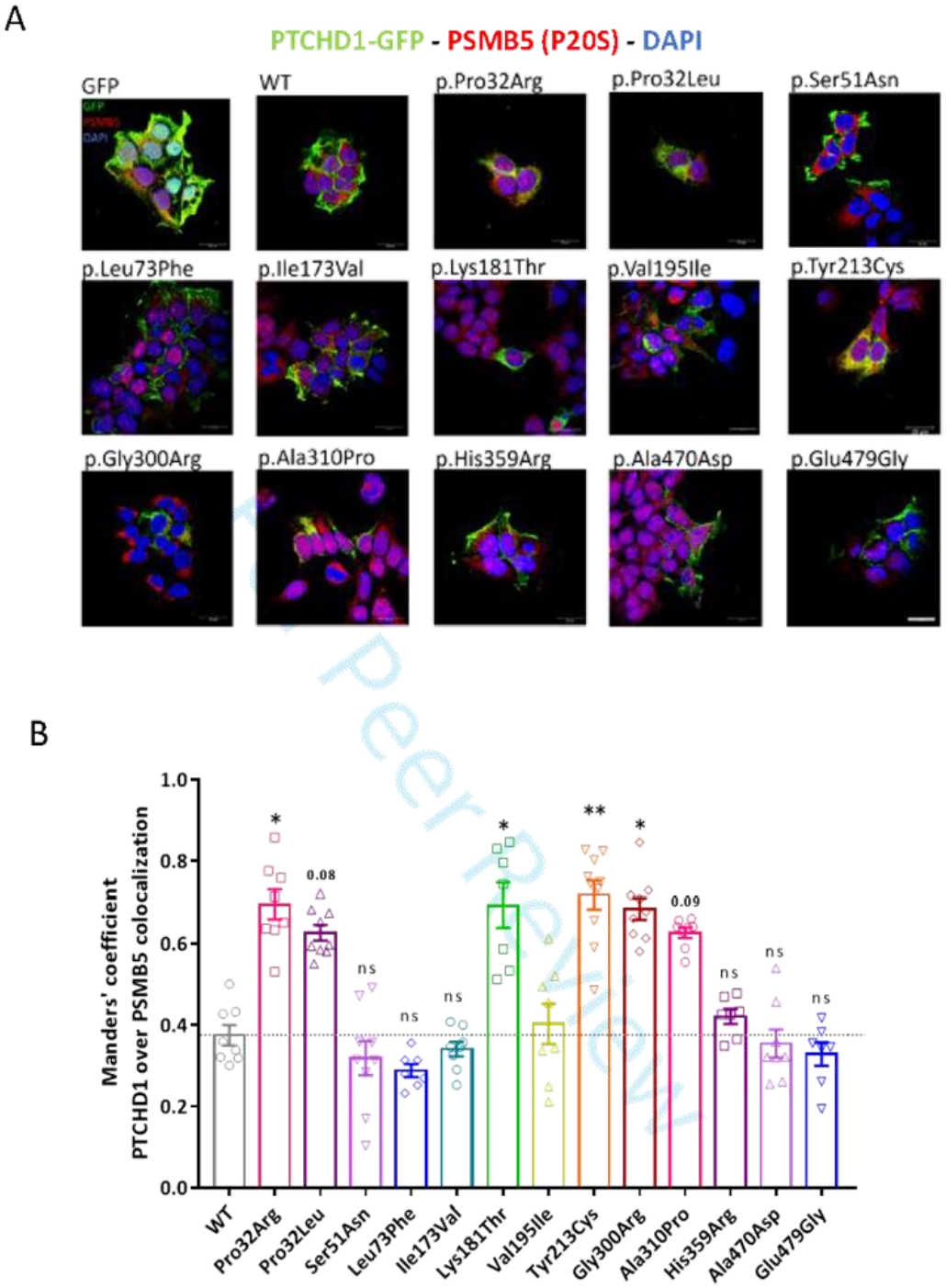


Figure S1. Colocalization analysis of PTCHD1-GFP proteins within the proteasome in HEK 293T cells. (A) Representative confocal microscopy images of HEK293T cell lines transfected with GFP, PTCHD1 expression plasmids, GFP-tagged wild-type (WT) or variants of PTCHD1, and stained with anti-GFP antibody (PTCHD1-GFP, green), anti-PSMB5 antibody (Proteasome P20S, red) and DAPI (nucleus, blue). Scale bar, 20µm. (B) Manders' coefficient of co-localization calculating the percentage of PTCHD1-GFP WT or variants overlapping PSMB5 staining. Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons tests were made to compare each Ptchd1 variant to the WT. Normality of each condition was measured by d'Agostino-Pearson normality test. n= 3 independent transfections with 7-10 images analyzed per condition. ns: not significant; *p<0.05; **p<0,01; error bars represent SEM. Scale bar, 20µm.

Table S1. List and sequence of the back-to-back primers used for the site-directed mutagenesis. The lower case letter in the sequence indicates the nucleotide variant. Designed using NEBaseChanger.neb.com website.

Oligo name	Sequence
PTCHD1mus-Pro32Leu_F	GCTTCGGCGCtGGTGCTCATC
PTCHD1mus-Pro32Leu_R	AAAGAAGACCGGGTGACTGGC
PTCHD1mus-Pro32Arg_F	GCTTCGGCGCgGGTGCTCATC
PTCHD1mus-Pro32Arg_R	AAAGAAGACCGGGTGACTGG
PTCHD1mus-Ser51ASN_F	GTCGAAGAGAaCGTGGAGCAC
PTCHD1mus-Ser51ASN_R	CTGGTAGCGGCTGAAGCT
PTCHD1mus-Leu73Phe_F	AGTCAACAGCtTCTTCCCGGT
PTCHD1mus-Leu73Phe_R	AGGTTGCGCTCGATCTTG
PTCHD1mus-Ile173Val_F	CAATTTTGCTgTCACATATCCGATCACTCAC
PTCHD1mus-Ile173Val_R	GTCCGATTGGTGGCCCGA
PTCHD1mus-Lys181Thr_F	GCTATCACATcTCCGATCACTC
PTCHD1mus-Lys181Thr_R	AAAATTGGTCCGATTGGTG
PTCHD1mus-Val195Ile_F	ACTCGGAGGTaTCACTGTGCA
PTCHD1mus-Val195Ile_R	TGGTGCCCATTATACACAG
PTCHD1mus-Tyr213Cys_F	CAGCTTACCTgCTATCTGCAATC
PTCHD1mus-Tyr213Cys_R	AATGGCCTCTGCAGATTTC
PTCHD1mus-Ala310Pro_F	CATAAGCCTAcCCACTCTCACTG
PTCHD1mus-Ala310Pro_R	GTCACCAACCCAAGTAGG
PTCHD1mus-Gly300Arg_F	ACCCTGGTTAcGCCTACTTGGG
PTCHD1mus-Gly300Arg_R	TTGCTGCGGACACAGGTCC
PTCHD1mus-His359Arg_F	GAGGACCAACgTGTTAAAGAG
PTCHD1mus-His359Arg_R	TCTAGTTTTCCTCCACGAG
PTCHD1mus-Ala470Asp_F	GAGGAAACAGaTGAAGGTGAG
PTCHD1mus-Ala470Asp_R	ACTGAATCTAGCCGTCAG
PTCHD1mus-Glu479Gly_F	AACACTTATGgGAGTCACTTATTGG
PTCHD1mus-Glu479Gly_R	TGCTTCCTCACCTTCAGC

For Peer Review

Discussion générale

PTCHD1 est aujourd'hui considéré comme un des gènes majeurs de la composante génétique de l'étiologie des troubles neurodéveloppementaux (TND), notamment des TSA et de la DI. En effet, l'ensemble de mutations et des CNV comprenant le gène *PTCHD1* et ses alentours sont retrouvés chez près de 1% des patients atteints de TND. C'est pourquoi la compréhension du rôle de la protéine PTCHD1 serait une avancée majeure dans la recherche sur le développement et le fonctionnement des synapses, ainsi que son impact dans les TND. Nos recherches devraient fournir de nouvelles clefs qui contribueront aussi bien à la compréhension du rôle physiologique de la protéine PTCHD1 et du fonctionnement synaptique, qu'à l'implication physiopathologique de cette protéine dans les TND.

Les recherches présentées dans cette thèse permettent donc d'apporter quelques nouveaux éléments qui permettront de contribuer *in fine* à la caractérisation complète de la protéine PTCHD1. La recherche autour de l'interactome de PTCHD1 permet de placer celle-ci au sein d'une voie de signalisation, ce qui permettrait de pouvoir poser des hypothèses sur sa fonction. Ce fut le cas lors de la découverte de l'interaction entre PTCHD1 et les protéines de l'échafaudage post-synaptique PSD-95 et DLG3 (SAP102) au niveau du motif de liaison aux domaines PDZ à l'extrémité de la queue C-terminale intracellulaire de PTCHD1, qui a permis de valider la présence effective de PTCHD1 au sein de la région post-synaptique des neurones glutamatergiques et de conjecturer sur sa participation à des fonctions synaptiques. La découverte d'une interaction possible entre PTCHD1 avec une protéine effectrice au sein de diverses voies comme RAC1 permet donc d'apporter de nouvelles pistes sur la caractérisation de la fonction de PTCHD1, surtout s'il a été établi que cette interaction se situe au niveau d'une autre région de la queue C-terminale que celle se liant à PSD-95 et DLG3.

I - Etude de l'interaction entre PTCHD1 et RAC1

Notre étude de l'interaction entre PTCHD1 avec la protéine RAC1 nous a donc permis la mise en évidence de **l'interaction entre RAC1 avec PTCHD1 au niveau d'un motif précis, la région entre la position 4 à 11 de la queue C-terminale de PTCHD1** (853 à 860 pour la protéine entière), une région qui avait été examiné en raison de la grande majorité de lysine qui y sont présentes. Un motif de liaison est mis en évidence, composé des acides aminés **KKKRKEKK**, est un motif chargé positivement. Bien que les données actuelles semblent toutes converger vers une interaction effective de ces deux protéines (colocalisation subcellulaire, détection par spectrométrie de masse et immunoblot

après GST pull-down), ce résultat n'a malheureusement pas pu être validé par co-immunoprécipitation de PTCHD1-GFP ou RAC1-Myc.

Comme il a été observé, ces expérimentations ont rencontré des difficultés de protocole. La présence du signal de PTCHD1-GFP dans les éluats de lysats protéiques co-exprimant PTCHD1-GFP et RAC1-Myc après une immunoprécipitation anti-Myc suggère une interaction effective entre les deux protéines, mais sa présence dans le lysat dépourvu de RAC1-Myc invalide nos résultats. Un signal de PTCHD1-GFP est aussi détecté dans l'éluat du contrôle positif, l'immunoprécipitation anti-GFP, ce qui nous ne nous permet de conclure ni à la présence, ni à l'absence d'une interaction entre les deux protéines. A l'inverse, le signal RAC1-Myc n'a pas été retrouvé dans les éluats réalisés à partir de lysats contenant les deux protéines après une immunoprécipitation anti-GFP, même après avoir réussi à intensifier le signal faible de RAC1-Myc. Il semblerait alors que dans les conditions *in vitro* de nos expérimentations, RAC1 et PTCHD1 n'interagissent pas ensemble.

Plusieurs hypothèses peuvent être soulevées par rapport à ces résultats contradictoires. Tout d'abord, il se pourrait que RAC1 et PTCHD1 n'interagissent tout simplement pas dans des conditions physiologiques. Il est possible que RAC1 interagisse avec un motif proche du motif riche en lysine mis en évidence dans la queue C-terminale de PTCHD1, mais avec d'autres protéines. C'est une considération à ne pas négliger, mais de nombreux indices ne soutiennent pas cette théorie.

Dans l'hypothèse que PTCHD1 et RAC1 interagissent bien ensemble, d'autres explications peuvent expliquer nos résultats négatifs. Tout d'abord, l'agrégation de PTCHD1 en conditions *in vitro*. Bien entendu, de nombreuses protéines membranaires ont pu être testées par co-immunoprécipitation dans des lysats protéiques alors qu'elles n'étaient pas ancrées au sein d'une bicouche lipidique. Or PTCHD1 possède de nombreux domaines transmembranaires (TM), ce qui la rend plus sensible à l'agrégation après une lyse cellulaire.

Nous avions certes utilisé un tampon de lyse du kit ChromoTek sans SDS ni déoxycholate (présent dans le tampon RIPA), mais remplacé avec du Nonidet P-40, un détergent non dénaturant et non ionique, recommandé pour ne pas déstabiliser les interactions interprotéiques, mais peut-être encore trop astringent pour l'intégrité de PTCHD1. Ainsi, l'objectif serait de trouver un protocole qui nous assurerait de garder PTCHD1 dans sa conformation fonctionnelle.

Nous pourrions utiliser les recommandations de solubilisation des RCPG, qui présentent également un grand nombre de domaines TM, et dont divers protocoles ont été élaborés en raison de la

difficulté à solubiliser ces protéines sans perdre leur forme native. Les derniers protocoles préconisent généralement une solubilisation préalable de la membrane plasmique avec des détergents doux qui vont déstructurer la membrane et conserver le récepteur au sein de micelles libres, comme le CHAPS, le DDM ou le sodium cholate (Grisshammer, 2009), suivi d'une étape de purification par immunoaffinité ou IMAC (immobilized metal affinity chromatography) reconnaissant un épitope poly-histidine intégré dans la queue C-terminale des RCPG (Weiß and Grisshammer, 2002), puis une étape de stabilisation, où des composés chimiques (détergents spécifiques, amphipols, bicelles ou structures de copolymères imitant la bicouche lipidique comme les nanodisques) remplacent la membrane plasmique résiduelle et maintiennent la protéine dans une conformation native *in vitro* (Wiseman *et al.*, 2020). Paradoxalement, la queue C-terminale seule et libre, fusionné à la GST en N-terminale de nos constructions GST-PTCHD1Cter mimerait plus correctement les conditions physiologiques prédite de la queue C-terminale de PTCHD1 que celle de la protéine entière solubilisé dans le cytosol.

Deuxièmement, un détail intéressant et inattendu au sein de nos résultats est la constatation que **l'expression protéique de RAC1 semble diminuer quand elle est co-transfectée avec PTCHD1**, quel que soit le promoteur utilisé pour le plasmide exprimant *Ptchd1-GFP* (pCMV, comme pour le plasmide *RAC1-Myc*, ou pCAG). De plus, il est établi que la co-expression de deux promoteurs identiques au sein d'une même cellule n'influe pas sur le niveau d'expression des transcrits, et que toute différence d'expression transcriptionnelle ou protéique serait due à des paramètres extrinsèques (Maheshri and O'Shea, 2007). De plus amples études de quantification serait à envisager pour savoir si l'expression de PTCHD1 diminue celle de RAC1. Nous pourrions alors poser l'hypothèse que PTCHD1 régule l'expression de RAC1 en l'engageant vers des voies de dégradation, plutôt que par inhibition de sa transcription, ce qui expliquerait à la fois une possible interaction entre les protéines et la réduction de la présence de RAC1 dans les cellules surexprimant PTCHD1.

Quant aux essais de détection de PTCHD1 endogène par un anticorps généré à partir d'immunisations de la queue C-terminale, nous ne sommes pas parvenus avec certitude à détecter PTCHD1 endogène malgré la validation du protocole de purification. Certains de nos anticorps détectent une bande enrichie dans les fractions synaptosomales et post-synaptiques, plus lourde que la masse moléculaire prédite de PTCHD1 de 25 à 50 kDa supplémentaires. Si le signal mis en évidence dans ces fractions est bien PTCHD1, le poids moléculaire pourrait s'expliquer par des modifications post-traductionnelles présentes chez PTCHD1 en conditions physiologiques, ou sinon des partenaires moléculaires fortement liés à la protéine, comme le cholestérol au sein de radeaux lipidiques.

Les radeaux lipidiques sont des microdomaines au niveau de la membrane plasmique riches en cholestérol, glycosphingolipides et phospholipides à chaîne hydrocarbonée saturée, souvent autour de

protéines avec glycosylphosphatidylinositol ou autres modifications post-traductionnelles, telles que la palmitoylation et la myristoylation, rendant ces domaines rigides et insolubles lors de la lyse protéique, et donc retenus dans les débris cellulaires. Fortement retrouvés au niveau de la région post-synaptique, ils sont associés à de nombreux récepteurs, comme AMPA-R (Hering, *et al.*, 2003), participant à la clusterisation des récepteurs et de leurs effecteurs (Sebastião *et al.*, 2013)

Cependant les anticorps de ces sérums ne sont pas spécifiques, ciblent avec une forte intensité des protéines qui sont loin de la taille attendue ou qui sont éliminés des lysats synaptosomaux et post-synaptiques après fractionnement, c'est pourquoi une purification du sérum pourrait être envisagée pour améliorer la détection. Etant donné qu'il a été récupéré après immunisation contre la construction GST-PTCHD1Cter, il pourrait être purifié par immunoprécipitation par GST pull-down, d'abord en récupérant le sérum incubé avec une colonne fixant la GST seule (le Prey Flow Through) pour éliminer tout anticorps ciblant la GST, puis une incubation du sérum récupéré avec une colonne fixant la GST-PTCHD1Cter où l'éluat est récupéré, permettant ainsi de concentrer les anticorps ciblant spécifiquement la queue C-terminale.

Malgré nos difficultés à confirmer l'interaction entre PTCHD1 et RAC1, nous pouvons tout de même envisager des nouvelles théories qui incluraient ces protéines au sein d'une voie de signalisation avec les données que nous avons, à commencer par l'étude de la région riche en lysine sur laquelle RAC1 interagit, le motif KKKRKEKK.

Dans la littérature, les motifs riches en acides aminés basiques et spécifiquement en lysine ou arginine sont en effet retrouvés comme des zones d'interaction entre protéines, comme les protéines ciblées par la protéine chaperonne VCP (ataxine-3, le facteur d'ubiquitination E4B, SVIP et BRCA1) (Boeddrich *et al.*, 2006) ou la kinase Arg qui interagit au niveau d'une région riche en lysine de l'intégrine β1 (Simpson *et al.*, 2015). Les séquences de localisation nucléaires (NLS) induisant la translocation des protéines du cytoplasme vers le noyau sont aussi généralement riches en lysine et arginine (Dingwall *et al.*, 1988).

Cependant, les régions d'interaction au sein de RAC1 ne sont pas définies pour fixer spécifiquement des régions riches en lysine. En effet, les domaines d'interaction notables de RAC1 sont 3 sites de liaison aux nucléotides (Nucleotide Binding Sites, NBS) qui servent à fixer le GTP ou le GDP (De *et al.*, 2020), les domaines switch (I et II) qui changent de conformation en fonction de leur état d'activation. Le domaine Switch I (ou effector domain, ED) est actif sous forme GTP et se lie à des protéines effectrices comportant un domaine CRIB (Cdc42/Rac interactive binding) de séquence consensus ISXPXXXXFXHXXHVG (Burbelo *et al.*, 1995; Swaminathan *et al.*, 2014) ainsi que d'autres

sans ce motif (effecteurs non-CRIB), tel que $p67^{phox}$ sur son motif TPR (tetrapetide repeat) avec laquelle RAC1/2-GTP forme le complexe NADPH oxydase (Lapouge *et al.*, 2000). Le domaine Switch II fixe des GEFs (VAV1, VAV2, TIAM1), induisant l'activation de RAC1 sous sa forme GTP (**Figure 41**).



Figure 41 : Domaines de RAC1. Switch1 fait partie du domaine effecteur, Switch 2 interagit avec de GEFs pour induire l'activation de RAC. NBS : Nucleotide binding sequence, PPP : motif proline, PBR Polybasic region, region riche en lysine CAAX box : motif présent au sein de protéines inclues dans des fonctions cellulaires globales (d'après De *et al.*, 2020)

RAC1 possède également un domaine dit hypervariable au niveau de l'extrémité C-terminale, appelé ainsi en raison de sa diversité au sein des Rho GTPases, qui détermine souvent la spécificité de la protéine au sein de cette famille. Chez RAC1, il est intéressant de remarquer le domaine en question contient un motif de 3 prolines ciblant les domaines SH3 comme celui de Crk, suivi d'une région riche en acides aminés basiques (polybasic region, PBR) avec les acides aminés KKRKRK (**Figure 41**), qui interagit avec diverses protéines, comme des GEFs, des protéines adaptatrices ou des kinases (mTor ou PIP-5-K) (Lam and Hordijk, 2013) Il est même précisé que de PIP-5- K interagit avec RAC1 via le motif RKR qui induit la polymérisation de l'actine (Hennik *et al.*, 2003).

Il est alors tout à fait probable que l'interaction entre PTCHD1 et RAC1 soit indirecte et que les deux protéines fassent partie d'un complexe, ce qui serait d'ailleurs une explication supplémentaire de la difficulté de mettre en évidence l'interaction entre ces deux protéines. Les candidats possibles sont à étudier autant du côté des interactants connus de RAC1 que ceux supposés et validés de PTCHD1, pour étudier leur affinité avec notre région d'intérêt.

Du côté de PTCHD1, 17 partenaires d'interaction avec la queue C-terminale de PTCHD1 ont été mis en évidence *in vitro* par spectrométrie de masse en tandem pour chromatographie liquide nanoflow après GST pull-down avec la construction GST-PTCHD1Cter. Les protéines détectées sont majoritairement soit impliquées dans l'échafaudage post-synaptique (SAP102), le cytosquelette d'actine (RAC1, alpha-adducine, Transgelin 3) ou dans le transport vésiculaire (Ap2a2, Rab3a, Lin7a et c, Syntaxin-1b, SNAP25).

L'équipe de Tora en Suisse a également mis en évidence un partenaire protéique qui interagit avec le motif de liaison au domaine PDZ, la sorting nexin SNX27, une protéine du complexe rétromère, mais également deux autres protéines interagissant avec la queue C-terminale de PTCHD1, mais indépendamment du motif ITTV, VPS26B et VPS35, qui font également partie du complexe rétromère et qui interagissent ensemble (au sein de l'hétérotrimère VPS26B-VPS29-VPS35, couplé avec l'homo/hétérodimère SNX1 et SNX2) (Collins *et al.*, 2008). Il serait intéressant d'observer si ces interactants se lient effectivement à la même région.

Par ailleurs, deux études récentes ont mis en évidence l'implication de la voie Sema3A-Plexin-A4-FARP2/RAC1 dans le branchement dendritique (Mlechkovich *et al.*, 2014; Danelon *et al.*, 2020), où le récepteur Plexin-A4, co-récepteur de la Neuropilin-1 qui est activé par Sema3A, active FARP2 via un motif de sa région intracellulaire riche en lysine, KRK. FARP2, une GEF de RAC1 exprimé exclusivement dans le cerveau, les poumons et les testicules (Kubo *et al.*, 2002) induit spécifiquement le développement du branchement dendritique des neurones corticaux durant le développement embryonnaire (Suto *et al.*, 2005) (**Figure 42**).

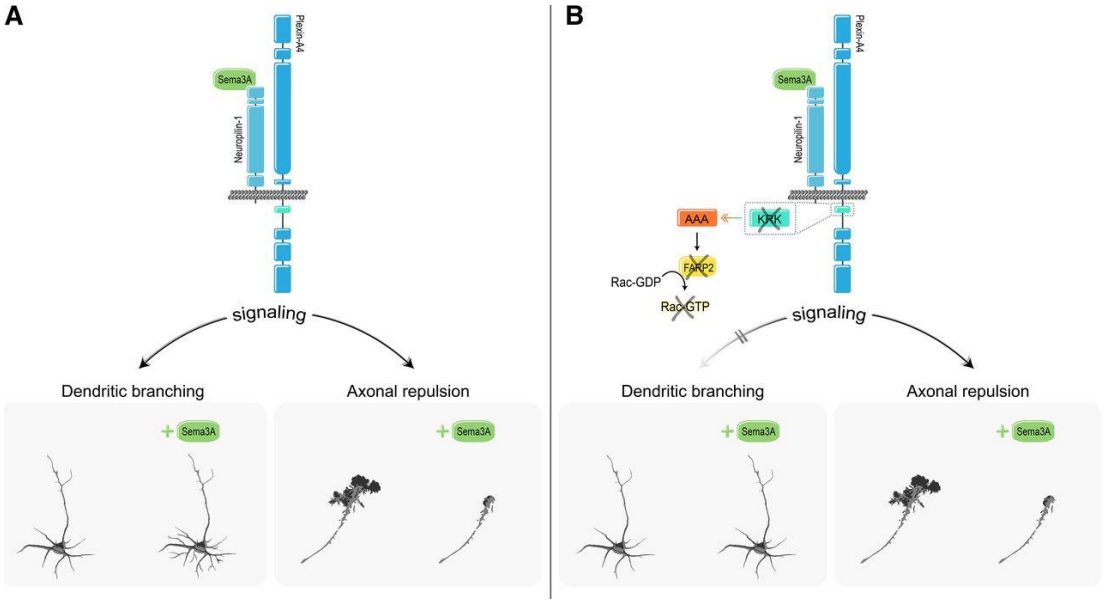


Figure 42 : La ramification dendritique est médiée par la voie Sema3A-Plexin-A4-FARP2-RAC1. (A) La plexin-A4 induit les ramifications dendritiques en activant la GEF FARP2 via le motif intracellulaire KRK, et FARP2 active ensuite RAC1. (B) Quand ce motif est remplacé par des alanines, FARP2 et par conséquent RAC1 ne sont plus activées. La perturbation de cette interaction n'a pas de conséquences sur la répulsion du cône de croissance. (Danelon *et al.*, 2020)

Ce résultat fait écho aux travaux du Dr Ung au sein de notre équipe, qui avait mis en évidence la diminution de la longueur des neurites et du branchement dendritique des neurones issues des lignées de souris *Ptchd1*$^{y/-}$ cultivées *in vitro* (Ung *et al.*, 2018). Cette hypothèse pourrait être vérifiée avec la réitération des expériences de GST pull down avec une construction de la protéine GST fusionnée avec la queue C-terminale de PTCHD1 ciblant plus spécifiquement le motif KRK de l'acide aminé 6 à 8 de

la queue C-terminale, soit en tronquant juste avant ce motif, soit en le remplaçant par des alanines, et de tester l'interaction avec RAC1, FARP2 et d'autres candidats possibles. On pourrait aussi imaginer remplacer ce motif de PTCHD1 au sein de modèles cellulaires neuronaux (de cultures primaires ou à partir d'iPS) afin d'observer un éventuel impact morphologique, à l'aide d'outils comme CRISPR-Cas9 par exemple.

Au-delà de cette région, nous pouvons également noter la présence d'une région riche en acides glutamiques entre les acides aminés 14 à 23 de la queue C-terminale, présentant le motif ENREEIECVE. Une de nos hypothèses serait que ce motif d'acides aminés, chargés négativement, pourrait être soit un motif interagissant avec d'autres protéines partenaires de PTCHD1, soit avec le motif basique KKKRKKEK. En effet, nos résultats ont montré l'augmentation de la quantité de RAC1 interagissant avec la queue C-terminale tronquée au-delà du 11e acide aminé, en l'absence de cette région. Il serait possible que le motif riche en acides glutamiques diminue partiellement l'interaction entre PTCHD1 et RAC1 par compétition. Pour aller plus loin encore, on pourrait supposer que la région riche en acides glutamiques interagit avec une autre protéine qui libère la région riche en lysine et augmente ainsi son interaction avec RAC1, ou sinon par un changement de conformation de la queue C-terminale quand le ligand hypothétique de PTCHD1 est fixé sur son récepteur. Sur le même principe, nous pourrions également utiliser de nouvelles constructions de GST-PTCHD1Cter où la région d'intérêt serait invalidée et son interaction avec RAC1 testée.

II - Analyse fonctionnelle des variants

Le second axe de notre étude s'est focalisé autour de la caractérisation physiopathologique de mutations faux-sens mises en évidence chez des patients atteints de TND, notamment de DI et de TSA, au sein d'études fonctionnelles prenant en compte le niveau d'expression génique et protéique et la localisation subcellulaire de PTCHD1.

Nos travaux ont mis en évidence deux phénotypes cellulaires parmi nos 13 mutations faux-sens au sein de cellules de lignées non-neuronales humaines (HEK 293T) et neuronales murines (Neuro-2A). **Six d'entre elles**, Pro32Arg, Pro32Leu, Lys181Thr, Tyr213Cys, Gly300Arg et Ala310Pro **entrainent une altération de la localisation membranaire de PTCHD1 ainsi qu'une diminution de son expression protéique,** alors que le phénotype des **sept autres mutations** Ser51Asn, Leu73Phe, Ile173Val, Val 195Ile, His359Arg, Ala470Asp et Glu479Gly **ne perturbent ni l'expression, ni la localisation membranaire de la protéine.** L'expression des protéines contenant **les mutations**

Leu73Phe, Ile173Val, Val195Ile, His359Arg et Ala470Asp a été retrouvée au sein des neurones des cultures primaires et présentent **une localisation subcellulaire similaire à celle de la protéine sauvage.**

Ces résultats ont été comparés aux prédictions de pathogénicité fournis par les logiciels SIFT, Polyphen-2 et UMD Predictor, et mettent en évidence la difficulté d'interpréter le niveau de pathogénicité des variants candidats trouvés chez les patients atteints de TND uniquement par des prédictions *in silico*. Parmi les six variants prédits délétères par les trois logiciels, cinq d'entre eux ont effectivement une expression altérée, sauf pour le dernier, Glu479Gly. De même, le variant Lys181Thr est considéré comme bénin par SIFT et Polyphen-2 mais pas par UMD Predictor, alors que la protéine portant cette mutation présente un phénotype cellulaire délétère. Ces constatations démontrent l'importance des études fonctionnelles pour la validation des variants dans le diagnostic génétique.

La diminution majeure de l'expression protéique induite par les mutations Pro32Arg, Pro32Leu, Lys181Thr, Tyr213Cys, Gly300Arg et Ala310Pro peut s'expliquer par un défaut physiopathologique affectant soit le transport de PTCHD1 vers la membrane (Lodish *et al.*, 2000), de l'intégration de PTCHD1 dans le RE au transport vésiculaire, soit sa conformation structurelle, qui l'induirait dans un processus de dégradation protéasomale (Ott and Lingappa, 2002; Guna and Hegde, 2018)

Notre première hypothèse est de supposer que ces variants induisent une perturbation de la structure tridimensionnelle de PTCHD1, notamment pour les mutations Pro32Arg, Pro32Leu, Gly300Arg et Ala310Pro qui se situent dans les 1er et 3e domaines transmembranaires (TM). D'une part, le remplacement de résidus hydrophobes (glycine 300 et proline 32) par un acide aminé basique dans le cas des mutations Pro32Arg et Gly300Arg, et d'autre part le changement d'encombrement stérique induit par le gain ou la perte d'un résidu proline (Chemerovski-Glikman *et al.*, 2017) pour les variants Pro32Arg, Pro32Leu et Ala310Pro provoquent probablement une déstabilisation de l'hélice α composant le domaine TM.

Notre seconde hypothèse concerne le mécanisme d'adressage membranaire des protéines multi-TM, qui recourt à la présence d'une alternance de séquences d'ancrage signal et de séquences signal d'arrêt au sein des domaines TM (Lodish *et al.*, 2000). Comme PTCHD1 n'inclut pas de séquence signal peptidique à son extrémité N-terminale, le premier domaine TM contient certainement la séquence d'ancrage de signal qui se lie, durant la traduction, à la protéine de reconnaissance de signal (SRP) qui conduit la séquence protéique naissante liée au complexe ribosomique jusqu'au RE, permettant ainsi la translocation de la chaine peptidique dans la lumière ainsi que son intégration membranaire (Ott and Lingappa, 2002). Les domaines TM sont alors chaperonnés au sein de la bicouche lipidique jusqu'à atteindre leur conformation finale. Si la maturation échoue, les domaines TM libres dans le cytosol sont

ciblées et engagées dans des voies de dégradation (Guna and Hegde, 2018). Cependant, il est à noter que le variant Pro32Leu est également détecté chez l'oncle du patient diagnostiqué et il ne présente pas de TND. Ce résultat module nos conclusions et suggère une pénétrance variable au sein d'un contexte génétique et environnemental de cette famille qui compenserait l'impact de ce variant.

Par ailleurs, le 3ème domaine TM contenant Gly300Arg et Ala310Pro appartient également au domaine de détection des stérols (SSD), ce qui est une hypothèse possible de perturbation de la fonction de la protéine, bien que la fonction du SSD au sein de PTCHD1 ne soit pas encore connue.

Pour les autres variants de PTCHD1 induisant une perte d'expression, Lys181Thr et Tyr213Cys, ces mutations sont toutes les deux situées sur la première boucle extracellulaire. La modification de la polarité et de la charge de ces deux modifications sont importantes dans les deux cas, c'est pourquoi ils sont possiblement délétères dans la maturation post-traductionnelles de la protéine. On peut par exemple supposer que la cystéine qui remplace la tyrosine 213 forme un pont disulfure inapproprié. Par ailleurs, nous avons pu observer à quelle point la perte d'intégrité de cette boucle pouvait impacter la protéine, lorsque nous avons réalisé la construction d'un plasmide contenant la GFP au niveau de la première boucle extracellulaire au lieu de la queue C-terminale. En effet, cette construction a montré une localisation subcellulaire altérée au sein des HEK 293T et une diminution de l'expression.

Les mutations Ser51Asn, Leu73Phe, Ile173Val, Val195Ile, His359Arg, Ala470Asp et Glu479Gly présentent un phénotype d'expression et de localisation subcellulaire similaire à la protéine sauvage, ce qui n'exclue pas une perturbation de la fonction protéique sans modifier l'expression de PTCHD1 au niveau de la membrane, notamment sur des sites d'interactions protéiques potentiels, de manière similaire à ce qui a été décrit pour la queue intracellulaire C-terminale de PTCHD1 (Ung *et al.*, 2018), ainsi que pour d'autres protéines synaptiques impliquées dans le TND (Grant, 2019; Zhang-James *et al.*, 2019).

Il est à noter que les mutations Leu73Phe, Ile173Val et Val195Ile sont référencées dans la base de données gnomAD et sont retrouvés respectivement chez 5, 31 et 1 individus masculins hémizygotes dans la population générale et également chez une femme homozygote pour Ile173Val, tous « non-neuro », c'est-à-dire sans troubles neuropsychiatriques (**Figure 43**). De plus Ile173Val a été répertorié chez deux patients de sexe masculin d'une famille non apparentée, tous deux acquis par transmission maternelle, mais l'un d'eux présente une délétion de novo de 1,0 Mb sur le locus 1p21.3 impliquant le gène DPYD (Noor *et al.*, 2010). DPYD code pour la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD), dont la perte de fonction est associée à divers symptômes, tels que des troubles convulsifs, un retard moteur et une DI, parfois des caractéristiques de TSA (Vreken *et al.*, 1997). Sa pathogénicité n'est donc pas

prouvée et il semble être le variant le plus fréquent au sein de PTCHD1 dans la population, et peut même être presque considéré comme un variant commun très probablement bénin.

D'autre part, le patient présentant la mutation Val195Ile possède également une délétion de novo de 66 Kb sur le locus 7q36.2 incluant le gène DPP6, codant pour la protéine dipeptidyl peptidase-like 6, un régulateur du canal potassique KCND2, qui contrôle l'excitabilité des neurones et qui est localisé au niveau des épines dendritiques par PSD-95 (Wong *et al.*, 2002), susceptible d'être un gène candidat aux TSA (Marshall *et al.*, 2008) et associé à un retard mental et à une microcéphalie (Liao *et al.*, 2013). Ces précisions ont été déjà apportées par l'équipe de Noor, et corrélées à nos données actuelles, il semblerait que les variants Leu73Phe, Ile173Val et Val195Ile n'aient qu'une faible probabilité de d'induire des TND.

Bien que prédits délétères par une majorité des logiciels de prédiction, les variants His359Arg et Glu479Gly n'altèrent pas la localisation de la membrane PTCHD1 dans nos modèles cellulaires, ainsi que les variants Ser51Asn et Ala470Asp. Dans l'étude Noor, le porteur de la mutation Glu479Gly est diagnostiqué avec un autisme de haut niveau, et celui avec la mutation Ala470Asp présente une DI légère avec clinodactylie et camptodactylie (Noor *et al.*, 2010). Quant au patient portant la mutation His359Arg, il possède également une délétion de 2 kilobases sur Xq13.2 impliquant le dernier exon du gène SLC16A2 (ou monocarboxylate transporteur 8, MCT8) impliqué dans dans le syndrome d'Allan-Herndon-Dudley (Remerand *et al.*, 2019). Noor et al. (2010) ont noté que le patient a une DI sévère sans caractéristiques de TSA, ce qui fait partie des caractéristiques typiques de l'AHDS.

Ces constatations ne permettent ni de valider ou réfuter la pathogénicité de ces variants. Cependant, l'hypothèse polygénique, suggérée par Noor et ses collègues suggérant que ces mutations, en combinaison avec d'autres variants courants ou rares, peuvent augmenter la vulnérabilité des patients à développer un trouble neurodéveloppemental, est toujours pertinente.

Pour aller plus loin et établir des suggestions concernant la physiologie de PTCHD1, deux théories sur la physiopathologie de ces sept variants au phénotype cellulaire non délétères peuvent être émises.

La première hypothèse stipule que ces variants peuvent affecter les interactions protéiques et perturber la voie de signalisation dans laquelle PTCHD1est incluse. En effet, l'ensemble de ces mutations se situent sur la première boucle extracellulaire (Ser51Asn, Leu73Phe, Ile173Val et Val195Ile) ou la troisième boucle intracellulaire (Ala470Asp et His359Arg). On pourrait supposer que ces deux dernières, à l'instar de la queue C-terminale de PTCHD1, se lierait à des partenaires protéiques intracellulaires.

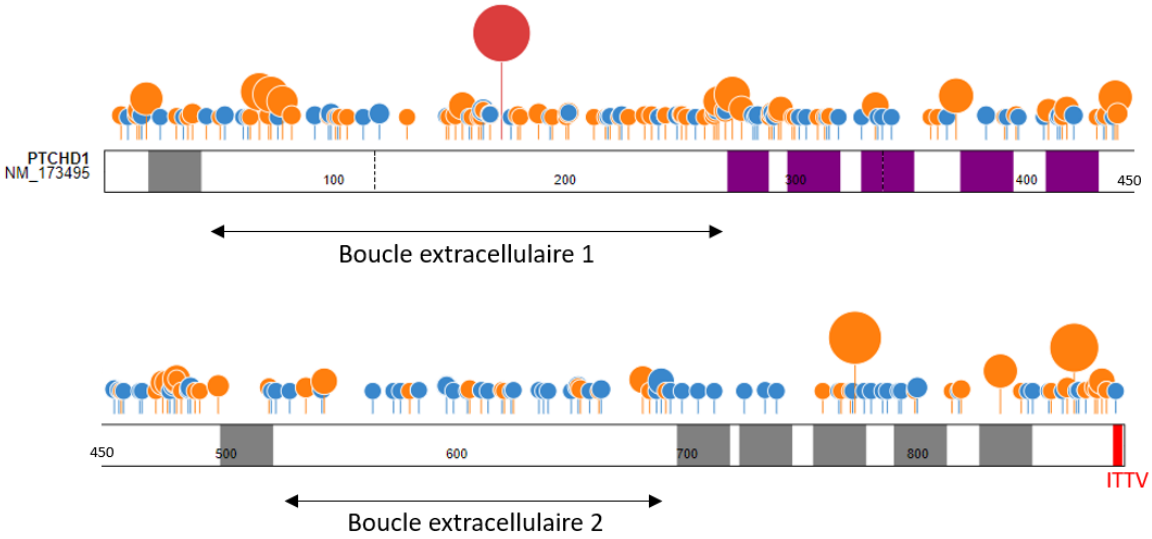


Figure 43 : Répertoire des variants faux-sens de PTCHD1. Les domaines TM sont représentées par les boites grises, les domaines TM appartenant au SSD sont en violet, le domaine de liaison aux domaines PDZ est en rouge. La taille des sphères est proportionnelle aux nombre d'individus portant le variant. En orange, les variants retrouvés chez des sujets masculins hémizygotes, en rouge, le variant Ile173Val, retrouvés 77 fois dans la population, chez 34 sujets masculins hémizygotes et un sujet féminin homozygote. En bleu ; les autres variants retrouvés dans la population (femmes hétérozygotes). Figure réalisée à partir du logiciel ProteinPaint (http://pecan.stjude.cloud/) (Zhou *et al.*, 2016)

Au-delà de l'hypothèse d'une interaction avec des protéines extracellulaires, nous pourrions suggérer que les variants sur la première boucle extracellulaire perturberaient le site de liaison de PTCHD1 avec son ligand potentiel. En effet, PTCHD1 a été prédit être comme récepteur, mais son ligand hypothétique est inconnu. En tant qu'homologue de la protéine PTCH1, Sonic hegdehog (SHH) a été testé, mais PTCHD1 n'est pas un répresseur constitutif de la famille de protéines Gli comme PTCH1 (Ung *et al.*, 2017) et n'inclut pas le site de liaison du ligand SHH présent dans la deuxième boucle extracellulaire majeure de PTCH1 (LTKQRLVDADG, acides aminés 888–898 chez PTCH1 humain) (NP_032983) (Bosanac *et al.*, 2009).

La première boucle extracellulaire de PTCHD1 serait peut-être le site de fixation d'un potentiel ligand, et les mutations répertoriées au sein de patients atteints de TND et ne présentant pas de phénotype cellulaire délétère dans nos études fonctionnelles seraient des perturbateurs de cette liaison.

Cependant, nous avons répertorié l'ensemble des variants référencés dans la base de données gnomAD dans les deux boucles extracellulaires (**Figure 43**) 66 variants sont référencées dans la première boucle (28,8% des résidus entre la position 43 et 270), dont 44 chez des sujets masculins hémizygotes (19,6%), alors que 44 variants sont répertoriés dans la deuxième boucle (25% des résidus entre la position 521 et 696) dont 12 chez des sujets masculins hémizygotes (6,8%). Les pourcentages montrent qu'il existe plus d'individus masculins hémizygotes portant des mutations dans la première boucle (dont la mutation Ile173Val) que dans la deuxième, ce qui signifierait que la première boucle serait moins intolérante aux variations que la seconde.

Une deuxième hypothèse serait que certaines de ces mutations aurait un effet dominant négatif qui perturberait d'autres voies de signalisation en dehors de la sienne, ou de gain de fonction, ce qui perturberait l'homéostasie cellulaire de la synapse, en créant un nouveau site de modification post-traductionnelle.

Nos expériences ont cependant fait face à certaines limites qui peuvent faire relativiser nos résultats. La difficulté de transfection de PTCHD1 au sein des lignées neuronales Neuro-2A et des cultures primaires de neurones hippocampiques ne nous a pas permis de pouvoir aller plus loin dans notre étude de caractérisation. En effet, bien que l'expression de toutes les protéines mutées a pu être observée par immunofluorescence dans les lignées Neuro-2A, le nombre des cellules transfectées par puits était trop faible pour que des analyses de colocalisation par calcul du coefficient de Manders soient réalisées, à l'instar de ce qui a été fait dans les cultures de HEK 293T.

Quant aux transfections des cultures primaires neuronales, le taux de neurones surexprimant la protéine est déjà très faible quand il s'agit du plasmide contenant le gène *Ptchd1* sauvage (moins de 1%), il était donc très difficile de trouver des neurones transfectés par les gènes mutées. Nous ne sommes jamais parvenus à mettre en évidence un neurone exprimant un des variants de PTCHD1 qui présente un phénotype non membranaire dans les cellules de lignées (Pro32Arg, Pro32Leu, Lys181Thr, Tyr213Cys, Gly300Arg et Ala310Pro), ainsi que Ser51Asn et Glu479Gly, qui sont pourtant exprimés à la membrane dans les Neuro-2A et dans les HEK 293T.

Etant donné que les dernières cultures dans lesquelles ont été transfectées les plasmides présentant ces deux variants ont présenté une mortalité anormale indépendante de la transfection ou du plasmide, nous ne pouvons pas conclure que ces mutations de PTCHD1 empêchent l'expression de la protéine au sein de ces neurones. Il en est de même pour les six autres variants considérés délétères, bien qu'une recherche approfondie de neurones exprimant les variants Tyr217Cys, Pro32Arg et Pro32Leu à partir de cultures viables n'ait pas aboutie.

Nous avons également dû faire face à des problèmes d'immunomarquage, notamment avec les marqueurs cellulaires. Le marqueur de la calnexine présentait une fluorescence cytoplasmique diffuse dans les Neuro-2A alors qu'elle possédait bien la forme réticulée attendue dans les HEK 293T. Le marquage de la PSMB5, sous-unité du protéasome p20S, a montré un marquage non négligeable au niveau du noyau, alors que la protéine ne s'y trouve pas. Ce signal était variable en fonction des tubes de produit. C'est pourquoi les résultats de colocalisation de PTCHD1 avec ce marqueur ont été ajoutés dans les figures supplémentaires de notre publication. Quant au marqueur membranaire de l'ATPase Na^+/K^+, il n'était pas exclusivement exprimé à la membrane plasmique, marquant probablement la pompe présente sur la membrane de compartiments vésiculaire. Un moyen d'empêcher ce marquage intracellulaire aurait été d'incuber les anticorps primaires dans une solution non perméabilisante, or la protéine PTCHD1-GFP surexprimé dans les cellules présente une fluorescence intrinsèque trop faible, c'est pourquoi un immunomarquage anti-GFP couplé à un fluorochrome absorbant à 488 nm a été réalisé afin d'intensifier le signal, et donc la solution perméabilisante était nécessaire.

Ce problème soulève la difficulté générale de la transfection des cultures primaires neuronales, ainsi que les difficultés de la surexpression ectopique. Pour estimer l'impact d'une mutation, l'élaboration de culture de neurones exprimant déjà la mutation permettrait de mettre en évidence les impacts physiopathologiques au niveau cellulaire. Ainsi, des cultures de neurones primaires issues de lignées de souris mâles KO *Ptchd1*$^{y/-}$ avaient été générés et ont permis de montrer une diminution de la longueur et du branchement neuritique des neurones KO par rapport au WT (Ung *et al.*, 2018). Des modèles cellulaires créés à partir de cellules souches induites (iPS) à partir de cellules prélevés chez des patients présentant différentes mutations permettraient de générer des neurones et de réitérer les mêmes observations, et également d'observer la formation des neurones différenciés en fonction des variations retrouvés chez chaque patient. Cependant, en l'absence d'un anticorps efficace ciblant spécifiquement PTCHD1, la localisation subcellulaire de la protéine sera difficile à déterminer.

III - Synthèse et conclusion

Ainsi l'ensemble de ces données mette en évidence différentes régions d'intérêt de la protéine PTCHD1. Nous avons vu l'importance de la préservation de l'intégrité des domaines transmembranaires, très peu tolérants aux variations, la relative plasticité de la première boucle extracellulaire qui pourrait éventuellement être le site de fixation du ligand hypothétique de PTCHD1, et bien entendu la queue C-terminale, qui sert à la fois d'ancre au sein de la zone active de la PSD et de région d'interaction avec des protéines effectrices, dont la liaison, possiblement indirecte, avec la protéine RAC1, impliquée dans la dynamique du cytosquelette.

Des questions concernant cette interaction restent en suspens, notamment si nous considérons que PTCHD1 n'interagirait pas directement avec RAC1, quels seraient alors les autres protéines impliquées dans ce complexe au niveau de la queue C-terminale. Nous pouvons également nous demander s'il s'agit de la seule région intracellulaire de PTCHD1 qui interagit avec des partenaires protéiques. En effet, la présence de deux mutations faux-sens au niveau de la troisième boucle intracellulaire, non dénaturantes pour la conformation de la protéine mais susceptibles d'induire un phénotype lié aux TND, ainsi que la région riche en acides glutamiques sur la queue C-terminale, pourrait nous faire suggérer une possible fonction au niveau de ces régions.

L'objectif des prochaines recherches serait de rassembler les différentes théories sur la fonction de PTCHD1 élaborées à partir des résultats sur son interaction avec RAC1. En effet, il a été déjà suggéré dans la thèse de Dévina Ung que PTCHD1 pouvait faire partie de la voie non canonique II de SHH, car c'est une voie impliquée entre autres dans la formation des épines dendritiques en activant RAC1 via TIAM1 (Sasaki *et al.*, 2010). Deux hypothèses avaient été posées, une où PTCHD1 favoriserait la stabilisation entre la GEF TIAM1 et RAC1, et donc induirait la formation de lamellipodes, l'autre envisageait que PTCHD1 maintiendrait RAC1 sous forme inactive, mais que la présence du ligand inconnu de PTCHD1 libérerait RAC1 pour pouvoir être activé par la voie non canonique de SHH. Cette dernière hypothèse est intéressante car elle concorderait avec la diminution de l'expression de RAC1 dans les cellules de lignées HEK 293T surexprimant PTCHD1, où celle-ci, sans ligand étant donné l'environnement non-neuronale, aurait une activité inhibitrice sur RAC1.

Une autre théorie stipulerait l'existence d'un mécanisme similaire de la signalisation du branchement dendritique induit par RAC1 activé par la Plexin-A4 via FARP2, étant donné la similarité du motif intracellulaire entre la Plexin-A4 et la région de PTCHD1 interagissant avec RAC1, ainsi que

le constat de la diminution du nombre de branches dendritiques dans les neurones issues de souris *Ptchd1* KO.

La voie de signalisation induite par PTCHD1 serait également transitoire, si on considère l'interaction de PTCHD1 avec trois protéines du complexe rétromère (Tora *et al.*, 2017), qui ferait partie d'une dynamique d'endocytose et d'exocytose régulant la présence de PTCHD1 à la membrane de la région post-synaptique (**Figure 44**).

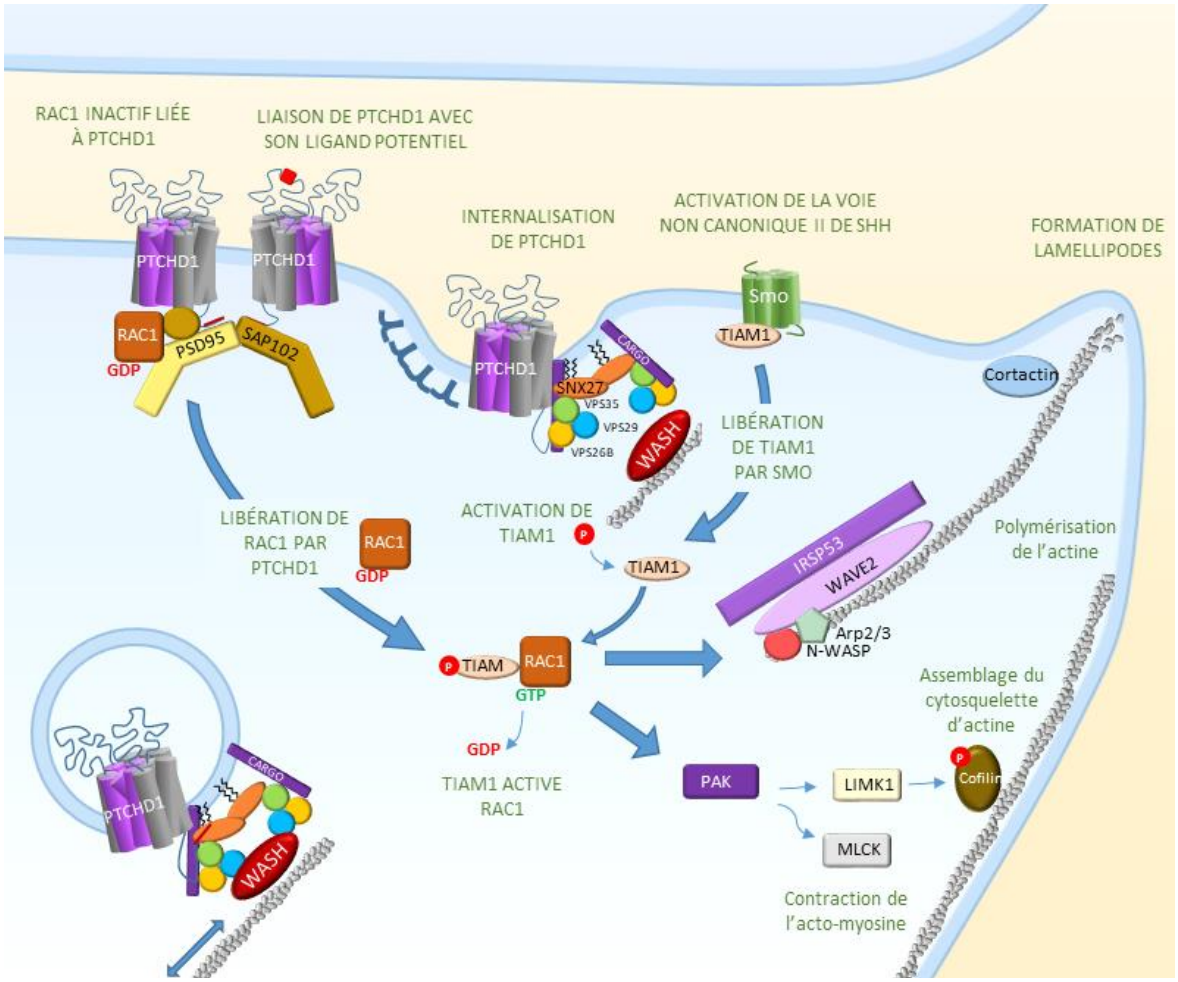


Figure 44 : Schéma incluant une voie théorique de PTCHD1, en tant que répresseur de RAC1, qui serait libérée quand PTCHD1 lie son ligand (inconnu), et serait activée par la voie non canonique II de Sonic Hedgehog via TIAM1. RAC1 activerait ensuite les différentes voies impliquées dans le modelage de l'actine.

Annexe

Article supplémentaire: Missense variants in DPYSL5 cause a neurodevelopmental disorder with corpus callosum agenesis and cerebellar abnormalities, including Ritscher-Schinzel syndrome

Cet article, soumis à ce jour dans l'*American Journal of Human Genetics*, est une étude translationnelle sur le gène *DPYSL5*, associés à des cas de malformations cérébrales conduisant à des DI, également étudié au sein de notre équipe. La protéine DPYSL5 fait partie d'une famille impliquée dans la régulation de la structure des neurites et des épines dendritiques, ainsi que dans le guidage axonal. Des études fonctionnelles ont été conduites autour de deux variants faux-sens, exprimés au sein de cultures neuronales. Ma contribution à cet article concerne la mise en place et l'entretien des cultures primaires de neurones issues d'embryons de souris, ainsi que l'encadrement de Hélène Demory lors de son stage de Master 2, qui s'est occupée d'une partie de ce projet.

AJHG The American Journal of Human Genetics

Missense variants in DPYSL5 cause a neurodevelopmental disorder with corpus callosum agenesis and cerebellar abnormalities, including Ritscher-Schinzel syndrome

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Missense variants in DPYSL5 cause a neurodevelopmental disorder with corpus callosum agenesis and cerebellar abnormalities, including Ritscher-Schinzel syndrome
Article Type:	Report
Corresponding Author:	Frédéric Laumonnier, Ph.D. Inserm UMR1253, University of Tours Tours, FRANCE
First Author:	Médéric Jeanne
Order of Authors:	Médéric Jeanne
	Hélène Demory
	Aubin Moutal
	Marie-Laure Vuillaume
	Sophie Blesson
	Rose-Anne Thépault
	Sylviane Marouillat
	Judith Halewa
	Saskia M. Maas
	Madhi Motazacker
	Grazia M.S. Mancini
	Marjon A. van Slegtenhorst
	Avgi Andreou
	Helene Cox
	Julie Vogt
	Jason Laufman
	Natella Kostandyan
	Davit Babikyan
	Miroslava Hancarova
	Sarka Bendova
	Zdenek Sedlacek
	Kimberly A. Aldinger
	Elliott Sherr
	Emanuela Argilli
	Eleina England
	Séverine Audebert-Bellanger
	Dominique Bonneau
	Estelle Colin
	Anne-Sophie Denommé-Pichon

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	Brigitte Gilbert-Dussardier
	Bertrand Isidor
	Sébastien Küry
	Sylvie Odent
	Richard Redon
	Rajesh Khanna
	William Dobyns
	Stéphane Bézieau
	Jérôme Honnorat
	Bernhard Lohkamp
	Annick Toutain
	Frédéric Laumonnier, Ph.D.
Abstract:	The Collapsin Response Mediator Protein (CRMP) family proteins are intracellular mediators of neurotrophic factors regulating neurite structure/spine formation and are essential for dendrite patterning and directional axonal pathfinding during brain developmental processes. Among this family, the CRMP5/ DPYSL5 gene plays a significant role in neuronal migration, axonal guidance, dendrite outgrowth and synapse formation by interacting with microtubules. Here we report the identification of missense variants in DPYSL5 in ten individuals with brain malformations including corpus callosum agenesis and/or posterior fossa abnormalities, associated with variable degrees of intellectual disability. A recurrent de novo p.(Glu41Lys) variant was found in 8 unrelated patients, and a p.(Gly47Arg) mutation was identified in two sisters from the first family reported with Ritscher-Schinzel syndrome. Functional analyses of the two missense mutations revealed impaired dendritic outgrowth processes in young developing hippocampal primary neuronal cultures. We further demonstrated that these mutations, both located in a same loop on the surface of DPYSL5 monomers and oligomers, reduced the interaction of DPYSL5 with neuronal cytoskeleton-associated proteins MAP2 and βIII-Tubulin. Our findings collectively indicate that the p.(Glu41Lys) and p.(Gly47Arg) variants impair DPYSL5 function on dendritic outgrowth regulation by preventing the formation of the ternary complex with MAP2 and βIII-Tubulin, ultimately leading to abnormal brain development. This study adds DPYSL5 to the list of genes implicated in brain malformation and in neurodevelopmental disorders.
Suggested Reviewers:	John Vincent, PhD university of Toronto john.vincent@camh.ca Expert in genetics of neurodevelopmental disorders
	Hans van Bokhoven University Medical Center Nijmegen: Radboudumc hans.vanbokhoven@radboudumc.nl Expert in genetics of neurodevelopmental disorders and in functional analyses
	jozef Gecz, PhD Adelaide Children's Hospital: Women's and Children's Hospital Adelaide jozef.gecz@adelaide.edu.au Gene identification and molecular analyses in intellectual disabilities
	Christiane Zweier Institute of Human Genetics, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany christiane.zweier@uk-erlangen.de Clinical translational research in neurodevelopmental disorders
	Barbara Bardoni Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, Institute of Molecular and Cellular Pharmacology, Valbonne Sophia Antipolis, France bardoni@ipmc.cnrs.fr

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	Molecular and functional studies on neurodevelopmental disorders
Opposed Reviewers:	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Manuscript Click here to view linked References

Missense variants in *DPYSL5* cause a neurodevelopmental disorder with corpus callosum agenesis and cerebellar abnormalities, including Ritscher-Schinzel syndrome

Médéric Jeanne,[1,2] Hélène Demory,[1,27] Aubin Moutal,[3,27] Marie-Laure Vuillaume,[1,2] Sophie Blesson,[2] Rose-Anne Thépault,[1] Sylviane Marouillat,[1] Judith Halewa,[1] Saskia M. Maas,[4] M. Madhi Motazacker,[5] Grazia M.S. Mancini,[6] Marjon A. van Slegtenhorst,[6] Avgi Andreou,[7,8] Helene Cox,[7,8] Julie Vogt,[7,8] Jason Laufman,[9] Natella Kostandyan,[10] Davit Babikyan,[10] Miroslava Hancarova,[11] Sarka Bendova,[11] Zdenek Sedlacek,[11] Kimberly A. Aldinger,[12] Elliott H. Sherr,[13] Emanuela Argilli,[13] Eleina M. England,[14] Séverine Audebert-Bellanger,[15] Dominique Bonneau,[16] Estelle Colin,[16] Anne-Sophie Denommé-Pichon,[17] Brigitte Gilbert-Dussardier,[18,19] Bertrand Isidor,[20,21] Sébastien Küry,[20,21] Sylvie Odent,[22,23] Richard Redon,[21] Rajesh Khanna,[3] William B. Dobyns,[12,24] Stéphane Bézieau,[20,21] Jérôme Honnorat,[25] Bernhard Lohkamp,[26] Annick Toutain,[1,2] Frédéric Laumonnier[1,2,*]

[1] UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France
[2] Service de Génétique, Centre Hospitalier Universitaire, Tours, France
[3] Department of Pharmacology, College of Medicine, University of Arizona, Tucson, AZ, USA
[4] Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Department of Clinical Genetics, Meibergdreef 9, Amsterdam, Netherlands
[5] Department of Clinical Genetics, Laboratory of Genome Diagnostics, Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands
[6] Department of Clinical Genetics, Erasmus MC University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands
[7] West Midlands Regional Clinical Genetics Service, Birmingham Women's and Children's Hospital, National Health Service Foundation Trust, Birmingham, UK
[8] Birmingham Health Partners, Birmingham Women's and Children's Hospital, National Health Service Foundation Trust, Birmingham, UK
[9] Department of Clinical Genetics, Akron Children's Hospital, Akron, USA
[10] Department of Medical Genetics, Yerevan State Medical University after Mkhitar Heratsi, and Center of Medical Genetics and Primary Health Care, Yerevan, Armenia
[11] Department of Biology and Medical Genetics, Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Charles University, Prague, Czech Republic
[12] Center for Integrative Brain Research, Seattle Children's Research Institute, Seattle, USA
[13] Departments of Neurology and Pediatrics, Weill Institute of Neuroscience and Institute of Human Genetics, University of California, San Francisco, USA
[14] Center for Mendelian Genomics, Program in Medical and Population Genetics, Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA
[15] Service de Génétique médicale et de biologie de la reproduction, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Brest, France
[16] Department of Biochemistry and Genetics, Angers University Hospital and UMR CNRS 6015-INSERM 1083, University of Angers, Angers France
[17] Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, UMR Inserm 1231, Team Génétique des Anomalies du développement, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France
[18] Service de Génétique, Centre Hospitalier Universitaire, Poitiers, France
[19] Equipe d'Accueil 3808, Université de Poitiers, Poitiers, France
[20] Service de Génétique Médicale, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France
[21] Université de Nantes, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'Institut du thorax, Nantes, France

[22] Service de Génétique Clinique, Centre Référence Déficiences Intellectuelles de Causes Rares, Centre de Référence Anomalies du Développement, Centre Labellisé pour les Anomalies du Développement (CLAD) Ouest, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Rennes, France
[23] Institut de Génétique et Développement de Rennes, CNRS, UMR 6290, Université de Rennes, Rennes, France
[24] Department of Pediatrics, University of Washington, Seattle, USA
[25] French Reference Center on autoimmune encephalitis, Hospices Civils de Lyon, Institut NeuroMyoGene, Inserm U1217/CNRS UMR 5310, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France
[26] Division of Molecular Structural Biology, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden
[27] These authors contributed equally: Hélène Demory, Aubin Moutal

*** Correspondence: Frédéric LAUMONNIER, PhD**

UMR1253, iBrain, Team Neurogenomics and Neuronal Pathophysiology

Faculty of Medicine; 10 Bd Tonnellé; 37032 Tours cedex; France

Email: frederic.laumonnier@inserm.fr Phone : +33 (0)2 47 36 60 62

Abstract

The Collapsin Response Mediator Protein (CRMP) family proteins are intracellular mediators of neurotrophic factors regulating neurite structure/spine formation and are essential for dendrite patterning and directional axonal pathfinding during brain developmental processes. Among this family, the CRMP5/*DPYSL5* gene plays a significant role in neuronal migration, axonal guidance, dendrite outgrowth and synapse formation by interacting with microtubules. Here we report the identification of missense variants in *DPYSL5* in ten individuals with brain malformations including corpus callosum agenesis and/or posterior fossa abnormalities, associated with variable degrees of intellectual disability. A recurrent *de novo* p.(Glu41Lys) variant was found in 8 unrelated patients, and a p.(Gly47Arg) mutation was identified in two sisters from the first family reported with Ritscher-Schinzel syndrome. Functional analyses of the two missense mutations revealed impaired dendritic outgrowth processes in young developing hippocampal primary neuronal cultures. We further demonstrated that these mutations, both located in a same loop on the surface of DPYSL5 monomers and oligomers, reduced the interaction of DPYSL5 with neuronal cytoskeleton-associated proteins MAP2 and βIII-Tubulin. Our findings collectively indicate that the p.(Glu41Lys) and p.(Gly47Arg) variants impair DPYSL5 function on dendritic outgrowth regulation by preventing the formation of the ternary complex with MAP2 and βIII-Tubulin, ultimately leading to abnormal brain development. This study adds *DPYSL5* to the list of genes implicated in brain malformation and in neurodevelopmental disorders.

Running title: *DPYSL5* mutations in ID and brain malformations

Keywords: neurodevelopmental disorder; *de novo* missense variants; brain malformation; DPYSL5; dendrite branching; primary neuronal cultures

Text

Intellectual Disabilities (ID) define a group of frequently associated neurodevelopmental disorders (NDD), which affect at least 1% of the general population, and consequently represent a major public health issue. NDD are characterized by compromised brain and cognitive functions and impaired social behaviors. With the recent development of next-generation DNA sequencing in the past decades , it has been well-established that more than 900 genetic factors are implicated.[1] The integration of molecular and neurobiological data as well as animal and neuronal models have highlighted the critical role of impairments targeting synapse structure and function, chromatin remodeling and the interplay between the mechanisms regulating gene expression and synaptic function.[2,3] Brain malformations, such as agenesis of the corpus callosum (ACC) or cerebellar dysplasia are congenital abnormalities sometimes associated with NDD. In particular, ACC is present in around 1-3% of patients with impaired neurodevelopment.[4,5] The etiologies of ACC are diverse and there has been a growing list of genetic causes identified in the last years, with more than 25 genes involved in either isolated or syndromic forms of ACC.[4] Indeed, whole-exome sequencing (WES) approaches allowed the identification of novel candidate genes and pathogenic variants leading to ACC through abnormal vascular development, Semaphorin-mediated axonal guidance, and neuronal migration and specification.[6,7]

In the frame of our research program on the genetic causes of isolated or syndromic severe ID using trio-based WES (HUGODIMS), we initially identified a *de novo* heterozygous missense variant in the *DPYSL5 (Dihydropyrimidinase Like 5)* gene in a sporadic male individual with severe ID and complete ACC. This variant (Chr2(GRCh37):27121488 G>A, NM_020134: c.121G>A, p.(Glu41Lys)) located in the second exon of *DPYSL5* leads to a non-conservative

valine to lysine substitution at position 41 of the DPYSL5 protein. We subsequently collected seven other unrelated patients carrying the same *de novo* heterozygous variant as well as one individual whose father was unavailable for genetic analysis. In each participating center, written informed consent was obtained from the individual's parents or legal representatives before blood sampling. The study received approval from the relevant local ethical committees. Clinical information was obtained by review of medical records and examination of affected individuals. When available, the brain MRI scans were reviewed by an expert neuroradiologist (W.B. Dobyns) and the majority of them included axial, coronal and sagittal T1 and T2 sequences at a minimum. Routine clinical genetic and metabolic screenings performed during initial workup were negative in each case, which warranted further investigation on a research basis. All these patients had severely delayed development with hypotonia (8/8), severe ID (7/7), often with absent speech (6/8) and behavioral problems, mainly aggressiveness (5/7). In addition, all patients had neurological problems consisting of abnormal movements (5/8), ataxia (3/6), strabismus (5/8), and seizures were observed in 3 patients. Head circumference was below the normal range in 3 patients (around -3 SD). ACC was observed in all patients and associated with anomalies of the posterior fossa, consisting mostly of cerebellar hypoplasia (6/7) or Dandy-Walker malformation with encephalocele (1/7). When a careful review of the MRI was possible, hippocampal dysplasia was also noticed in 3 patients. No consistent dysmorphic features seem to be recognizable in this series of patients (**Figure 1, Table 1, Figures S1-S4 and supplementary clinical data**). Additionally, we found a heterozygous missense variant (Chr2(GRCh37):27121506 G>A, NM_020134: c.139G>A, p.(Gly47Arg)) in one of the sisters from the original description of the Ritscher-Schinzel syndrome (**Figure 1, Table 1**).[7,8] The other sister was deceased and no material was available for testing. The variant was absent in the parents, in agreement with likely gonadal

mosaicism as suggested previously.[9] These two sisters, born to unrelated parents, both presented posterior fossa abnormalities (consisting in Dandy-Walker malformation in one), an atrioventricular canal, and craniofacial dysmorphic features with a large bulging skull.

Both genetic variants were absent in the control population database Genome Aggregation Database (GnomAD),[10] and were predicted to be pathogenic by several *in silico* prediction programs (**Table 2**). Gene constraint metrics (GnomAD v2.1.1, 141456 samples) indicate that *DPYSL5* is intolerant to both protein-truncating variation (pLI=1) and missense variation (missense Z score =3.08).

The *DPYSL5* gene is strongly expressed in the developing brain and encodes a protein, initially described as an antigen in autoimmune neurological syndromes, belonging to the Collapsin Response Mediator Proteins (CRMPs) family.[11-13] These proteins are involved in the regulation of neuronal migration, axonal guidance, dendritic outgrowth, and synapse formation and plasticity during brain development.[13-15] DPYSL5 (or CRMP5) is a cytosolic protein relaying semaphorin3A signaling, one of the molecular cues conducting axon and dendrite growth and guidance.[15,16] In adults, DPYSL5 is particularly expressed in the midbrain, spinal cord, dorsal root ganglia, Purkinje cells and in neurogenesis areas of the brain.[16,17] DPYSL5 was also identified as a component of the postsynaptic density proteome,[18] and it was recently described to modulate the surface trafficking and endocytosis of the AMPA receptor subunit GluA2 via the phosphorylation of GluA2 at Serine 880, suggesting a specific function at the glutamatergic synapse.[19]

DPYSL5 can form homo- as well as hetero-tetramers with DPYSL2, 3 and 4 to participate in signal transduction, cytoskeleton rearrangements, and endocytosis.[20] Protein structural modeling analyses using the crystal structure of human DPYSL5 indicated that glutamate 41

and glycine 47 are both located in the same loop on the surface of DPYSL5 monomers and oligomers (**Fig. 1c**). No significant difference in calculated free energy (ΔG) between the wildtype (WT) and mutated DPYSL5 was found. The p.(Glu41Lys) (E41K) and p.(Gly47Arg) (G47R) variants are thus expected to produce stable protein products. The loop is a part of the ß-sandwich domain and is not involved in interactions between the subunits of the DPYSL5 tetramer (**Fig. 1c,d**). The modeled structures are very similar to the WT protein with minimal differences observed in the loop region (**Fig. 1d**). Based on this, the p.(Glu41Lys) and p.(Gly47Arg) variants are unlikely to affect either protein stability or oligomeric assembly. However, both mutations will alter potential interaction areas of DPYSL5 with other proteins in various ways. The p.(Glu41Lys) variant changes the charge and hence the electrostatic surface so that potential interaction may not be possible anymore. The p.(Gly47Arg) again introduces a positive charge thus altering the surface potential. Additionally, the flexibility of the loop will be restricted and a larger side chain is introduced giving potentially steric problems for interactions as well.

Accumulating evidence indicates that DPYSL5 is an inhibitory regulator of both neurite outgrowth and axonal guidance contributing to neuronal polarity, as well as dendrite development at early developmental stages.[16,21,22] We thus evaluated the impact of both p.(Glu41Lys) and p.(Gly47Arg) variants on axonal and dendritic outgrowth of young developing hippocampal primary neuronal cultures transfected (day *in vitro* 4) with EGFP-DPYSL5 wild type (WT) or mutant expression plasmids (**Fig. 2a**). We used pEGFP-C1 plasmid expression vectors containing the full-length human DPYSL5 cDNA, allowing the production of GFP-DPYSL5 WT fusion proteins.[21] The candidate variants were then generated by using site-directed mutagenesis (see **supplemental data**). All constructs were initially tested in HEK293T

cells and displayed similar DPYSL5 protein expression levels, indicating that both mutant proteins are stable as expected from the structural calculations (**Fig. S5**). When DPYSL5 WT and mutants were overexpressed in primary neuronal cultures, the total axonal length per neuron was similar between neurons overexpressing GFP (control), EGFP-DPYSL5 WT, and EGFP-DPYSL5 Glu41Lys or Gly47Arg proteins (**Fig. 2b**). As reported before,[21] the total dendritic length was decreased in neurons overexpressing EGFP-DPYSL5-WT (**Fig. 2b**). However, both DPYSL5 mutant proteins abolished this inhibitory function on dendrite outgrowth, suggesting a loss of function mechanism (**Fig. 2b**). Although the p.(Glu41Lys) and p.(Gly47Arg) variants are not likely to affect either protein stability or oligomeric assembly, they could alter the interaction of DPYSL5 with other proteins. Both variants add an exposed positive charge to the electrostatic surface of the protein which may result in disruption of protein-protein interactions.

To elicit its inhibitory function on neurite outgrowth, DPYSL5 counteracts DPYSL2 by creating a ternary complex with MAP2 and βIII-Tubulin, and overexpression of DPYSL5 in primary neuronal cultures inhibits tubulin polymerization and neurite outgrowth.[21] We hypothesized that the loss of the inhibitory function of DPYSL5 in neurite outgrowth was related to deficient binding to MAP2 and βIII-Tubulin. We expressed the mutated DPYSL5 in a cathecholamine A differentiated (CAD) neuronal cell line prior to performing co-immunoprecipitation (**Fig. 3a**). We found that both variants reduced DPYSL5 binding to MAP2 and βIII-Tubulin (**Fig. 3b**), and the Gly47Arg substitution increased DPYSL5 binding to DPYSL2. These results suggest that the p.(Glu41Lys) and p.(Gly47Arg) variants impair DPYSL5 function by preventing the formation of the ternary complex with MAP2 and βIII-Tubulin. This would allow DPYSL2 to keep promoting neurite outgrowth because of loss of inhibition by DPYSL5.

In order to identify other *de novo* candidate variants in *DPYSL5*, we analyzed the de novo-db database (current release v.1.6.1, November 2020 accessed) and we discovered two other missense variants, p.(Asp81Asn) and p.(Val364Ile), previously described in large cohorts of patients with NDD.[23,24] However, the p.(Asp81Asn) variant has been detected in 10 and 13 individuals from the « non-neuro » GnomAD database and from the total datasets of GnomAD database respectively, thus questioning its deleterious impact.

There is overwhelming evidence about the critical roles of the CRMP/DPYSL proteins in brain developmental processes such as axonal growth and guidance, dendrite branching, organization and plasticity, and synapse activity and maturation, through their interaction with different types of neuronal molecules (cytoskeleton-associated proteins, synaptic receptors, ion channels).[15,25,26] Besides their developmental function (i.e. regulation of axonal growth), the DPYSL/CRMP proteins have been also detected in synaptic fractions and might play a significant role in synaptic plasticity and activity.[17,27,28]

Furthermore, multi-omics translational approaches indicated that CRMPs expression (RNA, protein) is altered in various human brain disorders including mental (schizophrenia, mood disorders) and neurological (Alzheimer's, prion encephalopathy, epilepsy) conditions.[15] At the genetic level, several missense variants reported in denovo-db have been described in individuals with ASD for the *DPYSL2* (p.(His438Asn), p.(Arg601Cys)) and *DPYSL3* (p.(Val139Ile), p.(Ser541Tyr)) genes.[24,29,30]

The study of homozygous *Dpysl5* knock-out mouse models (*Dpysl5*$^{-/-}$) revealed abnormal dendritic development of Purkinje cells during the period of dendritic branching, at postnatal day 21 (P21) and P28, but not at P14, and altered electrophysiological activity between parallel

fibers and Purkinje cells in adult *Dpyls5*$^{-/-}$ mice.[17] Lastly, they display abnormal limb-clasping reflexes which are also consistent with abnormal central synaptic function.[17] These data should however be considered carefully with regard to the missense p.(Glu41Lys) and p.(Gly47Arg) mutations leading to a likely dominant-negative effect and a different pathophysiological outcome.

Importantly, all patients with the p.(Glu41Lys) variant had ACC - a feature which seems to be a hallmark of DPYSL5 loss of function - associated, in cases where a careful examination of brain MRI was possible, with infratentorial anomalies such as hypoplasia of vermis and cerebellar hemispheres. Posterior fossa abnormalities are also cardinal features of the Ritscher-Schinzel syndrome suggesting that *DPYSL5* pathogenic variants may cause a spectrum of central nervous system defects, particularly as agenesis of the corpus callosum is not a feature of this condition. On the basis of the cardinal features described in the original family, and further clinical reports published in the following years, the name of Cranio-Cerebello-Cardiac or 3C syndrome was proposed, and additional signs were described. Currently, it is admitted that the clinical criteria of Ritscher-Schinzel syndrome are craniofacial features with a prominent occiput and/or forehead, cerebellar defects, generally associated with a variable degree of ID, congenital heart malformation, and in some cases cleft palate or ocular coloboma.[31] However, this condition is very heterogeneous both clinically and genetically.[32] Some cases were proven to be caused by chromosome anomalies such as 6p terminal microdeletion,[9] and in the last years biallelic pathogenic variants have been reported in the *WASHC5* gene in patients of First Nations heritage from Canada,[33] hemizygous variants in *CCDC22*,[34] and more recently biallelic variants in the *VPS35L* gene.[32] It is therefore important to note that a variant in *DPYSL5* is the genetic cause of the condition observed in

194 the original family, thus raising the question of the relevance of considering the Ritscher-
195 Schinzel syndrome as a unique entity. It is also interesting to see that the patients from this
196 family had a cardiac defect, but very little is known nowadays on the expression of *DPYSL5* in
197 the developing heart. We cannot either exclude the association of two different conditions in
198 this family.
199
200 In conclusion, through a multi-center collaboration, we identified two pathogenic missense
201 variants in *DPYSL5*, including a recurrent *de novo* variant carried by 8 patients. The variants
202 cause a defective inhibitory regulation of neurite outgrowth and dendrite development, and
203 they are responsible for a severe syndromic form of NDD/ID with brain malformations. This
204 study highlights the importance of DPYSL proteins in neuronal development and shows how
205 alterations of their regulatory functions lead to brain dysfunction.
206

Description of Supplemental Data

Supplemental Data include clinical details section, Materials and methods section, and 5 figures.

Competing Interests statement

The authors declare no competing interests

Acknowledgements

We thank the participants and families involved in the study. This work was funded by the Association pour le Développement de la Neurogénétique (to F.L.), the Programme Hospitalier de Recherche Clinique Inter-régional (grant no. NCT02136849 to S.Bézieau), and the Czech Ministries of Health and Education (grants 17-29423A and LM2018132 to Z.S.). We also thank the « IBiSA Electron Microscopy Facility » of the University of Tours for management and access to the confocal microscopy platform, and the genomics and bioinformatics core facilities of Nantes (GenoBiRD, Biogenouest) for their support to sequencing and data analysis. Exome Sequencing and analysis provided by the Broad Institute of MIT and Harvard Center for Mendelian Genomics (Broad CMG) were funded by the National Human Genome Research Institute, the National Eye Institute, and the National Heart, Lung and Blood Institute grant UM1 HG008900 and in part by National Human Genome Research Institute grant R01 HG009141.The DDD study presents independent research commissioned by the Health Innovation Challenge Fund [grant number HICF-1009-003], a parallel funding partnership between Wellcome and the Department of Health, and the Wellcome Sanger Institute [grant number WT098051].

Web Resources

OMIM, http://www.omim.org/

denovo-db, Seattle, WA, https://denovo-db.gs.washington.edu

GnomAD, https://gnomad.broadinstitute.org

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Author Contributions

M.J., A.T. and F.L. designed the study. M.J., M.L.V., M.M., M.H., S.Bendova, S.K., A.S.D.P., R.R. and S. Bézieau performed the genetics experiments. B.L. performed the protein modelling experiments. H.D., A.M., R.A.T., S.Marouillat, J.H., R.K. and F.L. performed the functional experiments. S.Blesson, S.Maas, G.M., M.v.S., H.C., J.V., A.A., N.K., D. Babikyan, D.Bonneau, S.A.B., B.G.D., B.I., S.O., J.L., Z.S., W.B.D., K.A., E.H.S, E.A., E.M.E. and A.T. recruited and evaluated the study patients. M.J., A.T. and W.B.D. analyzed the brain MRI. A.T. and F.L. supervised the study. M.J., M.L.V., A.M., B.L., A.T. and F.L. wrote the manuscript. All authors revised the manuscript.

References

1. Chiurazzi, P., Kiani, A.K., Miertus, J., Paolacci, S., Barati, S., Manara, E., Stuppia, L., Gurrieri, F., and Bertelli, M. (2020). Genetic analysis of intellectual disability and autism. Acta Biomed. *91*, e2020003.

2. Mossink, B., Negwer, M., Schubert, D., and Nadif Kasri, N. (2020). The emerging role of chromatin remodelers in neurodevelopmental disorders: a developmental perspective. Cell Mol Life Sci. doi: 10.1007/s00018-020-03714-5. Epub ahead of print.

3. Moyses-Oliveira, M., Yadav, R., Erdin, S., and Talkowski, M.E. (2020). New gene discoveries highlight functional convergence in autism and related neurodevelopmental disorders. Curr. Opin. Genet. Dev. *65*, 195-206.

4. Hofman, J., Hutny, M., Sztuba, K., and Paprocka, J. (2020). Corpus Callosum Agenesis: An Insight into the Etiology and Spectrum of Symptoms. Brain Sci. *10,* 625.

5. Duarte, K., Heide, S., Poëa-Guyon, S., Rousseau, V., Depienne, C., Rastetter, A., Nava, C., Attié-Bitach, T., Razavi, F., Martinovic, J., et al. (2020). PAK3 mutations responsible for severe intellectual disability and callosal agenesis inhibit cell migration. Neurobiol. Dis. *136,* 104709.

6. Edwards, T.J., Sherr, E.H., Barkovich, A.J., and Richards, L.J. (2014). Clinical, genetic and imaging findings identify new causes for corpus callosum development syndromes. Brain *137*, 1579-1613.

7. Aldinger, K.A., Timms, A.E., Thomson, Z., Mirzaa, G.M., Bennett, J.T., Rosenberg, A.B., Roco, C.M., Hirano, M., Abidi, F., Haldipur, P., et al. (2019). Redefining the Etiologic Landscape of Cerebellar Malformations. Am. J. Hum. Genet. *105*, 606-615.

8. Ritscher, D., Schinzel, A., Boltshauser, E., Briner, J., Arbenz, U., and Sigg, P. (1987). Dandy-Walker(like) malformation, atrio-ventricular septal defect and a similar pattern of minor anomalies in 2 sisters: a new syndrome? Am. J. Med. Genet. *26*, 481-491.

9. Descipio, C., Schneider, L., Young,T.L., Wasserman, N., Yaeger, D., Lu, F., Wheeler, P.G., Williams, M.S., Bason, L., Jukofsky, L., et al. (2005). Subtelomeric deletions of chromosome 6p: molecular and cytogenetic characterization of three new cases with phenotypic overlap with Ritscher-Schinzel (3C) syndrome. Am. J. Med. Genet. A *134A*, 3-11.

10. Karczewski, K.J., Francioli, L.C., Tiao, G., Cummings, B.B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R.L., Laricchia, K.M., Ganna, A., Birnbaum, D.P., et al. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. Nature *581*, 434-443.

11. Fukada, M., Watakabe, I., Yuasa-Kawada, J., Kawachi, H., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., and Noda, M. (2000). Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family. J. Biol. Chem. *275*, 37957-3796.

12. Ricard, D., Rogemond, V., Charrier, E., Aguera, M., Bagnard, D., Belin, M.F., Thomasset, N., and Honnorat, J. (2001). Isolation and expression pattern of human Unc-33-like phosphoprotein 6/collapsin response mediator protein 5 (Ulip6/CRMP5): coexistence with Ulip2/CRMP2 in Sema3a- sensitive oligodendrocytes. J. Neurosci. *21*, 7203-7214.

13. Nakamura, F., Ohshima, T., and Goshima, Y. (2020). Collapsin Response Mediator Proteins: Their Biological Functions and Pathophysiology in Neuronal Development and Regeneration. Front. Cell. Neurosci. *14*, 188.

14. Charrier, E., Reibel, S., Rogemond, V., Aguera, M., Thomasset, N., and Honnorat, J. (2003). Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders. Mol. Neurobiol. *28*, 51-64.

15. Quach, T.T., Honnorat, J., Kolattukudy, P.E., Khanna, R., and Duchemin, A.M. (2015). CRMPs: critical molecules for neurite morphogenesis and neuropsychiatric diseases. Mol. Psychiatry *20*, 1037-1045.

16. Bretin, S., Reibel, S., Charrier, E., Maus-Moatti, M., Auvergnon, N., Thevenoux, A., Glowinski, J., Rogemond, V., Prémont, J., Honnorat, J., et al. (2005). Differential expression of CRMP1, CRMP2A, CRMP2B, and CRMP5 in axons or dendrites of distinct neurons in the mouse brain. J. Comp. Neurol. *486*, 1-17.

17. Yamashita, N., Mosinger, B., Roy, A., Miyazaki, M., Ugajin, K., Nakamura, F., Sasaki, Y., Yamaguchi, K., Kolattukudy, P., and Goshima, Y. (2011). CRMP5 (collapsin response mediator protein 5) regulates dendritic development and synaptic plasticity in the cerebellar Purkinje cells. J. Neurosci. *31*, 1773-1779.

18. Collins, M.O., Husi, H., Yu, L., Brandon, J.M., Anderson, C.N., Blackstock, W.P., Choudhary, J.S., and Grant, S.G. (2006). Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. J. Neurochem. *97 Suppl 1*, 16-23.

19. Lin, Y.S., Lin, Y.F., Chen, K.C., Yang, Y.K., and Hsiao, Y.H. (2019). Collapsin response mediator protein 5 (CRMP5) causes social deficits and accelerates memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. Neuropharmacology *157*,107673.

20. Ponnusamy, R., and Lohkamp, B. (2013). Insights into the oligomerization of CRMPs: crystal structure of human collapsin response mediator protein 5. J. Neurochem. *125*, 855-868.

21. Brot, S., Rogemond, V., Perrot, V., Chounlamountri, N., Auger, C., Honnorat, J., and Moradi-Améli, M. (2010). CRMP5 interacts with tubulin to inhibit neurite outgrowth, thereby modulating the function of CRMP2. J. Neurosci. *30*, 10639-10654.

22. Naudet, N., Moutal, A., Vu, H.N., Chounlamountri, N., Watrin, C., Cavagna, S., Malleval, C., Benetollo, C., Bardel, C., Dronne, M.A., et al. (2018). Transcriptional regulation of CRMP5 controls neurite outgrowth through Sox5. Cell. Mol. Life Sci. *75*, 67-79.

23. Deciphering Developmental Disorders Study. (2017). Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. Nature *542*, 433-438.

24. De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A.P., Poultney, C.S., Samocha, K., Cicek, A.E., Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., et al. (2014). Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. Nature *515*, 209-215.

25. Nakamura, F., Ohshima, T., and Goshima, Y. (2020). Collapsin Response Mediator Proteins: Their Biological Functions and Pathophysiology in Neuronal Development and Regeneration. Front. Cell. Neurosci. *14*,188.

26. Quach, T.T., Stratton, H.J., Khanna, R., Kolattukudy, P.E., Honnorat, J., Meyer, K., and Duchemin, A.M. (2020). Intellectual disability: dendritic anomalies and emerging genetic perspectives. Acta Neuropathol. doi: 10.1007/s00401-020-02244-5. Epub ahead of print.

27. Hou, S.T. (2020). The regulatory and enzymatic functions of CRMPs in neuritogenesis, synaptic plasticity, and gene transcription. Neurochem. Int. *139*, 104795.

28. Wang, Y., Brittain, J.M., Wilson, S.M., and Khanna, R. (2010). Emerging roles of collapsin response mediator proteins (CRMPs) as regulators of voltage-gated calcium channels and synaptic transmission. Commun. Integr. Biol. *3*, 172-175.

29. Iossifov, I., O'Roak, B.J., Sanders, S.J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H.A., Witherspoon, K.T., Vives, L., Patterson, K.E., et al. (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. Nature *515*, 216-221.

30. Tsutiya, A., Nakano, Y., Hansen-Kiss, E., Kelly, B., Nishihara, M., Goshima, Y., Corsmeier, D., White, P., Herman, G.E., and Ohtani-Kaneko, R. (2017). Human CRMP4 mutation and disrupted Crmp4 expression in mice are associated with ASD characteristics and sexual dimorphism. Sci. Rep. *7*, 16812.

31. Elliott, A.M., and Chudley, A. (2020). Ritscher-Schinzel syndrome. In GeneReviews® [Internet], Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., ed. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), pp. 1993-2020.

32. Kato, K., Oka, Y., Muramatsu, H., Vasilev, F.F., Otomo, T., Oishi, H., Kawano, Y., Kidokoro, H., Nakazawa, Y., Ogi, T., et al. (2020). Biallelic VPS35L pathogenic variants cause 3C/Ritscher-Schinzel-like syndrome through dysfunction of retriever complex. J. Med. Genet. *57*, 245-253.

33. Elliott, A.M., Simard, L.R., Coghlan, G., Chudley, A.E., Chodirker, B.N., Greenberg, C.R., Burch, T., Ly, V., Hatch, G.M., and Zelinski, T. (2013). A novel mutation in KIAA0196: identification of a gene involved in Ritscher-Schinzel/3C syndrome in a First Nations cohort. J. Med. Genet. *50,* 819-822.

34. Kolanczyk, M., Krawitz, P., Hecht, J., Hupalowska, A., Miaczynska, M., Marschner, K., Schlack, C., Emmerich, D., Kobus, K., Kornak, U., et al. (2015). Missense variant in CCDC22 causes X-linked recessive intellectual disability with features of Ritscher-Schinzel/3C syndrome. Eur. J. Hum. Genet. *23,* 633-638.

377 **Figure legends**

378

379 **Figure 1: Neuro-anatomical and molecular analyses of *DPYSL5* mutations**

380 **a-** Midsagittal brain MRIs of three patients carrying a *de novo* p.(Glu41Lys) heterozygous
381 variant of *DPYSL5* revealing complete agenesis of corpus callosum (ACC) and mild cerebellar
382 hypoplasia (Patient 1), total ACC with normal cerebellum size but with mild mega cisterna
383 magna (Patient 2), and total ACC and mild hypoplasia of the inferior cerebellar vermis (Patient
384 3); **b-** Schematic representation of *DPYSL5* transcript and protein and localization of the two
385 mutations p.(Glu41Lys) (E41K) and p.(Gly47Arg) (G47R); **c-** Homo-tetramer model of human
386 DPYSL5 protein. The four subunits are shown in ribbon representation and colored differently
387 (green, blue, brown and red). In one chain (blue) the location of the mutation sites is labeled
388 and indicated by grey spheres; **d-** Close up view of the mutation site. Mutated residues are
389 shown in stick representation. The crystal structure of human DPYSL5 (4b91) is shown in blue.
390 The modeled structures of E41K and G47R are shown in gold and coral, respectively.

391

392 **Figure 2: Functional analyses of the impact of DPYSL5 mutations on neuronal development**

393 **a-** Confocal microscopy images of neurons at 6 days of *in vitro* culture (D.I.V.) transfected at 2
394 D.I.V. with pEGFP (GFP), pEGFP-DPYSL5 (WT), pEGFP-DPYSL5 Glu41Lys (E41K) and pEGFP-
395 DPYSL5 Gly47Arg (G47R) and labeled with anti-Tau (axon) and anti-MAP2 (dendrites)
396 antibodies. Scale bar, 50µm; **b-** Graphical representations of the axon and dendrite length
397 measures in dot plots, each plot corresponding to one neuron for which the axonal length and
398 the total dendritic length were measured. A one-way ANOVA parametric test with multiple
399 comparisons (Tukey's Post hoc) was performed and found to be non-significant for the axon
400 length (P=0.2272; F=1.488; R-squared=0.07148), and significant for total dendritic length

401 (P=0.0003; F=7.377; R-squared=0.2762). Three independent transfections including 15
402 neurons "pEGFP" (solid green circle), 15 neurons "EGFP-DPYSL5 WT" (pink diamond), 16
403 neurons "GFP-DPYSL5 E41K" (purple triangle) and 16 neurons "EGFP-DPYSL5 G47R" (red
404 triangle). *, P=0.0201 (WT *vs.* G47R) or P=0.0121 (WT *vs.* E41K); ***, P=0.0001 (GFP *vs.* WT).
405 Data are shown as mean ± SEM;
406
407 **Figure 3. The p.(Glu41Lys) and p.(Gly47Arg) mutations impair the physical interaction of**
408 **DPYSL5 with the neuronal cytoskeleton-associated proteins MAP2 and tubulin βIII.**
409 **a-** Representative immunoblots showing GFP-DPYSL5 or GFP immunoprecipitation and co-
410 immunoprecipitation of DPYSL5 associated proteins DPYSL2, endogenous DPYSL5 (indicated
411 with an arrow), βIII-tubulin and MAP2 from CAD cells transfected with the indicated DPYSL5
412 mutants or GFP as a negative control; **b-** Bar graph with scatter plots showing relative binding
413 of the indicated proteins to GFP-DPYSL5. Both E41K and G47R mutations decreased binding
414 to βIII-tubulin and MAP2. DPYSL5-E41K showed decreased binding to endogenous DPYSL5 and
415 DPYLS5-G47R had increased binding to DPYSL2 compared to wildtype (WT). *, P<0.05, Kruskal-
416 Wallis test with Dunn's post-hoc. Data are shown as mean ± SEM (n=4).
417

Table 1. Clinical findings of the patients carrying missense variants in *DPYSL5* gene

Individuals	**Patient 1**	**Patient 2**	**Patient 3**	**Patient 4**	**Patient 5**	**Patient 6**	**Patient 7**	**Patient 8**	**Patient 9 (Ritscher-Schinzel)**	**Patient 10 Sister of patient 9**
DPYSL5 cDNA	c.121G>A	c.121G>A	c.121G>A	c.121G>A	c.121G>A	c.121G>A	c.121G>A	c.121G>A	c.139G>A	deceased (not tested)
DPYSL5 protein	p.Glu41Lys	p.Glu41Lys	p.Glu41Lys	p.Glu41Lys	p.Glu41Lys	p.Glu41Lys	p.Glu41Lys	p.Glu41Lys	p.Gly47Arg	
Inheritance	htz, *de novo*	htz, *de novo*	htz, *de novo*	htz, *de novo*	htz, *de novo*	htz, *de novo*	htz, *de novo*	htz, *de novo*	htz, gonadal mosaicism suspected	
Gender	M	M	M	F	F	F	F	F	F	F
Age on last examination	**33 y**	**2.5 y**	**8.5 y**	**22 y**	**22 y**	**4.5 Y**	**17.5 y**	**5y**	**3.5 y**	**6 y**
Prenatal findings	weak fetal movements	N/A	N/A	N/A	N/A	dilated ventricles at 36 weeks	weak fetal movements	None	N/A	N/A
Birth parameters										
Term (weeks)	38	42	42	40	39	39	39	40	37	37 + 4
Birth length (cm) centile	50 cm (67th)	unknown	unknown	unknown	unknown	unknown	49 cm (42th)	53.3 cm (90th)	51 cm (90th)	48 cm (50th)
Birth weight (g) centile	3360 g (68th)	3040 gr (7th)	4600 g (97th)	3800 (75th-90th)	3685 g (75th)	3969g / (95th)	2600 g (6th)	3200 g (33th centile)	3100 g (75th)	3110 g (50th)
Birth HC (cm) centile	unknown	unknown	unknown	unknown	unknown	39.5cm (> 97th)	unknown	unknown	34.8 cm (90th)	34.5 cm (75th)
Neurodevelopment										
OFC	-2.5 SD	N/A	-0.3 SD	10th centile	-2.2 SD	-0.7 SD	-3.7 SD	26th centile	+3.9 SD hydrocephaly	+1.8 SD
Delayed development	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypotonia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ID	+	+	+	+	+	+	+	+	N/A	+
Degree	severe	severe	severe	severe	severe	N/A	severe	severe	N/A	N/A

Individuals	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8	Patient 9 (Ritscher-Schinzel)	Patient 10 Sister of patient 9
Absent speech	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Sitting	3.5 y	1.5 y	-	-	20 m	11 m	12 m	18 m	N/A	N/A
Walking	7 y	4 y	-	-	-	3 y	5.5 y	5 y (in progress)	N/A	N/A
Toilet trained	-	-	-	-	-	-	-	-	N/A	N/A
Swallowing difficulties	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
ASD	-	-	-	-	-	+	-	-	N/A	-
Behavioral problems	+ aggressiveness	-	N/A	Sensory processing disorder	+ aggressiveness	+ aggressiveness	+ aggressiveness	+ impulse control	N/A	-
Abnormal movements	+ stereotypic	-	+ Choreatic	-	+ athetoid and stereotypic	+ arm extension	-	+ involuntary movements	N/A	-
Ataxia	N/A	-	-	+	+	+/- (wide gait)	-	NA	N/A	-
Strabismus	+	-	+	-	+	-	+	+	N/A	-
Seizures	-	-	+ generalized tonic-clonic	-	-	+/- abnormal movements treated with levetiracetam / normal EEG	+ partial	-	-	-
Brain imaging										
Corpus callosum agenesis	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Hippocampal dysplasia	+	+	N/A		N/A	NA	-	N/A	N/A	N/A
Cerebellar hypoplasia	+	+/-	+	+	+	N/A	-	+	+	+
Hydrocephaly	-	-	-	-	-	N/A	-	-	+	-

Individuals	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8	Patient 9 (Ritscher-Schinzel)	Patient 10 Sister of patient 9
Other						abnormal myelination	DW malformation, encephalocele with intracranial hyper-tension			
Other features										
Short stature	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Scoliosis	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
Other orthopedic problems	feet malposition, limited extension of the knees	-	premature closure of anterior fontanel	hip dysplasia requiring surgery	hip dislocation	hypermobile joints	declination of the body to the left side	-	11 pairs of ribs, foramina parietalia, large fontanelles	foramina parietalia, large fontanelles
Heart defect	-	-	-	-	-	-	-	-	atrio-ventricular canal	ASD and cleft of the mitral valve
Abnormal genitalia	micropenis	-	micropenis, undescended testes	not examined	-	-	-	-	slightly gaping vulva	slightly gaping vulva
Dysmorphic features	brachycephaly, deep-set eyes, short philtrum, full lips, macrostomia, ulnar deviation of the hands, narrow hands	-	prominent eyes and upper lip, large ears	deep set eyes, hypotelorism, high, narrow palate	plagiocephaly, hypotelorism, deep set eyes, high, narrow palate, tapering fingers	curly hair, hypertelorism, downslanting palpebral fissures, broad nasal root	not specific		ocular hypertelorism, downslanting palpebral fissures, depressed nasal bridge, apparently low-set ears, narrow palate	ocular hypertelorism, downslanting palpebral fissures, depressed nasal bridge, apparently low-set ears, narrow palate

Abbreviations: M, Male; F, Female; N/A, Not Available; htz, heterozygous; y, years-old; m, month; SD, Standard Deviation; ID, intellectual disability; HC, Head Circumference; OFC, Occipitofrontal circumference; DW, Dandy-Walker.

Table 2. *In silico* pathogenicity prediction scores of p.(Glu41Lys) and p.(Gly47Arg) variants

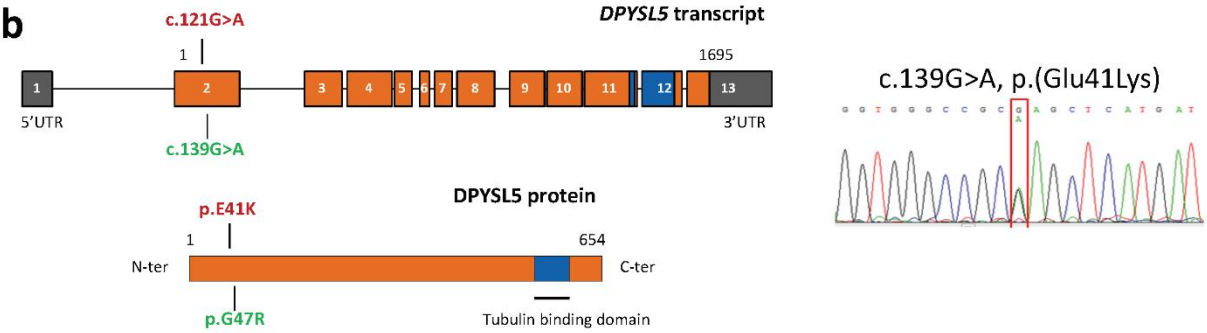
		***DPYSL5* variant 1**	***DPYSL5* variant 2**
Mutation data	Mutation type	Missense	Missense
	Nucleotide change	c.121G>A	c.139G>A
	Predicted amino acid change	p.(Glu41Lys)	p.(Gly47Arg)
	Exon	2	2
In silico predictions	SIFT	Deleterious (score 0.02)	Deleterious (score 0.02)
	Mutation Taster	Disease causing (p-value: 1)	Disease causing (p-value: 1)
	Polyphen-2 (Hum-Div)	Benign (score 0.012)	Probably damaging (score 1)
	CADD_phred	24.5	27.9

Figure 1

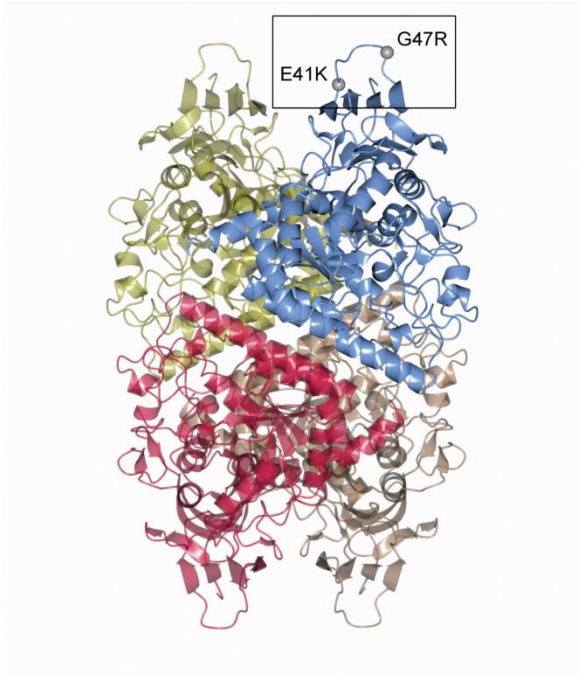
a



b



c



d

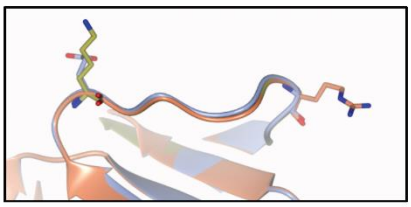


Figure 2

Figure 2

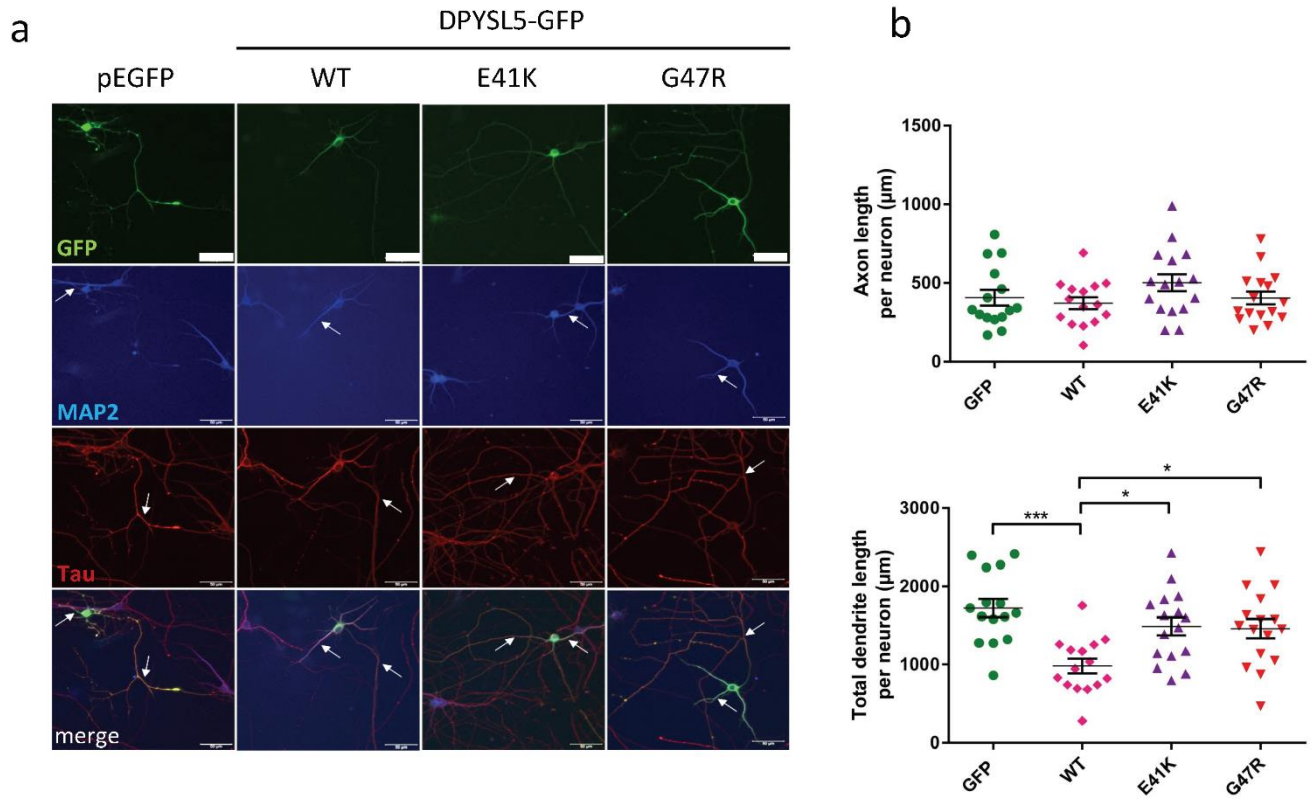
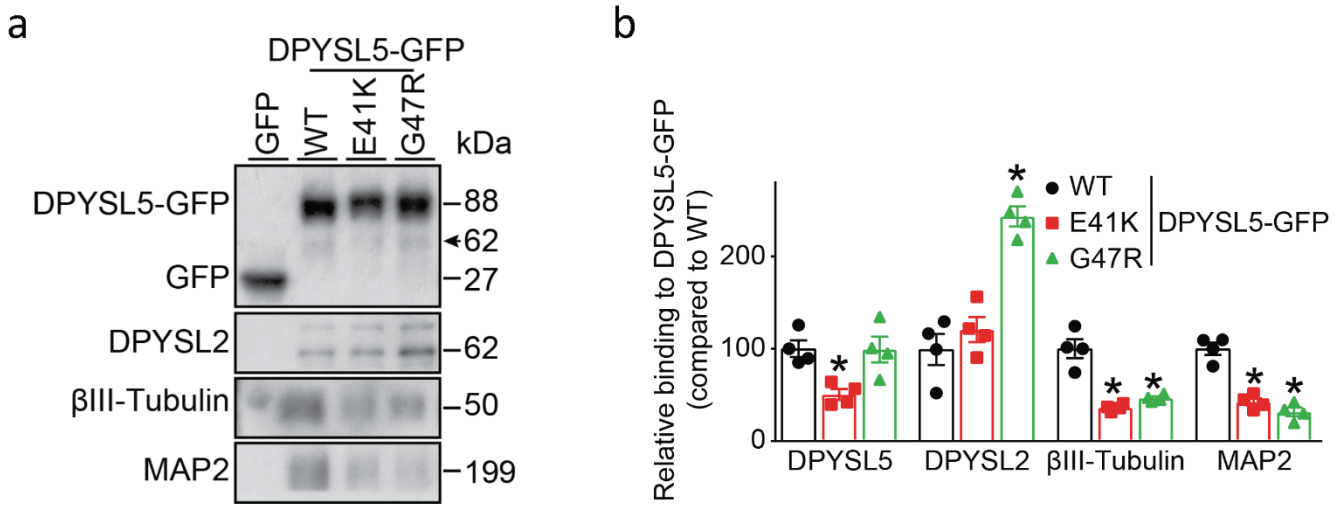


Figure 3


a
DPYSL5-GFP
GFP
WT
E41K
G47R
kDa
DPYSL5-GFP
GFP
DPYSL2
βIII-Tubulin
MAP2
88
62
27
62
50
199
b
Relative binding to DPYSL5-GFP (compared to WT)
200
100
0
WT
E41K
G47R
DPYSL5-GFP
DPYSL5
DPYSL2
βIII-Tubulin
MAP2

Supplemental data

Missense variants in *DPYSL5* cause a neurodevelopmental disorder with corpus callosum agenesis and cerebellar abnormalities, including Ritscher-Schinzel syndrome

Médéric Jeanne, Hélène Demory, Aubin Moutal, Marie-Laure Vuillaume, Sophie Blesson, Rose-Anne Thépault, Sylviane Marouillat, Judith Halewa, Saskia M. Maas, M. Madhi Motazacker, Grazia M.S. Mancini, Marjon A. van Slegtenhorst, Avgi Andreou,Helene Cox, Julie Vogt, Jason Laufman, Natella Kostandyan, Davit Babikyan, Miroslava Hancarova, Sarka Bendova, Zdenek Sedlacek, Kimberly A. Aldinger, Elliott H. Sherr, Emanuela Argilli, Eleina M. England, Séverine Audebert-Bellanger, Dominique Bonneau, Estelle Colin, Anne-Sophie Denommé-Pichon, Brigitte Gilbert-Dussardier, Bertrand Isidor Sébastien Küry, Sylvie Odent, Richard Redon, Rajesh Khanna, William B. Dobyns, Stéphane Bézieau, Jérôme Honnorat, Bernhard Lohkamp, Annick Toutain, Frédéric Laumonnier

. Clinical description of the affected individuals with the *de novo* p.(Glu41Lys) variant

. Materials and methods

. Supplementary Figures 1-5

Clinical description of the affected individuals with the *de novo* p.(Glu41Lys) variant

Patient 1 (Tours)

Second child from unrelated parents, he was born after an uneventful pregnancy with normal birth parameters. He presented severe hypotonia, poor contact and swallowing difficulties. Developmental milestones were significantly delayed as he started to walk at 7 years and was not toilet trained at adulthood. Curiously, even though he was still able to walk, he progressively moved only on his knees. He had severe ID with no language and developed behavioral problems with temper tantrums, aggressive behavior and self-harm. On physical examination he had mild microcephaly (-2.5 SD), severe kyphoscoliosis, small genitalia and poorly developed secondary sexual characteristics. In time, he acquired facial dysmorphic features that were not seen in childhood. In particular he had brachycephaly, deep set eyes, short philtrum, prognathism, full lips and macrostomia. Standard diagnostic work-up, including array-CGH, was normal. Brain MRI performed at 37 years 11 months (reviewed by W. Dobyns) showed low forehead, normal extra-axial spaces, normal gyral pattern and cortex except for mildly prominent sulci, mildly small and up-rotated hippocampi, normal basal ganglia and thalami, diffuse and prominent perivascular spaces more numerous posteriorly, mildly enlarged 3rd ventricle, widely separated and mildly enlarged lateral ventricles, very thin anterior commissure, complete ACC with thick Probst bundles, normal brainstem, diffuse mild cerebellar hypoplasia with superimposed mild cerebellar atrophy, and normal size posterior fossa. The key features thus were ACC, hippocampal dysplasia, and mild cerebellar hypoplasia.

Patient 2 (Amsterdam)

This patient was the first child of healthy non-consanguineous parents after they had three miscarriages. He was born after an uncomplicated pregnancy of 42 weeks with a birthweight of 3042 grams. His development was very delayed with hypotonia and poor contact. He started sitting up at the age of 1.5 years and was not able to walk at the age of six. He had a severe retardation with no speech and was very uncomfortable. He also had major sleep problems. On physical examination he was very restless and was screaming. Head circumference was at -1.5 SD and he had a high nasal bridge and a short philtrum.

On brain MRI on the age of 4 years and 5 months there were an abnormally thin anterior commissure, complete agenesis of the corpus callosum with secondary radial gyral pattern over both mesial hemispheric surfaces, bilateral large Probst bundles, and mildly small and uprotated hippocampi. The cerebellum and posterior fossa were borderline small.

(Bill Dobyns : REVIEW: MRI at 4 years 5months showed normal forehead, extra-axial spaces, normal gyral pattern and cortex for except radial pattern over mesial hemispheric surfaces, small and up-

rotated hippocampi (but low resolution), normal basal ganglia, thalami and white matter, mildly enlarged 3rd ventricle, widely separated and mildly enlarged lateral ventricles, very thin anterior commissure with small bundle extending up to location of corpus callosum, complete ACC with thick Probst bundles, normal brainstem, and normal to borderline small cerebellum and posterior fossa size. The key features thus were ACC, and hippocampal dysplasia).

Patient 3 (Rotterdam)

The history of this 13 yr old boy has been previously reported, as exome sequencing had revealed an X-linked variant of unknown significance in *SYP*. The variant (p.Thr198Ile) appeared later to be frequently encountered in hetero- and hemizygosity in the general population (GnomAD), and therefore considered not to be responsible for the phenotype. Reanalysis of the full exome data of the Patient and his parents, finally showed the de novo *DPYSL5* variant. At the last observation, at the age of 11 years, he presented a severe neurodevelopmental disorder, cognitive development being consistent with the age of 7 months, severe hypotonia and progressive severe convex kyphoscoliosis, epilepsy controlled by sodium valproate, no speech development, strabismus, limited interaction with environment. The brain MRI performed at the age of 14 months showed agenesis of the corpus callosum, hippocampal dysplasia, mild/moderate hypoplasia of cerebellar vermis and hemispheres. MRI of the spine at the age of 11 years revealed progression of the cerebellar atrophy.

Patient 4 (Birmingham)

This patient was the second child of healthy Caucasian parents. Pregnancy and delivery were normal. Hypotonia lead to delay in learning to sit. Left congenital hip dislocation (managed by brace and later surgery) and global developmental delay were diagnosed at 9 months of age. Growth including OFC has been normal.

As an adult she uses a wheelchair for mobility and has ataxia. She can speak in short phrases, inconsistently indicates her toileting needs. She has periods of agitated behavior if excited and in response to noise. Apart from delayed puberty her general health is good.

Agenesis of the corpus callosum and hypoplastic cerebellum were reported on brain MRI. She was following recruited to the DDD study (Patient inclusion number 258864) where the *de novo* c.121G>A variant in DPYSL5 gene was found.

Patient 5 (Birmingham)

This is a 22 year old female with agenesis of corpus callosum, dysmorphic features, severe intellectual disability and motor disability. She is the first child from unrelated parents. She was born at 39 weeks of pregnancy following spontaneous labor and ventouse extraction with normal birth parameters.

Developmental milestones were significantly delayed with independent sitting achieved at 20 months and only walking aided with a walking frame to date. She has severe ID with no language and developed behavioral problems with aggressive behavior, screaming and a disturbed sleeping pattern. A high pain threshold has been noted by her parents. Autistic features are present but no formal ASD diagnosis has been made. She exhibits athetoid movements, truncal ataxia, repetitive stereotypic hand movements and head nodding. She had delayed puberty, with secondary sexual characteristics developing at the age of 14 years but menstruation has not commenced. She has a history of left strabismus, severe gastro-oesophageal reflux and severe scoliosis requiring surgical interventions. She was previously investigated with array-CGH which showed no copy number imbalance and *FOXG1* and *MECP2* gene testing with no pathogenic variants found. She was following recruited to the DDD study (inclusion number DDD-BWH:258661:15-09-16) where the *de novo* c.121G>A variant in DPYSL5 gene was found.

Patient 6 (Akron)

See Supplementary Table 1

Patient 7 (Prague)

The girl was born in term from the 5th pregnancy of healthy unrelated Caucasian parents. Weak fetal movements and placental abruption were noted during the pregnancy. The weight of the newborn was 2600 g (6th centile) and length was 49 cm (42nd centile). The girl showed unilateral hypotonia. Her developmental milestones were delayed (sitting at 12 months, walking at 5.5 years of age). She developed partial seizures which resolved after prolonged carbamazepine treatment. The girl has never developed speech, she must use diapers and her intellectual disability was evaluated at the last examination at 17.5 years of age as severe. She shows attacks of aggression. Brain examination revealed agenesis of corpus callosum, periventricular leukomalacia, Dandy-Walker malformation, moderate-sized encephalocele and intracranial hypertension. She has microcephaly and strabism but no remarkable facial dysmorphism. Her stature is short with severe kyphoscoliosis and gibbus rotation, and her body shows severe declination to the left side.

Patient 8 (San Francisco)

See Supplementary Table 1

Materials and methods

Inclusion of the Patients

The ten affected individuals included in the present study were enrolled together with their healthy biological parents in different programs or centers investigating the molecular basis of NDD in a research or clinical setting: Individual 1 and biological parents were followed at the Department of Genetics of the University Hospital of Tours (France) and were included in the Western France HUGODIMS research program (ClinicalTrials.gov registration no. NCT02136849; « Inter-regional Project of the Great Western Exploration Approach for Exome Molecular Causes Severe Intellectual Disability Isolated or Syndromic »). Individuals 2 to 8 and their biological parents were enrolled at the following centers: Departments of Pediatric and Clinical Genetics, Amsterdam UMC, Amsterdam, The Netherlands (Patient 2); Department of Clinical Genetics, Erasmus MC University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands (Patient 3); West Midlands Regional Clinical Genetics Service, Birmingham Women's and Children's Hospital, National Health Service Foundation Trust, Birmingham, UK (Patients 4 and 5) ; Department of Clinical Genetics, Akron Children's Hospital, Akron, USA (Patient 6); Department of Medical Genetics, Yerevan State Medical University after Mkhitar Heratsi and Center of Medical Genetics and Primary Health Care, Yerevan, Armenia, and Department of Biology and Medical Genetics, Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic (Patient 7); Departments of Neurology and Pediatrics, Weill Institute of Neuroscience and Institute of Human Genetics, University of California, San Francisco, USA (Patient 8). Individuals 9 and 10 were from the family which allowed the original description of Ritscher-Schinzel syndrome Connecting the different centers was allowed by GeneMatcher.[1]

Whole-Exome sequencing

Genomic DNA was extracted from blood cells through standard procedures. A trio-based exome sequencing strategy was applied to the affected children and their parents.

The DNAs of Patient 1 and respective parents were tested at the genomics platform of the Genomics and Bioinformatics Core Facility of Nantes (GenoBiRD, Biogenouest). Library generation was performed with an optimized SureSelect XT Target Enrichment Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The exome was captured by hybridization using the SureSelect Clinical Research Exome (Agilent Technologies) and sequenced on a HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA) following the manufacturer's instructions. DNA sequences were mapped to the reference human genome sequence (GRCh37) with BWA. HaplotypeCaller from the Genome Analysis Toolkit was used to perform variant calling. Filtering was performed using Jvarkit and annotations from SnpEff, VEP and dbNSFP in a custom bioinformatic pipeline with an autosomal dominant hypothesis.

Exome sequencing was performed in a trio diagnostic approach for Patient 2 (Amsterdam) and both parents. Libraries were prepared using the Kapa HTP kit (Illumina) and capture was performed using the SeqCap EZ MedExome (Roche NimbleGen). Sequencing was done on an Illumina HiSeq2500. The reads were aligned to the reference sequence (GRCh37/hg19 Feb 2009) and variants identified using pipeline based on BWA-MEM0.7 and GATK 3.3.0. The median coverage of the captured target region was at least 109x and 94.8% of the probe base pairs were covered at >20X. Variant annotation and prioritizing were done using Cartagenia Bench Lab NGS (Agilent Technologies). Variants in all coding exons and 6 nucleotide flanking intronic regions are analyzed for de novo variants (dominant inheritance) and homozygous of compound heterozygous variants (recessive inheritance). Variants with a minor allele frequency of >1% in de gnomAD database that are not present as (likely) pathogenic in HGMD database (https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/start.php) or ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) database, have not been analyzed.

The whole-exome sequencing study performed in a trio diagnostic approach for Patient 3 (Rotterdam) and both parents has been previously described.[2]

Genome-wide microarray and whole exome sequencing in trios (patient and their parents) was performed for Patients 4 and 5 as per the Deciphering Developmental Disorders (DDD) study methods.[3] The whole-exome sequencing study performed for Patients 6, 8 and 9 and both parents has been previously described.[4]

For Patient 7, trio exome sequencing was performed at Charles University in Prague. SeqCap EZ MedExome Probes (Roche NimbleGen, Madison, WI) were used for exon capture. The enriched library was paired-end sequenced using the HiSeq2500 system (Illumina, San Diego, CA). The reads were mapped to the reference genome (hg19) using Novoalign. SAM to BAM conversion and PCR duplicate removal were performed using Picard Tools. Genome Analysis Toolkit (GATK) was used for local realignment, base recalibration, variant recalibration and genotyping. Variants were annotated using the GEMINI framework, and were filtered according to population frequencies in several public databases (gnomAD, ExAC, 1000GP) and in an in-house database of variants identified in previous experiments. The variants were prioritized according to the predicted severity, various inheritance pattern models, and presence in in-house candidate gene lists.

DPYSL5 Protein modeling analyses

Mutations have been modelled using the ddg_monomer module of the Rosetta software.[5] The input structure was the crystal structure of human DPYSL5 (pdb code 4b91).[6] Figures were prepared using CCP4MG.[7]

DPYSL5 expression plasmids and mutagenesis

Full-length human *DPYSL5* cDNA (AF264015) was amplified by PCR and inserted directionally into the pEGFP-C1 vector (Clontech) using *EcoR1* (5') and *Pst1* (3') cloning sites, which generated a fusion protein with a GFP tag at its N terminus (EGFP-DPYSL5). The missense mutants Glu41Lys (E41K) and Gly47Arg (G47R) were generated by site-directed mutagenesis using the Q5® Site-Directed Mutagenesis kit (New England Biolabs). The oligonucleotides used to generate each mutation in pEGFP-DPYSL5 were designed using the NEBase Changer (https://nebasechanger.neb.com) and include the following sequences: E41K Forward 5'-ggtgggccgcaagctcatgat-3' and E41K Reverse 5'-tgctggatgatgccattctc-3'; G47R Forward 5'-gatccctggcagggccaaggtgat-3' and G47R Reverse 5'-atgagctcgcggcccacc-3'. The sequences of all constructs were confirmed by automated DNA Sanger sequencing.

Primary neurons culture, transfection and immunocytochemistry

All mouse experiments were performed according to protocols approved by the University Tours and by the INSERM (Project authorization number 01456.03, Ministry of Research). Hippocampal neuronal cultures from embryonic day 17 (E17) mouse embryos were prepared and plated at a density of 450 cells/mm^2 as previously described.[8] The developing neurons were transfected 4 days after plating with EGFP, EGFP-DPYSL5, EGFP-DPYSL5 E41K or EGFP-DPYSL5 G47R plasmid constructs using Lipofectamine 2000 (Cat# 11668500, Invitrogen) and fixed 48 hours later at 6 days of *in vitro* culture (D.I.V. 6) with a solution containing 4% paraformaldehyde/4% sucrose in PBS. Cultures were then incubated with a blocking buffer (10% donkey serum/0.2% Triton X-100 in PBS) for 1 hour, washed (PBS) and incubated for 1 hour with the following primary antibodies diluted in blocking buffer: Rabbit polyclonal anti-Tau Ab (1/1000, Cat# 314003, Synaptic Systems), Mouse monoclonal anti-MAP2 antibody (1/200, Cat# M9942, Sigma-Aldrich). After several washes in PBS, neurons were incubated for 45 minutes with the following secondary antibodies diluted in blocking buffer: FluoProbes® 594 donkey anti-rabbit Ab (1/300, Cat# FPSD5110, Interchim), Alexa Fluo 405 Goat anti-mouse Ab (1/300, Cat# A-31553, Invitrogen). After several washes in PBS, the fixed and stained neurons were mounted in ProLong™ Diamond Antifade reagent (Cat# P36391, Invitrogen). The cells were observed using a laser-scanning confocal microscope SP-8 (Leica) and images were generated by the in-built Leica Application Suite X (Leica). The axonal and dendritic measurements were done with Imaris Software as previously described.[8]

Culture and transfection of HEK293T cells

Human embryonic kidney 293T (ATCC CRL-3216) cells were grown in standard cell culture conditions (DMEM/Glutamax with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (EuroBio)), 37°C in 5% CO_2.

Approximately 350,000 cells were transferred into 6-wells plates and transfected 24 hours after plating with a solution containing 2 µg of plasmid DNA and 4 µL of Lipofectamine 2000 (Cat# 11668027, ThermoFisher). Total proteins lysates were prepared 48 hours post-transfection and analyzed by western blotting using primary mouse monoclonal GFP antibody (Cat# 1181446000, Roche), Affinity-purified rabbit polyclonal DPYSL5/CRMP5 antibody (from J. Honnorat's lab),[9,10] and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated actin antibody (Cat# A3854, Sigma). Membranes were analyzed by chemiluminescence using Clarity ECL substrate (Cat# 1705060, Bio-Rad) using a ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad), onboard acquired with Image Lab Touch 2.4 software (Bio-Rad) and quantified using Image Lab 6.1 software (Bio-Rad).

Culture and transfection of catecholamine A differentiated (CAD) cells

Mouse neuron derived CAD cells (ECACC Cat# 08100805) were grown in standard cell culture conditions (DMEM/F12 media supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone), 37°C in 5% CO_2), as previously described.[11] CAD cells were transfected with a 1 mg/ml solution of polyethyleneimine (PEI, MW 25000, Sigma) at a ratio of 1µg of DNA for 3 µg of PEI. Under these conditions, efficiencies above 90% were routinely observed.

Generation of CAD cells lysates and immunoprecipitation

Transfected CAD cells lysates were generated by homogenization and sonication in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 1% (vol/vol) NP40, 0.5% (mass/vol) sodium deoxycholate, 0.1% (mass/vol) SDS), protease inhibitors (Cat# B14002; Bimake, Houston, TX), phosphatase inhibitors (Cat# B15002, Bimake), and benzonase (Cat#71206, Millipore, Billerica, MA). Protein concentrations were determined using the BCA protein assay (Cat# PI23225, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Immunoprecipitation was done as previously described, with 2 µg of anti-GFP antibody (Cat# AB3080, Millipore, Billerica, MA) incubated overnight before adding protein G magnetic beads (Cat# 10009D, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), pre-equilibrated with the immunoprecipitation buffer. Incubation was done for 1 h at 4°C to capture the immuno-complexes. Beads were washed 3 times with RIPA buffer before resuspension in Laemmli buffer with DTT and denaturation (5 minutes at 95°C) prior to immunoblotting.

Indicated samples were loaded on 4-20% Novex® gels (Cat# EC60285BOX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Proteins were transferred for 1h at 120 V using TGS (25 mM Tris, pH=8.5, 192mM glycine, 0.1% (mass/vol) SDS), 20 % (vol/vol) methanol as transfer buffer to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes 0.45 µm (Cat# IPVH00010, Millipore, Billerica, MA), pre-activated in methanol. After transfer, the membranes were blocked at room temperature for 1 hour with TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20), 5% (mass/vol) non-fat dried milk, then incubated

separately with indicated primary antibodies against CRMP5, CRMP2 (Cat# C2993, Sigma, St Louis, MO), βIII-tubulin (Cat# G7121, Promega, Madison, WI) or MAP2 (Cat# M4403, Sigma, St Louis, MO) in TBST, 5% (mass/vol) BSA, overnight at 4°C. Following incubation with HRP-conjugated secondary antibodies from Jackson ImmunoResearch, blots were revealed by enhanced luminescence (WBKLS0500, Millipore, Billerica, MA) before exposure to photographic film. Films were scanned, digitized, and quantified using Un-Scan-It gel version 6.1 scanning software by Silk Scientific Inc.

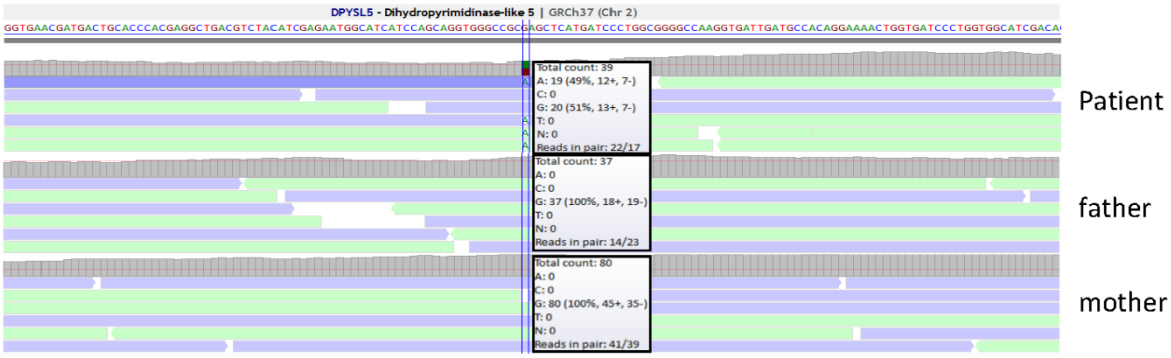
Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 6.0 software (La Jolla, CA, USA). For the neuronal morphological study, the data were analyzed using the D'Agostino-Pearson normality test. When the result was positive, the data were then analyzed using an Ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons.

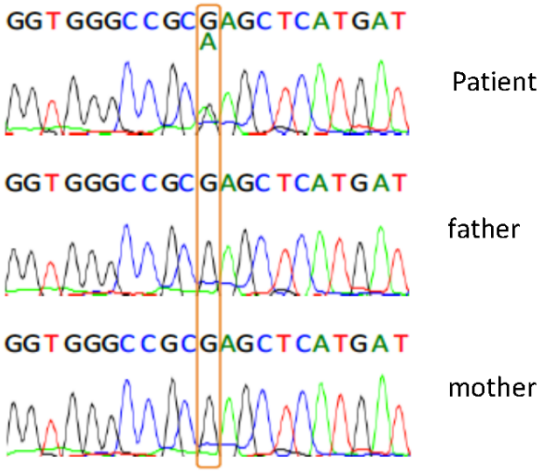
For the protein interaction analysis, a Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc was performed. $P<0.05$ was assumed significant.

Supplementary Fig. 1. Integrative Genomics Viewer (IGV) screenshots and Sanger sequencing analysis of the *de novo DPYSL5* c.121G>A substitution (encoding p.(Glu41Lys)) in Patient 1 and parents.

a

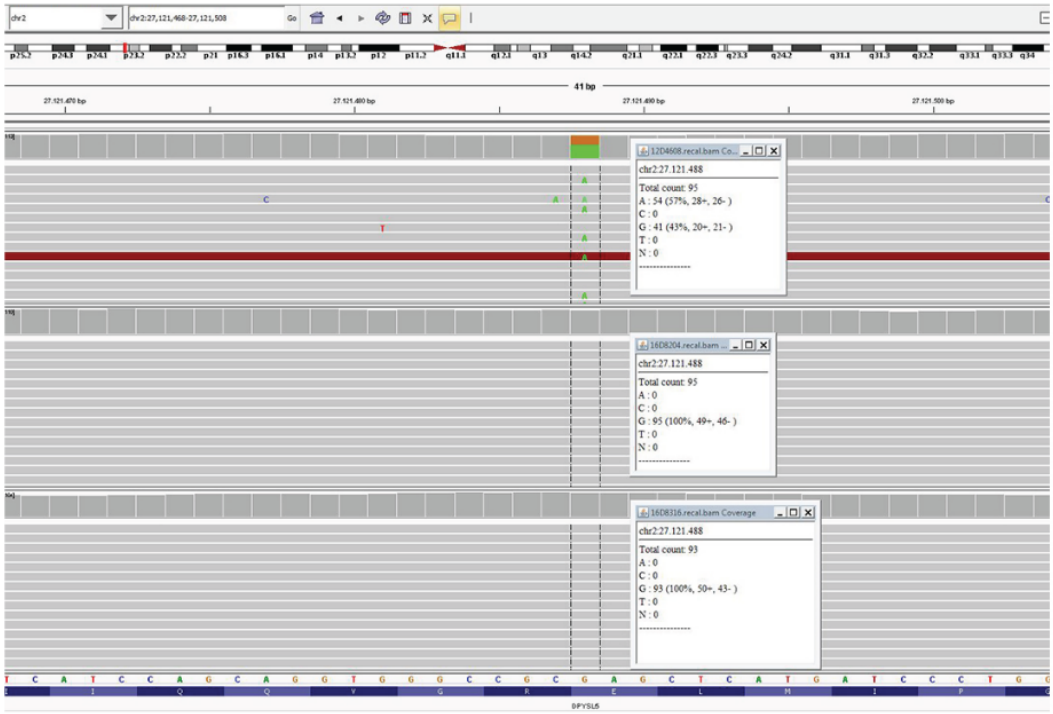


b



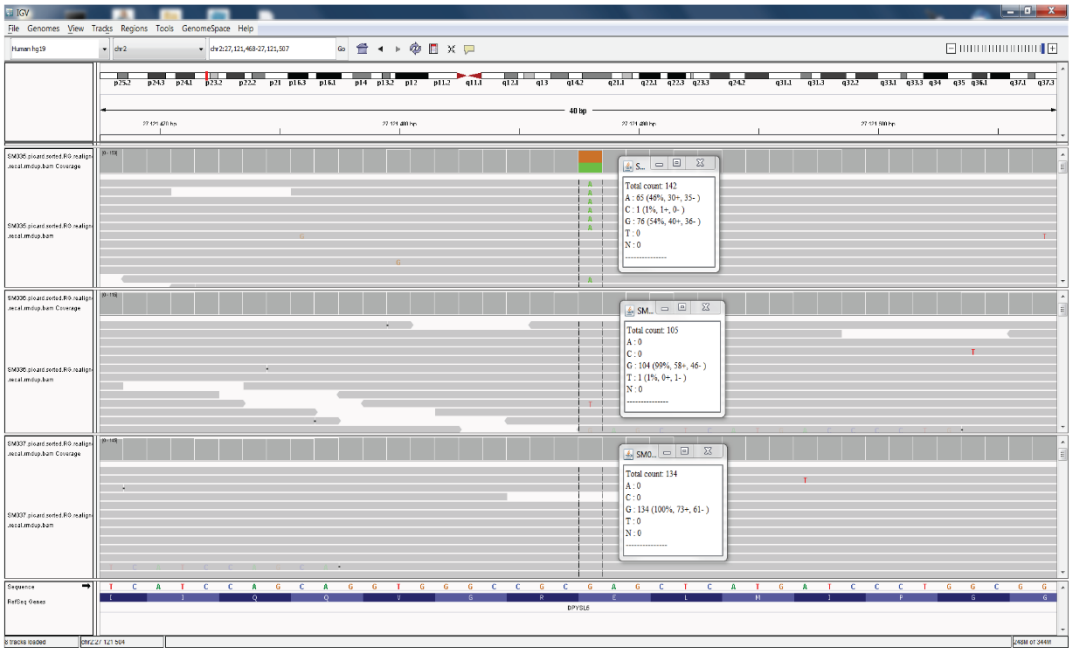
a- Integrative Genomics Viewer (IGV) screenshots of the *de novo DPYSL5* c.121G>A substitution (encoding p.(Glu41Lys)) in Patient 1 and his parents.
b- Representative Sanger sequencing electropherograms of the region included in exon 2 of *DPYSL5* in the Patient and parents' respective genomic DNAs.

Supplementary Fig. 2. Integrative Genomics Viewer (IGV) screenshots of the *de novo DPYSL5* c.121G>A substitution (encoding p.(Glu41Lys)) in Patient 2 and parents.

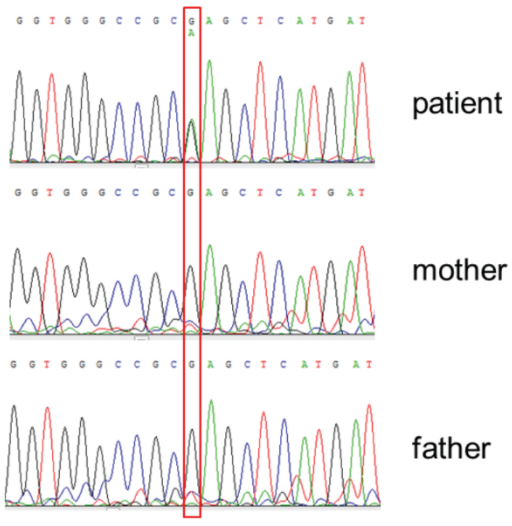


Supplementary Fig. 3. Integrative Genomics Viewer (IGV) screenshots and Sanger sequencing analysis of the *de novo DPYSL5* c.121G>A substitution (encoding p.(Glu41Lys)) in Patient 7 and parents.

a-

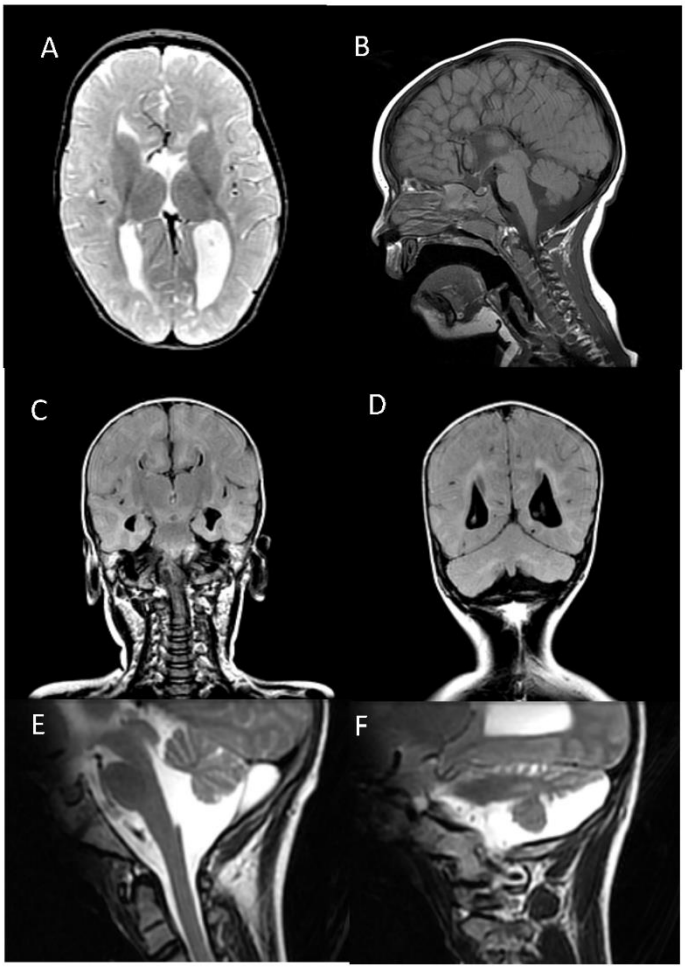


b-



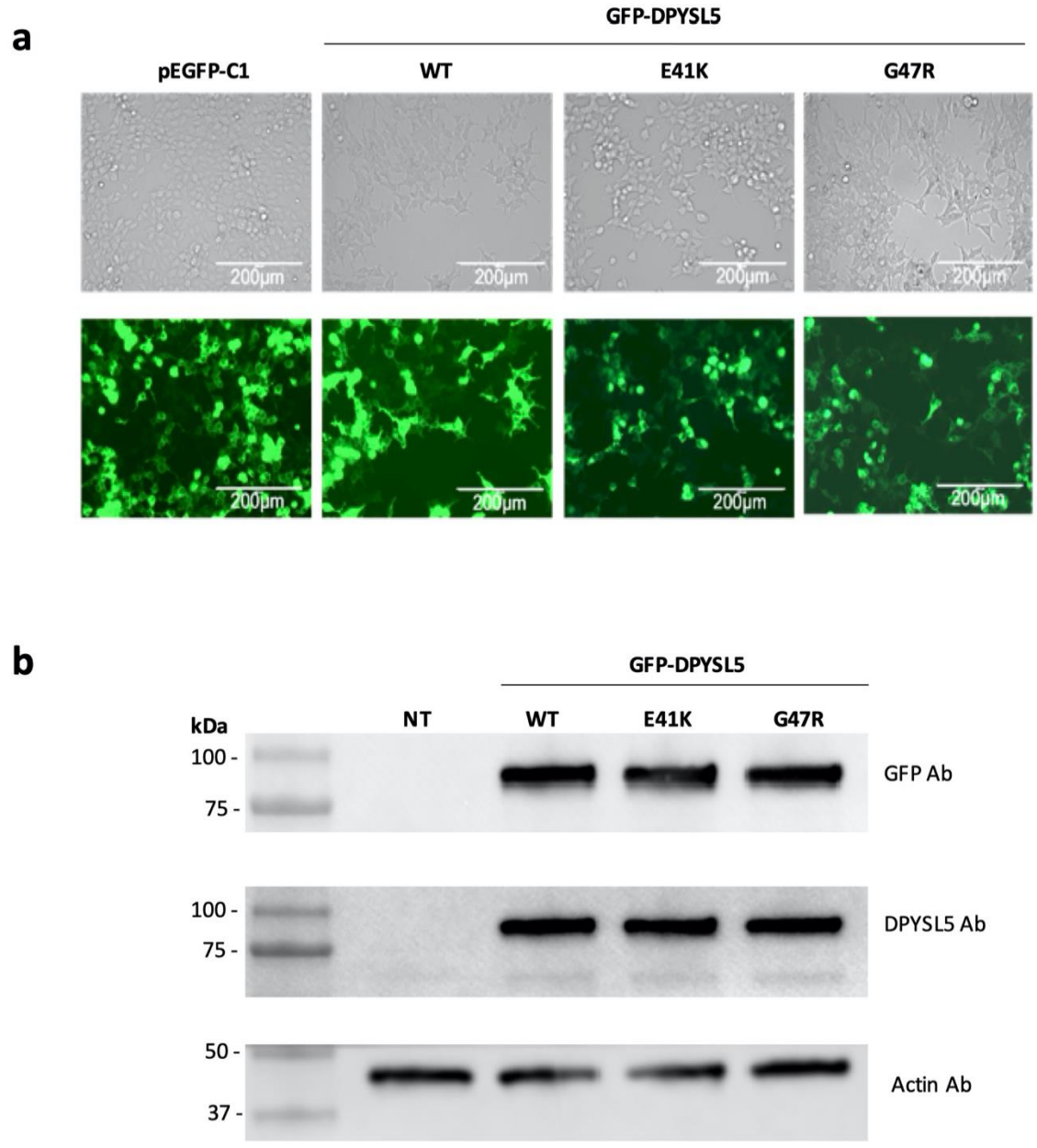
a- Integrative Genomics Viewer (IGV) screenshots of the *de novo DPYSL5* c.121G>A substitution (encoding p.(Glu41Lys)) in Patient 7 and her parents.
b- Representative Sanger sequencing electropherograms of the region included in exon 2 of *DPYSL5* in the Patient and her parents' respective genomic DNAs.

Supplementary Fig. 4. Brain Magnetic Resonance Imaging data from Patient 3 (Rotterdam)



A-D) Brain MRI at the age of 14 months, clockwise: A) T2 weighted image showing agenesis of corpus callosum and enlarged lateral ventricles. B) Sagittal T1weighetd midline image showing agenesis of corpus callosum, and mild hypoplasia of the inferior cerebellar vermis. C) Coronal FLAIR image showing agenesis of corpus callosum and bilateral hippocampal dysplasia. D) Coronal FLAIR image showing hypoplasia of the vermis and cerebellar hemispheres.
E,F) MRI at the age of 12 yr, sagittal T2 weighted images showing progressive cerebellar atrophy.

Supplementary Fig. 5. Expression levels of overexpressed of WT and mutant GFP-tagged DPYSL5 in HEK293 cells.



a- Images (Phase contrast and Fluorescent GFP) of HEK293T cellular cultures transfected with pEGFP-C1 (control), GFP-DPYSL5 WT, GFP-DPYSL5 E41K or GFP-DPYSL5 G47R expression plasmids and observed 48 hours post transfection. Scale bar, 200 µm.
b- Representative Immunoblotting of total protein lysates (30 µg) of untransfected (NT) or transfected HEK293 cells with DPYSL5 expression plasmids and tested with GFP, DPYSL5 and Actin Antibodies (n=3 independent transfections).

Supplemental references

1. Sobreira, N., Schiettecatte, F., Valle, D., and Hamosh, A. (2015). GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. Hum. Mutat. *36*, 928-930.
2. Harper, C.B., Mancini, G.M.S., van Slegtenhorst, M., and Cousin, M.A. (2017). Altered synaptobrevin-II trafficking in neurons expressing a synaptophysin mutation associated with a severe neurodevelopmental disorder. Neurobiol. Dis. *108*, 298-306.
3. Wright, C.F., Fitzgerald, T.W., Jones, W.D., Clayton, S., McRae, J.F., van Kogelenberg, M., King, D.A., Ambridge, K., Barrett, D.M., Bayzetinova, T., et al. (2015). Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. Lancet *385*, 1305-1314.
4. Aldinger, K.A., Timms, A.E., Thomson, Z., Mirzaa, G.M., Bennett, J.T., Rosenberg, A.B., Roco, C.M., Hirano, M., Abidi, F., Haldipur, P., et al. (2019). Redefining the Etiologic Landscape of Cerebellar Malformations. Am. J. Hum. Genet. *105*, 606-615.
5. Kellogg, E.H., Leaver-Fay, A., and Baker, D. (2011). Role of conformational sampling in computing mutation-induced changes in protein structure and stability. Proteins *79*, 830-838.
6. Ponnusamy, R., and Lohkamp, B. (2013). Insights into the oligomerization of CRMPs: crystal structure of human collapsin response mediator protein 5. J. Neurochem. *125*, 855-868.
7. McNicholas, S., Potterton, E., Wilson, K.S., and Noble, M.E. (2011). Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *67*, 386-394.
8. Ung, D.C., Iacono, G., Méziane, H., Blanchard, E., Papon, M.A., Selten, M., van Rhijn, J.R., Montjean, R., Rucci, J., Martin, S., et al. (2018). Ptchd1 deficiency induces excitatory synaptic and cognitive dysfunctions in mouse. Mol. Psychiatry *23*, 1356-1367.
9. Ricard, D., Rogemond, V., Charrier, E., Aguera, M., Bagnard, D., Belin, M.F., Thomasset, N., and Honnorat, J. (2001). Isolation and expression pattern of human Unc-33-like phosphoprotein 6/collapsin response mediator protein 5 (Ulip6/CRMP5): coexistence with Ulip2/CRMP2 in Sema3a- sensitive oligodendrocytes. J. Neurosci. *21*, 7203-7214.
10. Brot, S., Rogemond, V., Perrot, V., Chounlamountri, N., Auger, C., Honnorat, J., and Moradi-Améli, M. (2010). CRMP5 interacts with tubulin to inhibit neurite outgrowth, thereby modulating the function of CRMP2. J. Neurosci. *30*, 10639-10654.
11. Moutal, A., Dustrude, E.T., Largent-Milnes, T.M., Vanderah, T.W., Khanna, M., and Khanna, R. (2018). Blocking CRMP2 SUMOylation reverses neuropathic pain. Mol. Psychiatry *23*, 2119-2121.

Bibliographie

Adler, J. and Parmryd, I. (2010) 'Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient', *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77(8), pp. 733–742. doi: 10.1002/cyto.a.20896.

Adolphs, R. (2001) 'The neurobiology of social cognition', *Current Opinion in Neurobiology*, 11(2), pp. 231–239. doi: 10.1016/S0959-4388(00)00202-6.

Ady, V. *et al.* (2014) 'Type 1 metabotropic glutamate receptors (mGlu1) trigger the gating of GluD2 delta glutamate receptors', *EMBO reports*, 15(1), pp. 103–109. doi: 10.1002/embr.201337371.

Adzhubei, I. A. *et al.* (2010) 'A method and server for predicting damaging missense mutations', *Nature Methods*, 7(4), pp. 248–249. doi: 10.1038/nmeth0410-248.

Ahmed, S., Goh, W. I. and Bu, W. (2010) 'I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(4), pp. 350–356. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.11.008.

Allen, K. M. *et al.* (1998) 'PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation', *Nature Genetics*, 20(1), pp. 25–30. doi: 10.1038/1675.

Alvarez, F. J. (2017) 'Gephyrin and the regulation of synaptic strength and dynamics at glycinergic inhibitory synapses', *Brain Research Bulletin*, 129, pp. 50–65. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.09.003.

Anderson, G. R. *et al.* (2012) 'Candidate autism gene screen identifies critical role for cell-adhesion molecule CASPR2 in dendritic arborization and spine development', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(44), pp. 18120–18125. doi: 10.1073/pnas.1216398109.

Anderson, L. L. *et al.* (2019) 'A Systematic Review of U.S. Studies on the Prevalence of Intellectual or Developmental Disabilities Since 2000', *Intellectual and Developmental Disabilities*, 57(5), pp. 421–438. doi: 10.1352/1934-9556-57.5.421.

Anney, R. *et al.* (2010) 'A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism', *Human Molecular Genetics*, 19(20), p. 4072. doi: 10.1093/hmg/ddq307.

APA (2004) *DSM-IV-TR: manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux*. Elsevier Masson.

APA (2015) *DSM-5 - Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux*. Elsevier Masson.

Ars, E. *et al.* (2003) 'Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients', *Journal of Medical Genetics*, 40(6), p. e82. doi: 10.1136/jmg.40.6.e82.

Asperger, H. (1944) 'Die „Autistischen Psychopathen" im Kindesalter', *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 117(1), pp. 76–136. doi: 10.1007/BF01837709.

Assary, E. *et al.* (2018) 'Gene-environment interaction and psychiatric disorders: Review and future directions', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 77, pp. 133–143. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.10.016.

Autin, P.-L. (2014) 'Penser, divaguer : l'association des idées chez Locke', *Astérion. Philosophie, histoire des idées, pensée politique*, (12). doi: 10.4000/asterion.2498.

Aylward, E. H. *et al.* (1999) 'MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults', *Neurology*, 53(9), pp. 2145–2150. doi: 10.1212/wnl.53.9.2145.

Ba, W., van der Raadt, J. and Nadif Kasri, N. (2013) 'Rho GTPase signaling at the synapse: Implications for intellectual disability', *Experimental Cell Research*, 319(15), pp. 2368–2374. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.05.033.

Bailey, A. *et al.* (1995) 'Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study', *Psychological Medicine*, 25(1), pp. 63–77. doi: 10.1017/S0033291700028099.

Bailey, A., Phillips, W. and Rutter, M. (1996) 'Autism: Towards an Integration of Clinical, Genetic, Neuropsychological, and Neurobiological Perspectives', *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 37(1), pp. 89–126. doi: 10.1111/j.1469-7610.1996.tb01381.x.

Bakken, T. E. *et al.* (2015) 'Spatiotemporal dynamics of the postnatal developing primate brain transcriptome', *Human Molecular Genetics*, 24(15), pp. 4327–4339. doi: 10.1093/hmg/ddv166.

Bargiela, S., Steward, R. and Mandy, W. (2016) 'The Experiences of Late-diagnosed Women with Autism Spectrum Conditions: An Investigation of the Female Autism Phenotype', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(10), pp. 3281–3294. doi: 10.1007/s10803-016-2872-8.

Baron-Cohen, S. *et al.* (2015) 'Elevated fetal steroidogenic activity in autism', *Molecular Psychiatry*, 20(3), pp. 369–376. doi: 10.1038/mp.2014.48.

Baron-Cohen, S. *et al.* (2020) 'Foetal oestrogens and autism', *Molecular Psychiatry*, 25(11), pp. 2970–2978. doi: 10.1038/s41380-019-0454-9.

Bauman, M. L. and Kemper, T. L. (2005) *The Neurobiology of Autism*. JHU Press.

Bear, M. F., Huber, K. M. and Warren, S. T. (2004) 'The mGluR theory of fragile X mental retardation', *Trends in Neurosciences*, 27(7), pp. 370–377. doi: 10.1016/j.tins.2004.04.009.

Begni, S. *et al.* (2002) 'Association between the ionotropic glutamate receptor kainate 3 (GRIK3) ser310ala polymorphism and schizophrenia', *Molecular Psychiatry*, 7(4), pp. 416–418. doi: 10.1038/sj.mp.4000987.

Benamer, N. *et al.* (2018) 'GluD1, linked to schizophrenia, controls the burst firing of dopamine neurons', *Molecular Psychiatry*, 23(3), pp. 691–700. doi: 10.1038/mp.2017.137.

Berg, J. M. and Geschwind, D. H. (2012) 'Autism genetics: searching for specificity and convergence', *Genome Biology*, 13(7), p. 247. doi: 10.1186/gb-2012-13-7-247.

Berman, H. M. *et al.* (2000) 'The Protein Data Bank', *Nucleic Acids Research*, 28(1), pp. 235–242. doi: 10.1093/nar/28.1.235.

Bettelheim, B. (1972) *Empty Fortress*. Simon and Schuster.

Bhalla, K. *et al.* (2008) 'Alterations in CDH15 and KIRREL3 in Patients with Mild to Severe Intellectual Disability', *The American Journal of Human Genetics*, 83(6), pp. 703–713. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.10.020.

Billuart, P. *et al.* (1998) 'Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation', *Nature*, 392(6679), pp. 923–926. doi: 10.1038/31940.

Binet, A. and Simon, T. (1907) *Les enfants anormaux: guide pour l'admission des enfants anormaux dans les classes de ...* Colin. Available at: http://archive.org/details/lesenfantsanorm00binegoog (Accessed: 29 August 2020).

Bishop, A. L. and Hall, A. (2000) 'Rho GTPases and their effector proteins', *Biochemical Journal*, 348(2), pp. 241–255. doi: 10.1042/bj3480241.

Bleuler, M. and Bleuler, R. (1986) 'Dementia praecox oder die Gruppe der Schizophrenien: Eugen Bleuler', *The British Journal of Psychiatry*, 149(5), pp. 661–664. doi: 10.1192/bjp.149.5.661.

Blotta, S. *et al.* (2012) 'Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma', *Blood*, 120(25), pp. 5002–5013. doi: 10.1182/blood-2011-07-368142.

Boda, B. *et al.* (2004) 'The Mental Retardation Protein PAK3 Contributes to Synapse Formation and Plasticity in Hippocampus', *Journal of Neuroscience*, 24(48), pp. 10816–10825. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2931-04.2004.

Boeddrich, A. *et al.* (2006) 'An arginine/lysine-rich motif is crucial for VCP/p97-mediated modulation of ataxin-3 fibrillogenesis', *The EMBO Journal*, 25(7), pp. 1547–1558. doi: 10.1038/sj.emboj.7601043.

Bongmba, O. Y. N. *et al.* (2011) 'Modulation of dendritic spines and synaptic function by Rac1: A possible link to Fragile X syndrome pathology', *Brain research*, 1399, pp. 79–95. doi: 10.1016/j.brainres.2011.05.020.

Borrie, S. C. *et al.* (2017) 'Cognitive Dysfunctions in Intellectual Disabilities: The Contributions of the Ras-MAPK and PI3K-AKT-mTOR Pathways', *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 18(1), pp. 115–142. doi: 10.1146/annurev-genom-091416-035332.

Bosanac, I. *et al.* (2009) 'The structure of SHH in complex with HHIP reveals a recognition role for the Shh pseudo active site in signaling', *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(7), pp. 691–697. doi: 10.1038/nsmb.1632.

Bossu, J.-L. and Roux, S. (2019) 'Les modèles animaux d'étude de l'autisme - Le modèle « valproate »', *médecine/sciences*, 35(3), pp. 236–243. doi: 10.1051/medsci/2019036.

Bourgeron, T. (2016) 'Current knowledge on the genetics of autism and propositions for future research', *Comptes Rendus Biologies*, 339(7), pp. 300–307. doi: 10.1016/j.crvi.2016.05.004.

Burbach, J. P. H. and van der Zwaag, B. (2009) 'Contact in the genetics of autism and schizophrenia', *Trends in Neurosciences*, 32(2), pp. 69–72. doi: 10.1016/j.tins.2008.11.002.

Burbelo, P. D., Drechsel, D. and Hall, A. (1995) 'A Conserved Binding Motif Defines Numerous Candidate Target Proteins for Both Cdc42 and Rac GTPases', *Journal of Biological Chemistry*, 270(49). doi: 10.1074/jbc.270.49.29071.

Burke, R. *et al.* (1999) 'Dispatched, a Novel Sterol-Sensing Domain Protein Dedicated to the Release of Cholesterol-Modified Hedgehog from Signaling Cells', *Cell*, 99(7), pp. 803–815. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81677-3.

Bystron, I., Blakemore, C. and Rakic, P. (2008) 'Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited', *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(2), pp. 110–122. doi: 10.1038/nrn2252.

Caito, S. and Aschner, M. (2017) 'Developmental Neurotoxicity of Lead', *Advances in Neurobiology*, 18, pp. 3–12. doi: 10.1007/978-3-319-60189-2_1.

Canitano, R. (2007) 'Epilepsy in autism spectrum disorders', *European Child & Adolescent Psychiatry*, 16(1), pp. 61–66. doi: 10.1007/s00787-006-0563-2.

Carballo, G. B. *et al.* (2018) 'A highlight on Sonic hedgehog pathway', *Cell Communication and Signaling : CCS*, 16. doi: 10.1186/s12964-018-0220-7.

Carpenter, D. *et al.* (1998) 'Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), pp. 13630–13634.

Carstea, E. D. *et al.* (1997) 'Niemann-Pick C1 Disease Gene: Homology to Mediators of Cholesterol Homeostasis', 277, p. 5.

Carter, J. C. *et al.* (2008) 'Selective Cerebral Volume Reduction in Rett Syndrome: A Multiple-Approach MR Imaging Study', *American Journal of Neuroradiology*, 29(3), pp. 436–441. doi: 10.3174/ajnr.A0857.

Castets, M. *et al.* (2005) 'FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts', *Human Molecular Genetics*, 14(6), pp. 835–844. doi: 10.1093/hmg/ddi077.

Chakrabarti, S. and Fombonne, E. (2001) 'Pervasive Developmental Disorders in Preschool Children', *JAMA*, 285(24), pp. 3093–3099. doi: 10.1001/jama.285.24.3093.

Chaudhry, A. *et al.* (2015) 'Phenotypic spectrum associated with PTCHD1 deletions and truncating mutations includes intellectual disability and autism spectrum disorder', *Clinical Genetics*, 88(3), pp. 224–233. doi: 10.1111/cge.12482.

Chelini, G. *et al.* (2019) 'Aberrant Somatosensory Processing and Connectivity in Mice Lacking Engrailed-2', *The Journal of Neuroscience*, 39(8), pp. 1525–1538. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0612-18.2018.

Chemerovski-Glikman, M. *et al.* (2017) 'Inhibition of the Aggregation and Toxicity of the Minimal Amyloidogenic Fragment of Tau by Its Pro-Substituted Analogues', *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 23(40), pp. 9618–9624. doi: 10.1002/chem.201701218.

Chen, C.-H. *et al.* (2014) 'Genetic analysis of GABRB3 as a candidate gene of autism spectrum disorders', *Molecular Autism*, 5, p. 36. doi: 10.1186/2040-2392-5-36.

Chen, L. *et al.* (2000) 'Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms', *Nature*, 408(6815), pp. 936–943. doi: 10.1038/35050030.

Chen, S. *et al.* (2016) 'Maternal autoimmune diseases and the risk of autism spectrum disorders in offspring: A systematic review and meta-analysis', *Behavioural Brain Research*, 296, pp. 61–69. doi: 10.1016/j.bbr.2015.08.035.

Cheng, D. *et al.* (2006) 'Relative and Absolute Quantification of Postsynaptic Density Proteome Isolated from Rat Forebrain and Cerebellum', *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(6), pp. 1158–1170. doi: 10.1074/mcp.D500009-MCP200.

Chetkovich, D. M. *et al.* (2002) 'Phosphorylation of the postsynaptic density-95 (PSD-95)/discs large/zona occludens-1 binding site of stargazin regulates binding to PSD-95 and synaptic targeting of AMPA receptors', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(14), pp. 5791–5796. doi: 20026591.

Cho, G. *et al.* (2014) 'Arx together with FoxA2, regulates Shh floor plate expression', *Developmental biology*, 393(1), pp. 137–148. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.06.012.

Cho, K.-O., Hunt, C. A. and Kennedy, M. B. (1992) 'The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the drosophila discs-large tumor suppressor protein', *Neuron*, 9(5), pp. 929–942. doi: 10.1016/0896-6273(92)90245-9.

Choy, R. W.-Y. *et al.* (2014) 'Retromer Mediates a Discrete Route of Local Membrane Delivery to Dendrites', *Neuron*, 82(1), pp. 55–62. doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.018.

Christensen, J. *et al.* (2013) 'Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism', *JAMA*, 309(16), pp. 1696–1703. doi: 10.1001/jama.2013.2270.

Chudley, A. E. *et al.* (2005) 'Ensemble des troubles causés par l'alcoolisation fœtale : lignes directrices canadiennes concernant le diagnostic', *CMAJ*, 172(5 suppl), pp. SF1–SF21. doi: 10.1503/cmaj.050098.

Chung, H. J. *et al.* (2004) 'Regulation of the NMDA Receptor Complex and Trafficking by Activity-Dependent Phosphorylation of the NR2B Subunit PDZ Ligand', *The Journal of Neuroscience*, 24(45), pp. 10248–10259. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0546-04.2004.

Chung, J. H. *et al.* (2014) 'A PTCH1 Homolog Transcriptionally Activated by p53 Suppresses Hedgehog Signaling', *The Journal of Biological Chemistry*, 289(47), pp. 33020–33031. doi: 10.1074/jbc.M114.597203.

Coley, A. A. (2018) 'PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism?', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 82, pp. 187–194. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.11.016.

Collaborative Linkage Study of Autism (2001) 'An autosomal genomic screen for autism', *American Journal of Medical Genetics*, 105(8), pp. 609–615.

Collins, B. M. *et al.* (2008) 'Structure of Vps26B and Mapping of its Interaction with the Retromer Protein Complex', *Traffic*, 9(3), pp. 366–379. doi: https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00688.x.

Committee on Genetics (2001) 'Health Supervision for Children With Down Syndrome', *Pediatrics*, 107(2), pp. 442–449. doi: 10.1542/peds.107.2.442.

Conchillo-Solé, O. *et al.* (2007) 'AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides', *BMC Bioinformatics*, 8(1), p. 65. doi: 10.1186/1471-2105-8-65.

Courchesne, E. *et al.* (1988) 'Hypoplasia of Cerebellar Vermal Lobules VI and VII in Autism', *New England Journal of Medicine*, 318(21), pp. 1349–1354. doi: 10.1056/NEJM198805263182102.

Courchesne, E., Campbell, K. and Solso, S. (2011) 'Brain Growth Across the Life Span in Autism: Age-Specific Changes in Anatomical Pathology', *Brain research*, 1380, pp. 138–145. doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.101.

Courchesne, E., Redcay, E. and Kennedy, D. P. (2004) 'The autistic brain: birth through adulthood', *Current Opinion in Neurology*, 17(4), pp. 489–496. doi: 10.1097/01.wco.0000137542.14610.b4.

Coussen, F. *et al.* (2002) 'Recruitment of the Kainate Receptor Subunit Glutamate Receptor 6 by Cadherin/Catenin Complexes', *The Journal of Neuroscience*, 22(15), pp. 6426–6436. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-15-06426.2002.

Crider, A. *et al.* (2014) 'Dysregulation of estrogen receptor beta (ERβ), aromatase (CYP19A1), and ER co-activators in the middle frontal gyrus of autism spectrum disorder subjects', *Molecular Autism*, 5. doi: 10.1186/2040-2392-5-46.

Criqui, A. and Baulande, S. (2010) 'Le séquençage de l'exome au secours des maladies génétiques', *médecine/sciences*, 26(5), pp. 452–454. doi: 10.1051/medsci/2010265452.

Cueni, L. *et al.* (2008) 'T-type Ca 2+ channels, SK2 channels and SERCAs gate sleep-related oscillations in thalamic dendrites', *Nature Neuroscience*, 11(6), pp. 683–692. doi: 10.1038/nn.2124.

Danelon, V. *et al.* (2020) 'Modular and Distinct Plexin-A4/FARP2/Rac1 Signaling Controls Dendrite Morphogenesis', *Journal of Neuroscience*, 40(28), pp. 5413–5430. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2730-19.2020.

Danglot, L. *et al.* (2004) 'Morphologically identified glycinergic synapses in the hippocampus', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 27(4), pp. 394–403. doi: 10.1016/j.mcn.2004.05.007.

David, M. *et al.* (2014) 'Prevalence and characteristics of children with mild intellectual disability in a French county', *Journal of intellectual disability research: JIDR*, 58(7), pp. 591–602. doi: 10.1111/jir.12057.

Davies, J. P., Levy, B. and Ioannou, Y. A. (2000) 'Evidence for a Niemann–Pick C (NPC) Gene Family: Identification and Characterization of NPC1L1', *Genomics*, 65(2), pp. 137–145. doi: 10.1006/geno.2000.6151.

Davis, E. *et al.* (1992) 'Autism and developmental abnormalities in children with perinatal cocaine exposure.', *Journal of the National Medical Association*, 84(4), pp. 315–319.

Dawson, M., Mottron, L. and Gernsbacher, M. A. (2008) '2.39 - Learning in Autism', in Byrne, J. H. (ed.) *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*. Oxford: Academic Press, pp. 759–772. doi: 10.1016/B978-012370509-9.00152-2.

De, P. *et al.* (2020) 'Active RAC1 Promotes Tumorigenic Phenotypes and Therapy Resistance in Solid Tumors', *Cancers*, 12(6). doi: 10.3390/cancers12061541.

De Rubeis, S. *et al.* (2014) 'Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism', *Nature*, 515(7526), pp. 209–215. doi: 10.1038/nature13772.

Deciphering Developmental Disorders Study (2015) 'Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders', *Nature*, 519(7542), pp. 223–228. doi: 10.1038/nature14135.

DeFilippis, M. (2018) 'Depression in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorder', *Children*, 5(9), p. 112. doi: 10.3390/children5090112.

Delgado, J. *et al.* (2019) 'FoldX 5.0: working with RNA, small molecules and a new graphical interface', *Bioinformatics (Oxford, England)*, 35(20), pp. 4168–4169. doi: 10.1093/bioinformatics/btz184.

Dell'Osso, L. *et al.* (2016) 'From Asperger's Autistischen Psychopathen to DSM-5 Autism Spectrum Disorder and Beyond: A Subthreshold Autism Spectrum Model', *Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health : CP & EMH*, 12, pp. 120–131. doi: 10.2174/1745017901612010120.

Desmet, F.-O. *et al.* (2009) 'Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals', *Nucleic Acids Research*, 37(9), pp. e67–e67. doi: 10.1093/nar/gkp215.

Devlin, B., Melhem, N. and Roeder, K. (2011) 'Do common variants play a role in risk for autism? Evidence and theoretical musings', *Brain research*, 1380, pp. 78–84. doi: 10.1016/j.brainres.2010.11.026.

Di Donato, N. *et al.* (2017) 'Lissencephaly: Expanded imaging and clinical classification', *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 173(6), pp. 1473–1488. doi: 10.1002/ajmg.a.38245.

DiGuiseppi, C. *et al.* (2010) 'Screening for Autism Spectrum Disorders in Children With Down Syndrome: Population Prevalence and Screening Test Characteristics', *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, 31(3), pp. 181–191. doi: 10.1097/DBP.0b013e3181d5aa6d.

Dingledine, R. *et al.* (1999) 'The Glutamate Receptor Ion Channels', *Pharmacological Reviews*, 51(1), pp. 7–62.

Dingwall, C. *et al.* (1988) 'The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen', *The Journal of Cell Biology*, 107(3), pp. 841–849.

Dityatev, A., Bukalo, O. and Schachner, M. (2008) 'Modulation of synaptic transmission and plasticity by cell adhesion and repulsion molecules', *Neuron Glia Biology*, 4(3), pp. 197–209. doi: 10.1017/S1740925X09990111.

Doan, R. N. *et al.* (2016) 'Mutations in Human Accelerated Regions Disrupt Cognition and Social Behavior', *Cell*, 167(2), pp. 341-354.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.071.

Donati, G., Davis, R. and Forrester, G. S. (2020) 'Gaze behaviour to lateral face stimuli in infants who do and do not gain an ASD diagnosis', *Scientific Reports*, 10. doi: 10.1038/s41598-020-69898-9.

Dong, F. *et al.* (2016) 'Deletion of CTNNB1 in inhibitory circuitry contributes to autism-associated behavioral defects', *Human Molecular Genetics*, 25(13), pp. 2738–2751. doi: 10.1093/hmg/ddw131.

Douard, E. *et al.* (2020) 'Effect Sizes of Deletions and Duplications on Autism Risk Across the Genome', *American Journal of Psychiatry*, p. appi.ajp.2020.19080834. doi: 10.1176/appi.ajp.2020.19080834.

Duda, M. *et al.* (2018) 'Brain-specific functional relationship networks inform autism spectrum disorder gene prediction', *Translational Psychiatry*, 8. doi: 10.1038/s41398-018-0098-6.

Durand, C. M. *et al.* (2007) 'Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders', *Nature Genetics*, 39(1), pp. 25–27. doi: 10.1038/ng1933.

Edelson, M. G. (2016) 'Are the Majority of Children With Autism Mentally Retarded?: A Systematic Evaluation of the Data', *Focus on Autism and Other Developmental Disabilities*. doi: 10.1177/10883576060210020301.

Edwards, D. C. *et al.* (1999) 'Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics', *Nature Cell Biology*, 1(5), pp. 253–259. doi: 10.1038/12963.

Ellison, J. W., Rosenfeld, J. A. and Shaffer, L. G. (2013) 'Genetic Basis of Intellectual Disability', *Annual Review of Medicine*, 64(1), pp. 441–450. doi: 10.1146/annurev-med-042711-140053.

Elsabbagh, M. *et al.* (2012) 'Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders', *Autism Research*, 5(3), pp. 160–179. doi: 10.1002/aur.239.

Erickson, C. A. *et al.* (2005) 'Gastrointestinal Factors in Autistic Disorder: A Critical Review', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 35(6), p. 713. doi: 10.1007/s10803-005-0019-4.

Esquirol, É. (1772-1840) A. du texte (1838) *Des maladies mentales : considérées sous les rapports médical, hygiénique et médico-légal. [Volume 2] / par E. Esquirol,...* Available at: https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k85089d (Accessed: 28 August 2020).

Faghihi, M. A. and Wahlestedt, C. (2009) 'Regulatory roles of natural antisense transcripts', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(9), pp. 637–643. doi: 10.1038/nrm2738.

Fakhro, K. A. (2020) 'Genomics of Autism', *Advances in Neurobiology*, 24, pp. 83–96. doi: 10.1007/978-3-030-30402-7_3.

Fallah, H. *et al.* (2020) 'IFNG/IFNG-AS1 expression level balance: implications for autism spectrum disorder', *Metabolic Brain Disease*, 35(2), pp. 327–333. doi: 10.1007/s11011-019-00510-4.

Fan, J. *et al.* (2007) 'Male germ cell-specific expression of a novel Patched-domain containing gene Ptchd3', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(3), pp. 757–761. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.09.047.

Feingold, J., Fellous, M. and Solignac, M. (1998) 'Principe de génétique humaine', in. Hermann, p. chapitre 12, 305-319.

Filges, I. *et al.* (2011) 'Deletion in Xp22.11: PTCHD1 is a candidate gene for X-linked intellectual disability with or without autism', *Clinical Genetics*, 79(1), pp. 79–85. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01590.x.

Filosa, A. *et al.* (2009) 'Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport', *Nature Neuroscience*, 12(10), pp. 1285–1292. doi: 10.1038/nn.2394.

Folstein, S. E. and Rosen-Sheidley, B. (2001) 'Genetics of austim: complex aetiology for a heterogeneous disorder', *Nature Reviews Genetics*, 2(12), pp. 943–955. doi: 10.1038/35103559.

Folstein, S. and Rutter, M. (1977) 'Infantile Autism: A Genetic Study of 21 Twin Pairs', *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 18(4), pp. 297–321. doi: 10.1111/j.1469-7610.1977.tb00443.x.

Frazier, T. W. *et al.* (2012) 'A Two-Year Longitudinal MRI Study of the Corpus Callosum in Autism', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 42(11), pp. 2312–2322. doi: 10.1007/s10803-012-1478-z.

Frazier, T. W. *et al.* (2014) 'Behavioral and Cognitive Characteristics of Females and Males With Autism in the Simons Simplex Collection', *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 53(3), pp. 329-340.e3. doi: 10.1016/j.jaac.2013.12.004.

Frei, J. A. and Stoeckli, E. T. (2017) 'SynCAMs – From axon guidance to neurodevelopmental disorders', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 81, pp. 41–48. doi: 10.1016/j.mcn.2016.08.012.

Freud, S. and Jung, C. G. (1907) 'Correspondance, vol. I', in Fivaz-Silbermann, R. (tran.) *Correspondance, vol. I*. Gallimard, 1975. Paris.

Froehlich-Santino, W. *et al.* (2014) 'Prenatal and perinatal risk factors in a twin study of autism spectrum disorders', *Journal of Psychiatric Research*, 54, pp. 100–108. doi: 10.1016/j.jpsychires.2014.03.019.

Frye, R. E. and Rossignol, D. A. (2011) 'Mitochondrial dysfunction can connect the diverse medical symptoms associated with autism spectrum disorders', *Pediatric research*, 69(5 Pt 2), pp. 41R-47R. doi: 10.1203/PDR.0b013e318212f16b.

Fujita, E. *et al.* (2012) 'Cadm1-Expressing Synapses on Purkinje Cell Dendrites Are Involved in Mouse Ultrasonic Vocalization Activity', *PLOS ONE*, 7(1), p. e30151. doi: 10.1371/journal.pone.0030151.

Funke, L., Dakoji, S. and Bredt, D. S. (2005) 'Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions', *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), pp. 219–245. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133339.

Gambin, T. *et al.* (2017) 'Identification of novel candidate disease genes from de novo exonic copy number variants', *Genome Medicine*, 9(1), p. 83. doi: 10.1186/s13073-017-0472-7.

Gascon, M. *et al.* (2011) 'Effects of pre and postnatal exposure to low levels of polybromodiphenyl ethers on neurodevelopment and thyroid hormone levels at 4years of age', *Environment International*, 37(3), pp. 605–611. doi: 10.1016/j.envint.2010.12.005.

Georgi, B. *et al.* (2014) 'Genomic View of Bipolar Disorder Revealed by Whole Genome Sequencing in a Genetic Isolate', *PLoS Genetics*, 10(3). doi: 10.1371/journal.pgen.1004229.

Geschwind, D. H. (2009) 'Advances in Autism', *Annual review of medicine*, 60, pp. 367–380. doi: 10.1146/annurev.med.60.053107.121225.

Getahun, D. *et al.* (2018) 'Association between maternal hypothyroidism and autism spectrum disorders in children', *Pediatric Research*, 83(3), pp. 580–588. doi: 10.1038/pr.2017.308.

Geuze, E., Vermetten, E. and Bremner, J. D. (2005) 'MR-based in vivo hippocampal volumetrics: 2. Findings in neuropsychiatric disorders', *Molecular Psychiatry*, 10(2), pp. 160–184. doi: 10.1038/sj.mp.4001579.

Ghahramani Seno, M. M. *et al.* (2011) 'Human PTCHD3 nulls: rare copy number and sequence variants suggest a non-essential gene', *BMC Medical Genetics*, 12, p. 45. doi: 10.1186/1471-2350-12-45.

Ghidini, A. (1996) 'Idiopathic Fetal Growth Restriction: A Pathophysiologic Approach', *Obstetrical & Gynecological Survey*, 51(6), pp. 376–382.

Gillberg, C. and Souza, L. D. (2002) 'Head circumference in autism, Asperger syndrome, and ADHD: a comparative study', *Developmental Medicine & Child Neurology*, 44(5), pp. 296–300. doi: 10.1111/j.1469-8749.2002.tb00814.x.

Gilman, S. R. *et al.* (2011) 'Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses', *Neuron*, 70(5), pp. 898–907. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.021.

Golzio, C. *et al.* (2012) 'KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes associated with the 16p11.2 CNV', *Nature*, 485(7398), pp. 363–367. doi: 10.1038/nature11091.

Govek, E.-E. *et al.* (2004) 'The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis', *Nature Neuroscience*, 7(4), pp. 364–372. doi: 10.1038/nn1210.

Grant, S. G. N. (2019) 'Synapse diversity and synaptome architecture in human genetic disorders', *Human Molecular Genetics*, 28(R2), pp. R219–R225. doi: 10.1093/hmg/ddz178.

Gray, E. G. (1959) 'Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex', *Journal of Anatomy*, 93(Pt 4), pp. 420–433.

Greenblatt, J. M., Huffman, L. C. and Reiss, A. L. (1994) 'Folic acid in neurodevelopment and child psychiatry', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 18(4), pp. 647–660. doi: 10.1016/0278-5846(94)90074-4.

Grisshammer, R. (2009) 'Purification of recombinant G-protein-coupled receptors', *Methods in enzymology*, 463, pp. 631–645. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63036-6.

Groce, N. *et al.* (2014) 'Malnutrition and disability: unexplored opportunities for collaboration', *Paediatrics and International Child Health*, 34(4), pp. 308–314. doi: 10.1179/2046905514Y.0000000156.

Guna, A. and Hegde, R. S. (2018) 'Transmembrane Domain Recognition during Membrane Protein Biogenesis and Quality Control', *Current Biology*, 28(8), pp. R498–R511. doi: 10.1016/j.cub.2018.02.004.

Haditsch, U. *et al.* (2009) 'A central role for the small GTPase Rac1 in hippocampal plasticity and spatial learning and memory', *Molecular and cellular neurosciences*, 41(4), pp. 409–419. doi: 10.1016/j.mcn.2009.04.005.

Hall, A. (2012) 'Rho family GTPases', *Biochemical Society Transactions*, 40(6), pp. 1378–1382. doi: 10.1042/BST20120103.

Hamdan, F. F. *et al.* (2009) 'Mutations in SYNGAP1 in Autosomal Nonsyndromic Mental Retardation', *The New England journal of medicine*, 360(6), pp. 599–605. doi: 10.1056/NEJMoa0805392.

Hamedani, S. Y. *et al.* (2017) 'Ras-like without CAAX 2 (RIT2): a susceptibility gene for autism spectrum disorder', *Metabolic Brain Disease*, 32(3), pp. 751–755. doi: 10.1007/s11011-017-9969-4.

Hanna, N. *et al.* (2005) 'Mécanismes et conséquences des mutations', *médecine/sciences*, 21(11), pp. 969–980. doi: 10.1051/medsci/20052111969.

Hardan, A. Y. *et al.* (2004) 'Increased frontal cortical folding in autism: a preliminary MRI study', *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 131(3), pp. 263–268. doi: 10.1016/j.pscychresns.2004.06.001.

Harris, S. R., MacKay, L. L. and Osborn, J. A. (1995) 'Autistic behaviors in offspring of mothers abusing alcohol and other drugs: a series of case reports', *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 19(3), pp. 660–665. doi: 10.1111/j.1530-0277.1995.tb01564.x.

Hawi, Z. *et al.* (2015) 'The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder', *Molecular Psychiatry*, 20(3), pp. 289–297. doi: 10.1038/mp.2014.183.

Haxby, J. V., Hoffman, E. A. and Gobbini, M. I. (2000) 'The distributed human neural system for face perception', *Trends in Cognitive Sciences*, 4(6), pp. 223–233. doi: 10.1016/S1364-6613(00)01482-0.

Hayashi, M. L. *et al.* (2004) 'Altered Cortical Synaptic Morphology and Impaired Memory Consolidation in Forebrain- Specific Dominant-Negative PAK Transgenic Mice', *Neuron*, 42(5), pp. 773–787. doi: 10.1016/j.neuron.2004.05.003.

Heasman, S. J. and Ridley, A. J. (2008) 'Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(9), pp. 690–701. doi: 10.1038/nrm2476.

Heide, S. *et al.* (2017) 'Copy Number Variations Found in Patients with a Corpus Callosum Abnormality and Intellectual Disability', *The Journal of Pediatrics*, 185, pp. 160-166.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.02.023.

Hennik, P. B. van *et al.* (2003) 'The C-terminal Domain of Rac1 Contains Two Motifs That Control Targeting and Signaling Specificity', *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), pp. 39166–39175. doi: 10.1074/jbc.M307001200.

Herbert, M. R. *et al.* (2004) 'Localization of white matter volume increase in autism and developmental language disorder', *Annals of Neurology*, 55(4), pp. 530–540. doi: 10.1002/ana.20032.

Herbert, M. R. *et al.* (2005) 'Brain asymmetries in autism and developmental language disorder: a nested whole-brain analysis', *Brain*, 128(1), pp. 213–226. doi: 10.1093/brain/awh330.

Hering, H., Lin, C.-C. and Sheng, M. (2003) 'Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(8), pp. 3262–3271.

Herzog, É. (2004) 'Comprendre les neurones glutamatergiques chez les mammifères : un ménage à trois', *M/S : médecine sciences*, 20(12), pp. 1063–1066.

Hillier, B. J. *et al.* (1999) 'Unexpected Modes of PDZ Domain Scaffolding Revealed by Structure of nNOS-Syntrophin Complex', *Science*, 284(5415), pp. 812–815. doi: 10.1126/science.284.5415.812.

Hirano, S. and Takeichi, M. (2012) 'Cadherins in Brain Morphogenesis and Wiring', *Physiological Reviews*, 92(2), pp. 597–634. doi: 10.1152/physrev.00014.2011.

Hochmann, J. (2009) *Histoire de l'autisme*. Odile Jacob.

Hollocks, M. J. *et al.* (2019) 'Anxiety and depression in adults with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis', *Psychological Medicine*, 49(4), pp. 559–572. doi: 10.1017/S0033291718002283.

Holmes, J. B. *et al.* (2020) 'SPDI: data model for variants and applications at NCBI', *Bioinformatics*, 36(6), pp. 1902–1907. doi: 10.1093/bioinformatics/btz856.

Hossain, M. M. *et al.* (2020) 'Prevalence of comorbid psychiatric disorders among people with autism spectrum disorder: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses', *Psychiatry Research*, 287, p. 112922. doi: 10.1016/j.psychres.2020.112922.

Hsiao, E. Y. *et al.* (2013) 'Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders', *Cell*, 155(7), pp. 1451–1463. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.024.

Hu, X.-Z. *et al.* (2006) 'Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder', *American Journal of Human Genetics*, 78(5), pp. 815–826. doi: 10.1086/503850.

Huang, G. *et al.* (2019) 'Long Noncoding RNA Can Be a Probable Mechanism and a Novel Target for Diagnosis and Therapy in Fragile X Syndrome', *Frontiers in Genetics*, 10. doi: 10.3389/fgene.2019.00446.

Hudson, C. C., Hall, L. and Harkness, K. L. (2019) 'Prevalence of Depressive Disorders in Individuals with Autism Spectrum Disorder: a Meta-Analysis', *Journal of Abnormal Child Psychology*, 47(1), pp. 165–175. doi: 10.1007/s10802-018-0402-1.

Ilyas, M. (2019) 'Replication Data for: The Genetics of Intellectual Disability Review Tables.' Harvard Dataverse. doi: 10.7910/DVN/MMUNLR.

Ingham, P. W., Taylor, A. M. and Nakano, Y. (1991) 'Role of the Drosophila patched gene in positional signalling', *Nature*, 353(6340), pp. 184–187. doi: 10.1038/353184a0.

INSERM, E. collective (2016) *Déficiences intellectuelles*. EDP Sciences. Available at: http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/6816 (Accessed: 31 August 2020).

International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (1998) 'A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q.', *Human Molecular Genetics*, 7(3), pp. 571–578. doi: 10.1093/hmg/7.3.571.

Ivkov, R. and Bunz, F. (2015) 'Pathways to chromothripsis', *Cell Cycle*, 14(18), pp. 2886–2890. doi: 10.1080/15384101.2015.1068483.

Jacquemont, S. *et al.* (2014) 'A Higher Mutational Burden in Females Supports a "Female Protective Model" in Neurodevelopmental Disorders', *The American Journal of Human Genetics*, 94(3), pp. 415–425. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.02.001.

Jamain, S. *et al.* (2002) 'Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism', *Molecular Psychiatry*, 7(3), pp. 302–310. doi: 10.1038/sj.mp.4000979.

Jamain, S. *et al.* (2003) 'Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism', *Nature Genetics*, 34(1), pp. 27–29. doi: 10.1038/ng1136.

Jaskolski, F., Coussen, F. and Mulle, C. (2005) 'Subcellular localization and trafficking of kainate receptors', *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(1), pp. 20–26. doi: 10.1016/j.tips.2004.11.008.

Johnson, R. L. *et al.* (1996) 'Human Homolog of patched, a Candidate Gene for the Basal Cell Nevus Syndrome', *Science*, 272(5268), pp. 1668–1671. doi: 10.1126/science.272.5268.1668.

Jonsson, L. *et al.* (2014) 'Association study between autistic-like traits and polymorphisms in the autism candidate regions RELN, CNTNAP2, SHANK3, and CDH9/10', *Molecular Autism*, 5(1). doi: 10.1186/2040-2392-5-55.

Jorde, L. B. *et al.* (1991) 'Complex segregation analysis of autism', *American Journal of Human Genetics*, 49(5), pp. 932–938.

Jumah, F. *et al.* (2016) 'Neuroanatomical variation in autism spectrum disorder: A comprehensive review', *Clinical Anatomy*, 29(4), pp. 454–465. doi: 10.1002/ca.22717.

Jung, M. *et al.* (2019) 'Decreased structural connectivity and resting-state brain activity in the lateral occipital cortex is associated with social communication deficits in boys with autism spectrum disorder', *NeuroImage*, 190, pp. 205–212. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.09.031.

Juric-Sekhar, G. and Hevner, R. F. (2019) 'Malformations of Cerebral Cortex Development: Molecules and Mechanisms', *Annual review of pathology*, 14, pp. 293–318. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012927.

Kanner, L. (1968) 'Autistic disturbances of affective contact', *Acta Paedopsychiatrica*, 35(4), pp. 100–136.

Karaca, E. *et al.* (2015) 'Genes that affect brain structure and function identified by rare variant analyses of Mendelian neurologic disease', *Neuron*, 88(3), pp. 499–513. doi: 10.1016/j.neuron.2015.09.048.

Karczewski, K. J. *et al.* (2020) 'The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans', *Nature*, 581(7809), pp. 434–443. doi: 10.1038/s41586-020-2308-7.

Kasem, E., Kurihara, T. and Tabuchi, K. (2018) 'Neurexins and neuropsychiatric disorders', *Neuroscience Research*, 127, pp. 53–60. doi: 10.1016/j.neures.2017.10.012.

Katoh, Y. and Katoh, M. (2005) 'Identification and characterization of DISP3 gene in silico', *International Journal of Oncology*, 26(2), pp. 551–556.

Kerin, T. *et al.* (2012) 'A Noncoding RNA Antisense to Moesin at 5p14.1 in Autism', *Science Translational Medicine*, 4(128), pp. 128ra40-128ra40. doi: 10.1126/scitranslmed.3003479.

Kim, E. *et al.* (1997) 'GKAP, a Novel Synaptic Protein That Interacts with the Guanylate Kinase-like Domain of the PSD-95/SAP90 Family of Channel Clustering Molecules', *The Journal of Cell Biology*, 136(3), pp. 669–678.

Kim, E. and Sheng, M. (2004) 'PDZ domain proteins of synapses', *Nature Reviews Neuroscience*, 5(10), pp. 771–781. doi: 10.1038/nrn1517.

Kimura, K. *et al.* (1996) 'Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase)', *Science*, 273(5272), pp. 245–248. doi: 10.1126/science.273.5272.245.

Kircher, M. *et al.* (2014) 'A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants', *Nature Genetics*, 46(3), pp. 310–315. doi: 10.1038/ng.2892.

Kochinke, K. *et al.* (2016) 'Systematic Phenomics Analysis Deconvolutes Genes Mutated in Intellectual Disability into Biologically Coherent Modules', *American Journal of Human Genetics*, 98(1), pp. 149–164. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.11.024.

Konířová, J. *et al.* (2017) 'Modulated DISP3/PTCHD2 expression influences neural stem cell fate decisions', *Scientific Reports*, 7, p. 41597. doi: 10.1038/srep41597.

Kornau, H. C. *et al.* (1995) 'Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95', *Science*, 269(5231), pp. 1737–1740. doi: 10.1126/science.7569905.

Korzus, E. (2017) 'Rubinstein-Taybi Syndrome and Epigenetic Alterations', *Advances in experimental medicine and biology*, 978, pp. 39–62. doi: 10.1007/978-3-319-53889-1_3.

Krapivinsky, G. *et al.* (2004) 'SynGAP-MUPP1-CaMKII Synaptic Complexes Regulate p38 MAP Kinase Activity and NMDA Receptor-Dependent Synaptic AMPA Receptor Potentiation', *Neuron*, 43(4), pp. 563–574. doi: 10.1016/j.neuron.2004.08.003.

Krishnan, A. *et al.* (2016) 'Genome-wide prediction and functional characterization of the genetic basis of autism spectrum disorder', *Nature neuroscience*, 19(11), pp. 1454–1462. doi: 10.1038/nn.4353.

Kubo, T. *et al.* (2002) 'A Novel FERM Domain Including Guanine Nucleotide Exchange Factor Is Involved in Rac Signaling and Regulates Neurite Remodeling', *The Journal of Neuroscience*, 22(19), pp. 8504–8513. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-19-08504.2002.

Kühn, S. and Geyer, M. (2014) 'Formins as effector proteins of Rho GTPases', *Small GTPases*, 5. doi: 10.4161/sgtp.29513.

Kumar, P., Henikoff, S. and Ng, P. C. (2009) 'Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm', *Nature Protocols*, 4(7), pp. 1073–1081. doi: 10.1038/nprot.2009.86.

Kuwabara, P. E. *et al.* (2000) 'A C. elegans patched gene, ptc-1, functions in germ-line cytokinesis', *Genes & Development*, 14(15), pp. 1933–1944.

Kuwabara, P. E. and Labouesse, M. (2002) 'The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role?', *Trends in Genetics*, 18(4), pp. 193–201. doi: 10.1016/S0168-9525(02)02640-9.

Lai, M.-C. *et al.* (2019) 'Prevalence of co-occurring mental health diagnoses in the autism population: a systematic review and meta-analysis', *The Lancet Psychiatry*, 6(10), pp. 819–829. doi: 10.1016/S2215-0366(19)30289-5.

Lam, B. D. and Hordijk, P. L. (2013) 'The Rac1 hypervariable region in targeting and signaling', *Small GTPases*, 4(2), pp. 78–89. doi: 10.4161/sgtp.23310.

Landrum, M. J. *et al.* (2020) 'ClinVar: improvements to accessing data', *Nucleic Acids Research*, 48(D1), pp. D835–D844. doi: 10.1093/nar/gkz972.

Lang, T. (2007) 'SNARE proteins and "membrane rafts"', *The Journal of Physiology*, 585(Pt 3), pp. 693–698. doi: 10.1113/jphysiol.2007.134346.

Langridge, A. T. *et al.* (2013) 'Maternal Conditions and Perinatal Characteristics Associated with Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability', *PLoS ONE*, 8(1). doi: 10.1371/journal.pone.0050963.

Lapouge, K. *et al.* (2000) 'Structure of the TPR Domain of p67phox in Complex with Rac·GTP', *Molecular Cell*, 6(4), pp. 899–907. doi: 10.1016/S1097-2765(05)00091-2.

Laumonnier, F. *et al.* (2004) 'X-Linked Mental Retardation and Autism Are Associated with a Mutation in the NLGN4 Gene, a Member of the Neuroligin Family', *American Journal of Human Genetics*, 74(3), pp. 552–557.

Lee, H.-J. and Zheng, J. J. (2010) 'PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification', *Cell Communication and Signaling*, 8(1), p. 8. doi: 10.1186/1478-811X-8-8.

Lehmann, J., Colpaert, F. and Canton, H. (1991) 'Glutamate and glycine co-activate while polyamines merely modulate the NMDA receptor complex', *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 15(2), pp. 183–190. doi: 10.1016/0278-5846(91)90079-g.

Lejeune, J., Turpin, R. and Gautier, M. (1959) *Mongolisme ; une maladie chromosomique (trisomy)*, *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*. Bull Acad Natl Med. Available at: https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/13662687/ (Accessed: 16 September 2020).

Leonard, H. *et al.* (2003) 'Prevalence of intellectual disability in Western Australia', *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 17(1), pp. 58–67. doi: 10.1046/j.1365-3016.2003.00469.x.

Levy, D. *et al.* (2011) 'Rare De Novo and Transmitted Copy-Number Variation in Autistic Spectrum Disorders', *Neuron*, 70(5), pp. 886–897. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.015.

Li, J. *et al.* (2007) 'Crucial Role of Drosophila Neurexin in Proper Active Zone Apposition to Postsynaptic Densities, Synaptic Growth and Synaptic Transmission', *Neuron*, 55(5), pp. 741–755. doi: 10.1016/j.neuron.2007.08.002.

Li, X., Zou, H. and Brown, W. T. (2012) 'Genes associated with autism spectrum disorder', *Brain Research Bulletin*, 88(6), pp. 543–552. doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.05.017.

Li, Y. *et al.* (2019) 'Hippocampal deficits in neurodevelopmental disorders', *Neurobiology of Learning and Memory*, 165, p. 106945. doi: 10.1016/j.nlm.2018.10.001.

Liao, C. *et al.* (2013) 'Loss-of-function variation in the DPP6 gene is associated with autosomal dominant microcephaly and mental retardation', *European Journal of Medical Genetics*, 56(9), pp. 484–489. doi: 10.1016/j.ejmg.2013.06.008.

Lionel, A. C. *et al.* (2013) 'Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia and seizures', *Human Molecular Genetics*, 22(10), pp. 2055–2066. doi: 10.1093/hmg/ddt056.

Liu, X. *et al.* (2016) 'dbNSFP v3.0: A One-Stop Database of Functional Predictions and Annotations for Human Nonsynonymous and Splice-Site SNVs', *Human Mutation*, 37(3), pp. 235–241. doi: 10.1002/humu.22932.

Liu, Y. *et al.* (2010) 'The relationship between mental retardation and developmental delays in children and the levels of arsenic, mercury and lead in soil samples taken near their mother's residence during pregnancy', *International journal of hygiene and environmental health*, 213(2), pp. 116–123. doi: 10.1016/j.ijheh.2009.12.004.

Lodish, H. *et al.* (2000) 'Insertion of Membrane Proteins into the ER Membrane', *Molecular Cell Biology. 4th edition*. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21731/ (Accessed: 22 September 2020).

Long, J.-F. *et al.* (2003) 'Supramodular structure and synergistic target binding of the N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95', *Journal of Molecular Biology*, 327(1), pp. 203–214. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00113-X.

Loomes, R., Hull, L. and Mandy, W. P. L. (2017) 'What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis', *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 56(6), pp. 466–474. doi: 10.1016/j.jaac.2017.03.013.

Lubs, H. A. *et al.* (1996) 'XLMR genes: update 1996', *American Journal of Medical Genetics*, 64(1), pp. 147–157. doi: 10.1002/(SICI)1096-8628(19960712)64:1<147::AID-AJMG25>3.0.CO;2-M.

Lugo-Marín, J. *et al.* (2019) 'Prevalence of psychiatric disorders in adults with autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis', *Research in Autism Spectrum Disorders*, 59, pp. 22–33. doi: 10.1016/j.rasd.2018.12.004.

Lukmanji, S. *et al.* (2019) 'The co-occurrence of epilepsy and autism: A systematic review', *Epilepsy & Behavior*, 98, pp. 238–248. doi: 10.1016/j.yebeh.2019.07.037.

Luo, T. *et al.* (2019) 'Effect of the autism-associated lncRNA Shank2-AS on architecture and growth of neurons', *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(2), pp. 1754–1762. doi: 10.1002/jcb.27471.

Lyall, K., Schmidt, R. J. and Hertz-Picciotto, I. (2014) 'Maternal lifestyle and environmental risk factors for autism spectrum disorders', *International Journal of Epidemiology*, 43(2), pp. 443–464. doi: 10.1093/ije/dyt282.

Ma, Y. *et al.* (2002) 'Hedgehog-Mediated Patterning of the Mammalian Embryo Requires Transporter-like Function of Dispatched', *Cell*, 111(1), pp. 63–75. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00977-7.

Maeyama, K. *et al.* (2018) 'Congenital Cytomegalovirus Infection in Children with Autism Spectrum Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 48(5), pp. 1483–1491. doi: 10.1007/s10803-017-3412-x.

Maheshri, N. and O'Shea, E. K. (2007) 'Living with Noisy Genes: How Cells Function Reliably with Inherent Variability in Gene Expression', *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 36(1), pp. 413–434. doi: 10.1146/annurev.biophys.36.040306.132705.

Mandel, J.-L. and Chelly, J. (2004) 'Monogenic X-linked mental retardation: Is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations', *European Journal of Human Genetics*, 12(9), pp. 689–693. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201247.

du Manoir, S. *et al.* (1993) 'Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization', *Human Genetics*, 90(6), pp. 590–610. doi: 10.1007/BF00202476.

Marshall, C. R. *et al.* (2008) 'Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder', *The American Journal of Human Genetics*, 82(2), pp. 477–488. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.12.009.

Mauceri, D. *et al.* (2007) 'Dual role of CaMKII-dependent SAP97 phosphorylation in mediating trafficking and insertion of NMDA receptor subunit NR2A', *Journal of Neurochemistry*, 100(4), pp. 1032–1046. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04267.x.

Maulik, P. K. *et al.* (2011) 'Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies', *Research in Developmental Disabilities*, 32(2), pp. 419–436. doi: 10.1016/j.ridd.2010.12.018.

McCarthy, S. *et al.* (2009) 'Microduplications of 16p11.2 are Associated with Schizophrenia', *Nature genetics*, 41(11), pp. 1223–1227. doi: 10.1038/ng.474.

McDonald-McGinn, D. M. *et al.* (2015) '22q11.2 deletion syndrome', *Nature reviews. Disease primers*, 1. doi: 10.1038/nrdp.2015.71.

McPartland, J. C., Reichow, B. and Volkmar, F. R. (2012) 'Sensitivity and Specificity of Proposed DSM-5 Diagnostic Criteria for Autism Spectrum Disorder', *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 51(4), pp. 368–383. doi: 10.1016/j.jaac.2012.01.007.

McPartland, J. and Klin, A. (2006) 'Asperger's syndrome', *Adolescent Medicine Clinics*, 17(3), pp. 771–788; abstract xiii. doi: 10.1016/j.admecli.2006.06.010.

Medina, M. *et al.* (2000) 'Hemizygosity of δ-Catenin (CTNND2) Is Associated with Severe Mental Retardation in Cri-du-Chat Syndrome', *Genomics*, 63(2), pp. 157–164. doi: 10.1006/geno.1999.6090.

Ménager, C. and Kaibuchi, K. (2003) 'Les protéines Rho : leur rôle dans les neurones', *médecine/sciences*, 19(3), pp. 358–363. doi: 10.1051/medsci/2003193358.

de Mendoza, A., Suga, H. and Ruiz-Trillo, I. (2010) 'Evolution of the MAGUK protein gene family in premetazoan lineages', *BMC Evolutionary Biology*, 10, p. 93. doi: 10.1186/1471-2148-10-93.

Meng, Y. *et al.* (2002) 'Abnormal Spine Morphology and Enhanced LTP in LIMK-1 Knockout Mice', *Neuron*, 35(1), pp. 121–133. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00758-4.

Meyer, G. *et al.* (2004) 'The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: a case study on neuroligin', *Neuropharmacology*, 47(5), pp. 724–733. doi: 10.1016/j.neuropharm.2004.06.023.

Milani, D., Ronzoni, L. and Esposito, S. (2015) 'Genetic Advances in Intellectual Disability', *Journal of Pediatric Genetics*, 4(3), pp. 125–127. doi: 10.1055/s-0035-1564438.

Mircsof, D. *et al.* (2015) 'Mutations in NONO lead to syndromic intellectual disability and inhibitory synaptic defects', *Nature Neuroscience*, 18(12), pp. 1731–1736. doi: 10.1038/nn.4169.

Mizoguchi, A. *et al.* (2002) 'Nectin an adhesion molecule involved in formation of synapses', *Journal of Cell Biology*, 156(3), pp. 555–565. doi: 10.1083/jcb.200103113.

Mlechkovich, G. *et al.* (2014) 'Distinct Cytoplasmic Domains in Plexin-A4 Mediate Diverse Responses to Semaphorin 3A in Developing Mammalian Neurons', *Science Signaling*, 7(316), pp. ra24–ra24. doi: 10.1126/scisignal.2004734.

Molloy, C. A., Keddache, M. and Martin, L. J. (2005) 'Evidence for linkage on 21q and 7q in a subset of autism characterized by developmental regression', *Molecular Psychiatry*, 10(8), pp. 741–746. doi: 10.1038/sj.mp.4001691.

Morrison, D. K. (2012) 'MAP Kinase Pathways', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), p. a011254. doi: 10.1101/cshperspect.a011254.

Morrow, E. M. *et al.* (2008) 'Identifying Autism Loci and Genes by Tracing Recent Shared Ancestry', *Science*, 321(5886), pp. 218–223. doi: 10.1126/science.1157657.

Mosavi, L. K. *et al.* (2004) 'The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition', *Protein Science*, 13(6), pp. 1435–1448. doi: 10.1110/ps.03554604.

Moss, J. *et al.* (2012) 'Prevalence of autism spectrum disorder symptomatology and related behavioural characteristics in individuals with Down syndrome':, *Autism*. doi: 10.1177/1362361312442790.

Mukherjee, K. *et al.* (2008) 'CASK Functions as a Mg2+-independent neurexin kinase', *Cell*, 133(2), pp. 328–339. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.036.

Mwaniki, M. K. *et al.* (2012) 'Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review', *Lancet*, 379(9814), pp. 445–452. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61577-8.

Nagase, T. *et al.* (2000) 'Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XVI. The Complete Sequences of 150 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in vitro', *DNA Research*, 7(1), pp. 65–73. doi: 10.1093/dnares/7.1.65.

Naisbitt, S. *et al.* (2000) 'Interaction of the Postsynaptic Density-95/Guanylate Kinase Domain-Associated Protein Complex with a Light Chain of Myosin-V and Dynein', *The Journal of Neuroscience*, 20(12), pp. 4524–4534. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-12-04524.2000.

Nakajima, M. *et al.* (2019) 'Combinatorial Targeting of Distributed Forebrain Networks Reverses Noise Hypersensitivity in a Model of Autism Spectrum Disorder', *Neuron*, 104(3), pp. 488-500.e11. doi: 10.1016/j.neuron.2019.09.040.

Nakatani, J. *et al.* (2009) 'Abnormal Behavior in a Chromosome- Engineered Mouse Model for Human 15q11-13 Duplication Seen in Autism', *Cell*, 137(7), pp. 1235–1246. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.024.

Noor, A. *et al.* (2010) 'Disruption at the PTCHD1 Locus on Xp22.11 in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability', *Science Translational Medicine*, 2(49), pp. 49ra68-49ra68. doi: 10.1126/scitranslmed.3001267.

Norman, A. L. *et al.* (2009) 'Neuroimaging and fetal alcohol spectrum disorders', *Developmental Disabilities Research Reviews*, 15(3), pp. 209–217. doi: 10.1002/ddrr.72.

Noroozi, R. *et al.* (2018) 'Meta-analysis of GABRB3 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Autism Spectrum Disorder', *Journal of molecular neuroscience: MN*, 65(4), pp. 432–437. doi: 10.1007/s12031-018-1114-2.

Nuriya, M. and Huganir, R. L. (2006) 'Regulation of AMPA receptor trafficking by N-cadherin', *Journal of Neurochemistry*, 97(3), pp. 652–661. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03740.x.

Oliva, C. *et al.* (2012) 'Role of the maguk protein family in synapse formation and function', *Developmental Neurobiology*, 72(1), pp. 57–72. doi: 10.1002/dneu.20949.

OMS (2018) *International classification of diseases for mortality and morbidity statistics (11th Revision)*. World Health Organization. Available at: https://icd.who.int/browse11/l-m/en.

Ornoy, A., Weinstein-Fudim, L. and Ergaz, Z. (2015) 'Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD)', *Reproductive Toxicology*, 56, pp. 155–169. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.05.007.

Ott, C. M. and Lingappa, V. R. (2002) 'Integral membrane protein biosynthesis: why topology is hard to predict', *Journal of Cell Science*, 115(10), pp. 2003–2009.

Ott, J. (2001) 'Major strengths and weaknesses of the lod score method', *Advances in Genetics*, 42, pp. 125–132. doi: 10.1016/s0065-2660(01)42019-0.

Pagnamenta, A. T. *et al.* (2011) 'Rare familial 16q21 microdeletions under a linkage peak implicate cadherin 8 (CDH8) in susceptibility to autism and learning disability', *Journal of Medical Genetics*, 48(1), pp. 48–54. doi: 10.1136/jmg.2010.079426.

Paoletti, P., Bellone, C. and Zhou, Q. (2013) 'NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease', *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), pp. 383–400. doi: 10.1038/nrn3504.

Parner, E. T., Schendel, D. E. and Thorsen, P. (2008) 'Autism Prevalence Trends Over Time in Denmark: Changes in Prevalence and Age at Diagnosis', *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 162(12), pp. 1150–1156. doi: 10.1001/archpedi.162.12.1150.

Parthiban, V., Gromiha, M. M. and Schomburg, D. (2006) 'CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations', *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server issue), pp. W239–W242. doi: 10.1093/nar/gkl190.

Patel, S. S. *et al.* (2017) 'Targeting sonic hedgehog signaling in neurological disorders', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 74, pp. 76–97. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.01.008.

Peça, J. *et al.* (2011) 'Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction', *Nature*, 472(7344), pp. 437–442. doi: 10.1038/nature09965.

Persico, A. M. and Napolioni, V. (2013) 'Urinary p-cresol in autism spectrum disorder', *Neurotoxicology and Teratology*, 36, pp. 82–90. doi: 10.1016/j.ntt.2012.09.002.

Peters, A., Proskauer, C. C. and Ribak, C. E. (1982) 'Chandelier cells in rat visual cortex', *Journal of Comparative Neurology*, 206(4), pp. 397–416. doi: https://doi.org/10.1002/cne.902060408.

Petrosky, K. Y. *et al.* (2005) 'A General Model for Preferential Hetero-oligomerization of LIN-2/7 Domains MECHANISM UNDERLYING DIRECTED ASSEMBLY OF SUPRAMOLECULAR SIGNALING COMPLEXES', *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), pp. 38528–38536. doi: 10.1074/jbc.M506536200.

Pfeuty, B. (2004) *Rôles des synapses électriques dans la synchronisation neuronale : Une étude théorique*. phdthesis. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. Available at: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00007936 (Accessed: 12 September 2020).

Pierrat, V. *et al.* (2005) 'Prevalence, causes, and outcome at 2 years of age of newborn encephalopathy: population based study', *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 90(3), pp. F257–F261. doi: 10.1136/adc.2003.047985.

Pinel, P. (1809) *Traité médico - philosophique sur laliénation mentale*. J. Ant. Brosson.

Pinto, D. *et al.* (2010) 'Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders', *Nature*, 466(7304), pp. 368–372. doi: 10.1038/nature09146.

Piven, J. *et al.* (1990) 'Magnetic resonance imaging evidence for a defect of cerebral cortical development in autism', *American Journal of Psychiatry*, 147(6), pp. 734–739. doi: 10.1176/ajp.147.6.734.

Piven, J. *et al.* (1997) 'An MRI study of autism: the cerebellum revisited', *Neurology*, 49(2), pp. 546–551. doi: 10.1212/wnl.49.2.546.

Pizzarelli, R. *et al.* (2020) 'Tuning GABAergic Inhibition: Gephyrin Molecular Organization and Functions', *Neuroscience*, 439, pp. 125–136. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.07.036.

Polizio, A. H. *et al.* (2011) 'Heterotrimeric Gi Proteins Link Hedgehog Signaling to Activation of Rho Small GTPases to Promote Fibroblast Migration', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(22), pp. 19589–19596. doi: 10.1074/jbc.M110.197111.

Poot, M. (2015) 'Connecting the CNTNAP2 Networks with Neurodevelopmental Disorders', *Molecular Syndromology*, 6(1), pp. 7–22. doi: 10.1159/000371594.

Popova, S. *et al.* (2017) 'Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis', *The Lancet Global Health*, 5(3), pp. e290–e299. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30021-9.

Prandini, P. *et al.* (2012) 'The association of rs4307059 and rs35678 markers with autism spectrum disorders is replicated in Italian families', *Psychiatric Genetics*, 22(4), pp. 177–181. doi: 10.1097/YPG.0b013e32835185c9.

Purugganan, O. (2018) 'Intellectual Disabilities', *Pediatrics in Review*, 39(6), pp. 299–309. doi: 10.1542/pir.2016-0116.

Purves, D. *et al.* (2004) *Neuroscience*. 3rd ed. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, Publishers.

Quartier, A. *et al.* (2019) 'Novel mutations in NLGN3 causing autism spectrum disorder and cognitive impairment', *Human Mutation*, 40(11), pp. 2021–2032. doi: 10.1002/humu.23836.

Ranade, K. *et al.* (2001) 'High-Throughput Genotyping with Single Nucleotide Polymorphisms', *Genome Research*, 11(7), pp. 1262–1268. doi: 10.1101/gr.157801.

Raymond, F. L. and Tarpey, P. (2006) 'The genetics of mental retardation', *Human Molecular Genetics*, 15(suppl_2), pp. R110–R116. doi: 10.1093/hmg/ddl189.

Redcay, E. (2008) 'The superior temporal sulcus performs a common function for social and speech perception: Implications for the emergence of autism', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(1), pp. 123–142. doi: 10.1016/j.neubiorev.2007.06.004.

Redcay, E. and Courchesne, E. (2005) 'When Is the Brain Enlarged in Autism? A Meta-Analysis of All Brain Size Reports', *Biological Psychiatry*, 58(1), pp. 1–9. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.03.026.

Reiersen, A. M. and Todd, R. D. (2008) 'Co-occurrence of ADHD and autism spectrum disorders: phenomenology and treatment', *Expert Review of Neurotherapeutics*, 8(4), pp. 657–669. doi: 10.1586/14737175.8.4.657.

Remerand, G. *et al.* (2019) 'Expanding the phenotypic spectrum of Allan–Herndon–Dudley syndrome in patients with SLC16A2 mutations', *Developmental Medicine & Child Neurology*, 61(12), pp. 1439–1447. doi: https://doi.org/10.1111/dmcn.14332.

Rice, J. P., Saccone, N. L. and Corbett, J. (2001) 'The lod score method', *Advances in Genetics*, 42, pp. 99–113. doi: 10.1016/s0065-2660(01)42017-7.

Richa, S. *et al.* (2014) 'Suicide in Autism Spectrum Disorders', *Archives of Suicide Research*, 18(4), pp. 327–339. doi: 10.1080/13811118.2013.824834.

Richter, M. *et al.* (2019) 'Altered TAOK2 activity causes autism-related neurodevelopmental and cognitive abnormalities through RhoA signaling', *Molecular Psychiatry*, 24(9), pp. 1329–1350. doi: 10.1038/s41380-018-0025-5.

Robbins, D. J., Fei, D. L. and Riobo, N. A. (2012) 'The Hedgehog Signal Transduction Network', *Science signaling*, 5(246), p. re6. doi: 10.1126/scisignal.2002906.

Roberts, E. M. *et al.* (2007) 'Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in the California Central Valley', *Environmental Health Perspectives*, 115(10), pp. 1482–1489. doi: 10.1289/ehp.10168.

Robinson, E. B. *et al.* (2013) 'Examining and interpreting the female protective effect against autistic behavior', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(13), pp. 5258–5262. doi: 10.1073/pnas.1211070110.

Rojas, A. M. *et al.* (2012) 'The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids', *Journal of Cell Biology*, 196(2), pp. 189–201. doi: 10.1083/jcb.201103008.

Ronemus, M. *et al.* (2014) 'The role of de novo mutations in the genetics of autism spectrum disorders', *Nature Reviews Genetics*, 15(2), pp. 133–141. doi: 10.1038/nrg3585.

Ross, P. J. *et al.* (2020) 'Synaptic Dysfunction in Human Neurons With Autism-Associated Deletions in PTCHD1-AS', *Biological Psychiatry*, 87(2), pp. 139–149. doi: 10.1016/j.biopsych.2019.07.014.

Rousseau, T. *et al.* (2010) '[Variations in the prevalence of Down's syndrome in the French population between 1978 and 2005]', *Journal De Gynecologie, Obstetrique Et Biologie De La Reproduction*, 39(4), pp. 290–296. doi: 10.1016/j.jgyn.2010.03.008.

Russell, G., Steer, C. and Golding, J. (2011) 'Social and demographic factors that influence the diagnosis of autistic spectrum disorders', *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 46(12), pp. 1283–1293. doi: 10.1007/s00127-010-0294-z.

Rutter, M. (2005) 'Incidence of autism spectrum disorders: Changes over time and their meaning*', *Acta Paediatrica*, 94(1), pp. 2–15. doi: 10.1111/j.1651-2227.2005.tb01779.x.

Rzhetsky, A. *et al.* (2014) 'Environmental and State-Level Regulatory Factors Affect the Incidence of Autism and Intellectual Disability', *PLOS Computational Biology*, 10(3), p. e1003518. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003518.

Sakai, Y. *et al.* (2011) 'Protein interactome reveals converging molecular pathways among autism disorders', *Science translational medicine*, 3(86), p. 86ra49. doi: 10.1126/scitranslmed.3002166.

Salgado, D. *et al.* (2016) 'UMD-Predictor: A High-Throughput Sequencing Compliant System for Pathogenicity Prediction of any Human cDNA Substitution', *Human Mutation*, 37(5), pp. 439–446. doi: 10.1002/humu.22965.

Sandin, S. *et al.* (2014) 'The Familial Risk of Autism', *JAMA*, 311(17), pp. 1770–1777. doi: 10.1001/jama.2014.4144.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), pp. 5463–5467.

Sasaki, N., Kurisu, J. and Kengaku, M. (2010) 'Sonic hedgehog signaling regulates actin cytoskeleton via Tiam1–Rac1 cascade during spine formation', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 45(4), pp. 335–344. doi: 10.1016/j.mcn.2010.07.006.

Schaaf, C. P. *et al.* (2020) 'A framework for an evidence-based gene list relevant to autism spectrum disorder', *Nature Reviews Genetics*, 21(6), pp. 367–376. doi: 10.1038/s41576-020-0231-2.

Schalock, R. L. *et al.* (2010) *Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Supports. Eleventh Edition*, *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities*. American Association on Intellectual and Developmental Disabilities.

Schellenberg, G. D. *et al.* (2006) 'Evidence for multiple loci from a genome scan of autism kindreds', *Molecular Psychiatry*, 11(11), pp. 1049–1060. doi: 10.1038/sj.mp.4001874.

Schluth-Bolard, C. *et al.* (2009) 'Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: Array CGH study of 47 unrelated cases', *European Journal of Medical Genetics*, 52(5), pp. 291–296. doi: 10.1016/j.ejmg.2009.05.011.

Schumann, C. M. *et al.* (2010) 'Longitudinal Magnetic Resonance Imaging Study of Cortical Development through Early Childhood in Autism', *Journal of Neuroscience*, 30(12), pp. 4419–4427. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5714-09.2010.

Scita, G. *et al.* (2008) 'IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions', *Trends in Cell Biology*, 18(2), pp. 52–60. doi: 10.1016/j.tcb.2007.12.002.

Sebastião, A. M. *et al.* (2013) 'Lipid rafts, synaptic transmission and plasticity: Impact in age-related neurodegenerative diseases', *Neuropharmacology*, 64, pp. 97–107. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.053.

Shelton, J. F. *et al.* (2014) 'Neurodevelopmental Disorders and Prenatal Residential Proximity to Agricultural Pesticides: The CHARGE Study', *Environmental Health Perspectives*, 122(10), pp. 1103–1109. doi: 10.1289/ehp.1307044.

Sheng, M. and Kim, E. (2011) 'The Postsynaptic Organization of Synapses', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12). doi: 10.1101/cshperspect.a005678.

Shohat, S., Ben-David, E. and Shifman, S. (2017) 'Varying Intolerance of Gene Pathways to Mutational Classes Explain Genetic Convergence across Neuropsychiatric Disorders', *Cell Reports*, 18(9), pp. 2217–2227. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.007.

Silverman, J. L. *et al.* (2010) 'Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism', *Nature reviews. Neuroscience*, 11(7), pp. 490–502. doi: 10.1038/nrn2851.

Simpson, M. A. *et al.* (2015) 'Direct Interactions with the Integrin β1 Cytoplasmic Tail Activate the Abl2/Arg Kinase', *The Journal of Biological Chemistry*, 290(13), pp. 8360–8372. doi: 10.1074/jbc.M115.638874.

Skelton, P. D., Stan, R. V. and Luikart, B. W. (2019) 'The Role of PTEN in Neurodevelopment', *Complex Psychiatry*, 5(1), pp. 60–71. doi: 10.1159/000504782.

Skuse, D. H. (2007) 'Rethinking the nature of genetic vulnerability to autistic spectrum disorders', *Trends in Genetics*, 23(8), pp. 387–395. doi: 10.1016/j.tig.2007.06.003.

Smyth, I. (1999) 'Isolation and characterization of human patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene inbasal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32', *Human Molecular Genetics*, 8(2), pp. 291–297. doi: 10.1093/hmg/8.2.291.

Sparks, B. F. *et al.* (2002) 'Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder', *Neurology*, 59(2), pp. 184–192. doi: 10.1212/wnl.59.2.184.

Srour, M. and Shevell, M. (2014) 'Genetics and the investigation of developmental delay/intellectual disability', *Archives of Disease in Childhood*, 99(4), pp. 386–389. doi: 10.1136/archdischild-2013-304063.

Staden, R. (1979) ‘A strategy of DNA sequencing employing computer programs.’, *Nucleic Acids Research*, 6(7), p. 2601. doi: 10.1093/nar/6.7.2601.

van Steensel, F. J. A., Bögels, S. M. and Perrin, S. (2011) ‘Anxiety Disorders in Children and Adolescents with Autistic Spectrum Disorders: A Meta-Analysis’, *Clinical Child and Family Psychology Review*, 14(3), p. 302. doi: 10.1007/s10567-011-0097-0.

Stevens, S. A. *et al.* (2013) ‘Autism characteristics in children with fetal alcohol spectrum disorders’, *Child Neuropsychology*, 19(6), pp. 579–587. doi: 10.1080/09297049.2012.727791.

Strömland, K. *et al.* (1994) ‘Autism in thalidomide embryopathy: a population study’, *Developmental Medicine and Child Neurology*, 36(4), pp. 351–356. doi: 10.1111/j.1469-8749.1994.tb11856.x.

Stubbs, G., Henley, K. and Green, J. (2016) ‘Autism: Will vitamin D supplementation during pregnancy and early childhood reduce the recurrence rate of autism in newborn siblings?’, *Medical Hypotheses*, 88, pp. 74–78. doi: 10.1016/j.mehy.2016.01.015.

Südhof, T. C. (2008) ‘Neuroligins and Neurexins Link Synaptic Function to Cognitive Disease’, *Nature*, 455(7215), pp. 903–911. doi: 10.1038/nature07456.

Südhof, T. C. (2013) ‘Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle’, *Neuron*, 80(3). doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.022.

Suto, F. *et al.* (2005) ‘Plexin-A4 Mediates Axon-Repulsive Activities of Both Secreted and Transmembrane Semaphorins and Plays Roles in Nerve Fiber Guidance’, *The Journal of Neuroscience*, 25(14), pp. 3628–3637. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4480-04.2005.

Swaminathan, K. *et al.* (2014) ‘A Cdc42- and Rac-interactive binding (CRIB) domain mediates functions of coronin’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), pp. E25–E33. doi: 10.1073/pnas.1315368111.

Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) ‘Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors’, *Cell*, 126(4), pp. 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

Takayanagi, Y. *et al.* (2010) ‘Impairment of social and emotional behaviors in Cadm1-knockout mice’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(3), pp. 703–708. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.04.165.

Takeuchi, M. *et al.* (1997) ‘SAPAPs A FAMILY OF PSD-95/SAP90-ASSOCIATED PROTEINS LOCALIZED AT POSTSYNAPTIC DENSITY’, *Journal of Biological Chemistry*, 272(18), pp. 11943–11951. doi: 10.1074/jbc.272.18.11943.

Thalhammer, A. and Cingolani, L. A. (2014) ‘Cell adhesion and homeostatic synaptic plasticity’, *Neuropharmacology*, 78, pp. 23–30. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.015.

Therman, E., Susman, B. and Denniston, C. (1989) ‘The nonrandom participation of human acrocentric chromosomes in Robertsonian translocations’, *Annals of Human Genetics*, 53(1), pp. 49–65. doi: 10.1111/j.1469-1809.1989.tb01121.x.

Thornton, G. K. and Woods, C. G. (2009) ‘Primary microcephaly: do all roads lead to Rome?’, *Trends in Genetics*, 25(11), pp. 501–510. doi: 10.1016/j.tig.2009.09.011.

Tian, C. *et al.* (2018) ‘An Intellectual Disability-Related Missense Mutation in Rac1 Prevents LTP Induction’, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. doi: 10.3389/fnmol.2018.00223.

Tick, B. *et al.* (2016) ‘Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies’, *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 57(5), pp. 585–595. doi: 10.1111/jcpp.12499.

Tønne, E. *et al.* (2015) ‘Syndromic X-linked intellectual disability segregating with a missense variant in RLIM’, *European Journal of Human Genetics*, 23(12), pp. 1652–1656. doi: 10.1038/ejhg.2015.30.

Tora, D. *et al.* (2017) ‘Cellular Functions of the Autism Risk Factor PTCHD1 in Mice’, *Journal of Neuroscience*, 37(49), pp. 11993–12005. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1393-17.2017.

Torrico, B. *et al.* (2015) ‘Contribution of common and rare variants of the PTCHD1 gene to autism spectrum disorders and intellectual disability’, *European Journal of Human Genetics*, 23(12), pp. 1694–1701. doi: 10.1038/ejhg.2015.37.

Torrico, B. *et al.* (2017) ‘Lack of replication of previous autism spectrum disorder GWAS hits in European populations’, *Autism Research*, 10(2), pp. 202–211. doi: 10.1002/aur.1662.

Tucci, V. *et al.* (2014) ‘Dominant β-catenin mutations cause intellectual disability with recognizable syndromic features’, *The Journal of Clinical Investigation*, 124(4), pp. 1468–1482. doi: 10.1172/JCI70372.

Udomsinprasert, R. *et al.* (2005) ‘Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme’, *Biochemical Journal*, 388(Pt 3), pp. 763–771. doi: 10.1042/BJ20042015.

Uhlén, M. *et al.* (2015) ‘Tissue-based map of the human proteome’, *Science*, 347(6220). doi: 10.1126/science.1260419.

Ung, D. C. *et al.* (2018) ‘Ptchd1 deficiency induces excitatory synaptic and cognitive dysfunctions in mouse’, *Molecular Psychiatry*. doi: 10.1038/mp.2017.39.

Van Vliet, A. H. M. (2010) ‘Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities’, *FEMS Microbiology Letters*, 302(1), pp. 1–7. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01767.x.

Vanier, M. T. (2010) ‘Niemann-Pick disease type C’, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5(1), p. 16. doi: 10.1186/1750-1172-5-16.

Vannucchi, G. *et al.* (2014) ‘Bipolar disorder in adults with Asperger's Syndrome: A systematic review’, *Journal of Affective Disorders*, 168, pp. 151–160. doi: 10.1016/j.jad.2014.06.042.

Vazquez, L. E. *et al.* (2004) ‘SynGAP Regulates Spine Formation’, *The Journal of Neuroscience*, 24(40), pp. 8862–8872. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3213-04.2004.

Velmeshev, D., Magistri, M. and Faghihi, M. A. (2013) 'Expression of non-protein-coding antisense RNAs in genomic regions related to autism spectrum disorders', *Molecular Autism*, 4, p. 32. doi: 10.1186/2040-2392-4-32.

Vianna, P. *et al.* (2018) 'Zika Virus as a Possible Risk Factor for Autism Spectrum Disorder: Neuroimmunological Aspects', *Neuroimmunomodulation*, 25(5–6), pp. 320–327. doi: 10.1159/000495660.

Vreken, P. *et al.* (1997) 'Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency: identification and expression of missense mutations C29R, R886H and R235W', *Human Genetics*, 101(3), pp. 333–338. doi: 10.1007/s004390050637.

Walker, H. A. (1977) 'Incidence of minor physical anomaly in autism', *Journal of autism and childhood schizophrenia*, 7(2), pp. 165–176. doi: 10.1007/BF01537727.

Wang, K. *et al.* (2009) 'Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders', *Nature*, 459(7246), pp. 528–533. doi: 10.1038/nature07999.

Wang, P. *et al.* (2017) 'CRISPR/Cas9-mediated heterozygous knockout of the autism gene CHD8 and characterization of its transcriptional networks in cerebral organoids derived from iPS cells', *Molecular Autism*, 8. doi: 10.1186/s13229-017-0124-1.

Wang, Z. *et al.* (2019) 'Replication of previous GWAS hits suggests the association between rs4307059 near MSNP1AS and autism in a Chinese Han population', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 92, pp. 194–198. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.12.016.

Watanabe, N. *et al.* (1997) 'p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous,is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin', *The EMBO Journal*, 16(11), pp. 3044–3056. doi: 10.1093/emboj/16.11.3044.

Weiß, H. M. and Grisshammer, R. (2002) 'Purification and characterization of the human adenosine A2a receptor functionally expressed in Escherichia coli', *European Journal of Biochemistry*, 269(1), pp. 82–92. doi: https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2002.02618.x.

Weiss, L. A. *et al.* (2009) 'Association between Microdeletion and Microduplication at 16p11.2 and Autism', *http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJMoa075974*. doi: 10.1056/NEJMoa075974.

Weiss, L. A., Arking, D. E. and Consortium, T. G. D. P. of J. H. the A. (2009) 'A GENOME-WIDE LINKAGE AND ASSOCIATION SCAN REVEALS NOVEL LOCI FOR AUTISM', *Nature*, 461(7265), p. 802. doi: 10.1038/nature08490.

Wells, M. F. *et al.* (2016) 'Thalamic reticular impairment underlies attention deficit in Ptchd1Y/− mice', *Nature*, 532(7597), pp. 58–63. doi: 10.1038/nature17427.

Wennerberg, K., Rossman, K. L. and Der, C. J. (2005) 'The Ras superfamily at a glance', *Journal of Cell Science*, 118(5), pp. 843–846. doi: 10.1242/jcs.01660.

Werling, D. M. and Geschwind, D. H. (2013) 'Sex differences in autism spectrum disorders', *Current opinion in neurology*, 26(2), pp. 146–153. doi: 10.1097/WCO.0b013e32835ee548.

White, S. W. *et al.* (2009) 'Anxiety in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorders', *Clinical psychology review*, 29(3), pp. 216–229. doi: 10.1016/j.cpr.2009.01.003.

Wiktorowska-Owczarek, A., Berezińska, M. and Nowak, J. Z. (2015) 'PUFAs: Structures, Metabolism and Functions', *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 24(6), pp. 931–941. doi: 10.17219/acem/31243.

Wing, L. (1981a) 'Asperger's syndrome: a clinical account', *Psychological Medicine*, 11(1), pp. 115–129. doi: 10.1017/s0033291700053332.

Wing, L. (1981b) 'Language, social, and cognitive impairments in autism and severe mental retardation', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 11(1), pp. 31–44. doi: 10.1007/BF01531339.

Wiseman, D. N. *et al.* (2020) 'Expression and purification of recombinant G protein-coupled receptors: A review', *Protein Expression and Purification*, 167. doi: 10.1016/j.pep.2019.105524.

Wong, C. C. Y. *et al.* (2014) 'Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits', *Molecular Psychiatry*, 19(4), pp. 495–503. doi: 10.1038/mp.2013.41.

Wong, W. *et al.* (2002) 'Cell Surface Targeting and Clustering Interactions between Heterologously Expressed PSD-95 and the Shal Voltage-gated Potassium Channel, Kv4.2', *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), pp. 20423–20430. doi: 10.1074/jbc.M109412200.

Wood, N. S. *et al.* (2000) 'Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth. EPICure Study Group', *The New England Journal of Medicine*, 343(6), pp. 378–384. doi: 10.1056/NEJM200008103430601.

Xiang, A. H. *et al.* (2015) 'Association of Maternal Diabetes With Autism in Offspring', *JAMA*, 313(14), pp. 1425–1434. doi: 10.1001/jama.2015.2707.

Xing, X. *et al.* (2019) 'Suppression of Akt-mTOR pathway rescued the social behavior in Cntnap2-deficient mice', *Scientific Reports*, 9. doi: 10.1038/s41598-019-39434-5.

Yadav, R. *et al.* (2012) 'Deletion of Glutamate Delta-1 Receptor in Mouse Leads to Aberrant Emotional and Social Behaviors', *PLOS ONE*, 7(3), p. e32969. doi: 10.1371/journal.pone.0032969.

Yang, Z.-J. *et al.* (2008) 'Medulloblastoma can be Initiated by Deletion of patched in Lineage-Restricted Progenitors or Stem Cells', *Cancer cell*, 14(2), pp. 135–145. doi: 10.1016/j.ccr.2008.07.003.

Yeung, K. S. *et al.* (2017) 'Identification of mutations in the PI3K-AKT-mTOR signalling pathway in patients with macrocephaly and developmental delay and/or autism', *Molecular Autism*, 8. doi: 10.1186/s13229-017-0182-4.

Yu, T. W. *et al.* (2010) 'Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause microcephaly with simplified gyri and abnormal cortical architecture', *Nature Genetics*, 42(11), pp. 1015–1020. doi: 10.1038/ng.683.

Yuen, R. K. *et al.* (2017) 'Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder', *Nature Neuroscience*, 20(4), pp. 602–611. doi: 10.1038/nn.4524.

Yuzaki, M. (2003) 'The δ2 glutamate receptor: 10 years later', *Neuroscience Research*, 46(1), pp. 11–22. doi: 10.1016/S0168-0102(03)00036-1.

Zafeiriou, D. I., Ververi, A. and Vargiami, E. (2007) 'Childhood autism and associated comorbidities', *Brain and Development*, 29(5), pp. 257–272. doi: 10.1016/j.braindev.2006.09.003.

Zarrei, M. *et al.* (2015) 'A copy number variation map of the human genome', *Nature Reviews Genetics*, 16(3), pp. 172–183. doi: 10.1038/nrg3871.

Zeniou-Meyer, M. *et al.* (2010) 'The Coffin-Lowry Syndrome-Associated Protein rsk2 and Neurosecretion', *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(8), pp. 1401–1406. doi: 10.1007/s10571-010-9578-9.

Zhang, T. *et al.* (2019) 'Association between CNTNAP2 polymorphisms and autism: A family-based study in the chinese han population and a meta-analysis combined with GWAS data of psychiatric genomics consortium', *Autism Research*, 12(4). doi: 10.1002/aur.2078.

Zhang-James, Y. *et al.* (2019) 'Effect of disease-associated SLC9A9 mutations on protein–protein interaction networks: implications for molecular mechanisms for ADHD and autism', *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*, 11(1), pp. 91–105. doi: 10.1007/s12402-018-0281-x.

Zhao, Z. and Manser, E. (2005) 'PAK and other Rho-associated kinases – effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation', *Biochemical Journal*, 386(2), pp. 201–214. doi: 10.1042/BJ20041638.

Zhiling, Y. *et al.* (2008) 'Mutations in the gene encoding CADM1 are associated with autism spectrum disorder', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(3), pp. 926–929. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.107.

Zhong, Y. *et al.* (2014) 'Comprehensive analysis of patched domain-containing genes reveals a unique evolutionary pattern', *Genetics and Molecular Research*, 13(3), pp. 7318–7331. doi: 10.4238/2014.February.13.11.

Zielinski, B. A. *et al.* (2014) 'Longitudinal changes in cortical thickness in autism and typical development', *Brain*, 137(6), pp. 1799–1812. doi: 10.1093/brain/awu083.

Zikova, M. *et al.* (2009) 'DISP3, a Sterol-Sensing Domain-Containing Protein that Links Thyroid Hormone Action and Cholesterol Metabolism', *Molecular Endocrinology*, 23(4), pp. 520–528. doi: 10.1210/me.2008-0271.

Zíková, M. *et al.* (2014) 'DISP3 promotes proliferation and delays differentiation of neural progenitor cells', *FEBS Letters*, 588(21), pp. 4071–4077. doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.036.

Zugasti, O., Rajan, J. and Kuwabara, P. E. (2005) 'The function and expansion of the Patched- and Hedgehog-related homologs in C. elegans', *Genome Research*, 15(10), pp. 1402–1410. doi: 10.1101/gr.3935405.

Zweier, C. *et al.* (2009) 'CNTNAP2 and NRXN1 Are Mutated in Autosomal-Recessive Pitt-Hopkins-like Mental Retardation and Determine the Level of a Common Synaptic Protein in Drosophila', *American Journal of Human Genetics*, 85(5), pp. 655–666. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.10.004.

Judith HALEWA

Etude moléculaire et fonctionnelle du gène *PTCHD1* impliqué dans les troubles neurodéveloppementaux

Résumé

L'étude des troubles neurodéveloppementaux a mis en évidence l'implication de gènes essentiels dans le développement neuronal. Parmi eux, l'identification de microdélétions et de mutations dans le gène *PTCHD1* (situé sur le chromosome X) chez des patients atteints de troubles du spectre autistique et/ou de déficience intellectuelle nous a amené à étudier son implication dans le neurodéveloppement. *PTCHD1* code pour une protéine membranaire localisée dans la densité post-synaptique des neurones, qui interagit avec deux protéines clefs de l'échafaudage post-synaptique, PSD-95 et DLG3, ainsi que RAC1, qui est impliqué dans la dynamique du cytosquelette. Nos résultats ont permis de préciser la localisation précise de la queue C-terminale de PTCHD1 interagissant avec RAC1.

La littérature et l'analyse génétique de nouveaux patients ont mis en évidence 13 mutations faux-sens dont nous avons analysé l'impact physiologique et physiopathologique. La surexpression de ces formes mutées de PTCHD1 dans des lignées cellulaires HEK 293T, les Neuro-2A et dans des cultures primaires neuronales issues de souris a permis la mise en évidence d'un défaut d'expression protéique et de localisation membranaire pour certaines mutations, suggérant un impact délétère, alors que d'autres ne perturbent pas ces paramètres.

Ces éléments permettent de donner des pistes supplémentaires sur la physiopathologie induite par les perturbations de ce gène au sein de la synapse glutamatergique lors du neurodéveloppement.

Mots clefs : PTCHD1 – modèles in vitro neuronaux – troubles neurodéveloppementaux – neurogénétique – synapse – interactions protéiques

Abstract

The study of neurodevelopmental disorders shows the involvement of essential genes in neuronal development. Among them, the identification of microdeletions and mutations in *PTCHD1* gene (located on the X chromosome) in patients with autism spectrum disorders and / or intellectual disability led us to study its implication in neurodevelopment. *PTCHD1* encodes a membrane protein located in the postsynaptic density of neurons, which interacts with two key proteins of the postsynaptic scaffold, PSD-95 and DLG3, as well as RAC1, which is involved in cytoskeletal dynamics. Our results allowed us to specify the precise region of the C-terminal tail interacting with RAC1.

The literature and the genetic analysis of new patients revealed 13 missense mutations, whose we analyzed the physiological and pathophysiological impact. The overexpression of these mutated forms of PTCHD1 in HEK 293T and Neuro-2A cell lines, and in primary neuronal cultures derived from mice demonstrated a defect in protein expression and membrane localization for certain mutations, suggesting an impact deleterious, while others do not disturb these parameters.

These elements provide additional leads on the pathophysiology induced by disturbances of this gene within the glutamatergic synapse during neurodevelopment.

Keywords: PTCHD1 – neuronal in vitro models – neurodevelopmental disorders – neurogenetics – synapse – protein interactions